

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

Análisis multi-ómico de la estenosis aórtica degenerativa: procesos moleculares implicados en la calcificación de la válvula aórtica y papel de la aterosclerosis subyacente

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Laura Mouriño Álvarez

Directores

M^a Eugenia González Barderas
Fernando de la Cuesta Marina
Luis Rodríguez Padial

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**Análisis multi-ómico de la estenosis
aórtica degenerativa: procesos
moleculares implicados en la
calcificación de la válvula aórtica y
papel de la aterosclerosis subyacente**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Laura Mouriño Álvarez

Bajo la dirección de los doctores

M^a Eugenia González Barderas
Fernando de la Cuesta Marina
Luis Rodríguez Padial

Madrid, 2014

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos los que han hecho posible este trabajo

A mis directores de tesis

Al laboratorio de Fisiopatología Vascular

A mis padres y hermanos

A Rubén

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	11
SUMMARY	17
<u>INTRODUCCIÓN</u>	23
1. LA VÁLVULA AÓRTICA. BIOLOGÍA Y FUNCIÓN	23
1.1. ESTRUCTURA DE LA VÁLVULA AÓRTICA	23
1.2. FUNCIÓN DE LA VÁLVULA AÓRTICA	25
2. VALVULOPATÍAS AÓRTICAS: DIFERENCIAS ENTRE INSUFICIENCIA Y ESTENOSIS.....	25
2.1. CALCIFICACIÓN DE LA VÁLVULA AÓRTICA: LA ESTENOSIS AÓRTICA DEGENERATIVA.....	27
3. ESTENOSIS AÓRTICA Y ATROSCLEROSIS.....	29
4. MODELOS ANIMALES.....	30
4.1. MODELOS ANIMALES Y EAD	31
4.1.1. MODELOS EN CONEJO.....	32
5. LA INVESTIGACIÓN A TRAVÉS DE LAS CIENCIAS –ÓMICAS.....	33
5.1. PROTEÓMICA	33
5.1.1. MÉTODOS EMPLEADOS EN PROTEÓMICA	34
5.1.1.1. Preparación de la muestra	34
5.1.1.2. Separación de proteínas	36
1) Electroforesis bidimensional (2-DE).....	36
2) Cromatografía líquida (LC).....	39
5.1.1.3. Análisis por espectrometría de masas.....	39
1) Estructura básica de un espectrómetro de masas.....	40
2) Identificación de proteínas: huella peptídica y espectrometría de masas en tándem.....	41

3)	Espectrómetros y métodos utilizados en esta Tesis Doctoral	43
5.1.2.	HISTOLOGÍA MOLECULAR: IMÁGENES USANDO MALDI-MS...	46
5.2.	METABOLÓMICA.....	47
5.2.1.	MÉTODOS UTILIZADOS EN METABOLÓMICA	47
5.2.1.1.	Preparación de la muestra	48
5.2.1.2.	Separación y detección de metabolitos	49
1)	Métodos utilizados en esta Tesis Doctoral: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	50
5.2.1.3.	Análisis de datos.....	52
6.	BIOLOGÍA DE SISTEMAS E INTEGRACIÓN DE RESULTADOS	52
7.	LAS –ÓMICAS EN LA EAD	53
	<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>.....	59
1.	OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS	59
1.1.	MODELO ANIMAL	59
1.1.1.	ECOCARDIOGRAFÍA	59
1.1.2.	ANÁLISIS DE SANGRE	60
1.1.3.	ANÁLISIS HISTOLÓGICOS.....	60
1)	Hematoxilina-eosina	60
2)	Rojo de Alizarina.....	60
3)	Inmunohistoquímicas: RAM11 y α -actina.....	61
1.2.	MUESTRAS HUMANAS	61
1.2.1.	SELECCIÓN DE SUJETOS Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS	61
1.2.2.	CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA	62
1)	Hematoxilina-eosina	63
2)	Tinción de fibras elásticas (EVG)	63
3)	Tinción de lípidos (Oil Red).....	63
4)	Inmunohistoquímicas: CD68 y α -actina	63

2.	ESTUDIOS PROTEÓMICOS.....	64
2.1.	PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS.....	64
2.1.1.	PLASMA.....	64
2.1.1.1.	Depleción de las proteínas mayoritarias del plasma.....	64
2.1.2.	TEJIDO.....	66
2.1.2.1.	Modelo animal.....	66
2.1.2.2.	Humano.....	66
2.2.	ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DIFERENCIAL (2D-DIGE).....	67
2.2.1.	MARCAJE.....	68
2.2.2.	ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2-DE).....	68
2.2.2.1.	Isoelectroenfoque (IEF).....	69
2.2.2.2.	Equilibrado.....	69
2.2.2.3.	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) 70	
2.2.3.	DIGITALIZACIÓN Y ANÁLISIS DE IMÁGENES.....	70
2.2.4.	TINCIÓN DE LOS GELES.....	71
2.2.4.1.	Tinción con plata.....	71
2.2.4.2.	Tinción fluorescente.....	72
2.3.	IDENTIFICACIÓN POR MS.....	72
2.4.	VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	73
2.4.1.	MONITORIZACIÓN POR REACCIÓN SELECCIONADA (SRM).....	74
2.4.2.	TURBIDIMETRÍA.....	75
2.5.	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE INTERACCIONES PROTEICAS.....	75
3.	ESTUDIOS METABOLÓMICOS.....	76
3.1.	EXTRACCIÓN DE METABOLITOS DE PLASMA.....	76
3.2.	DERIVATIZACIÓN DE LA MUESTRA.....	76
3.3.	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.....	76

3.4.	CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS	77
3.5.	ANÁLISIS DE DATOS.....	77
4.	ANÁLISIS HISTOLÓGICO MEDIANTE MALDI-IMS	78
4.1.	PREPARACIÓN DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS.....	78
4.2.	DEPOSICIÓN DE LA MATRIZ	79
4.3.	ADQUISICIÓN DE ESPECTROS DE IMÁGENES.....	80
4.4.	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	80
1.	ESTUDIO INTEGRADO DEL DESARROLLO DE ESTENOSIS AÓRTICA DEGENERATIVO EN UN MODELO ANIMAL	81
1.1.	ESTUDIO DE PROTEÓMICA DIFERENCIAL UTILIZANDO VÁLVULA AÓRTICA DE CONEJO	85
1.2.	Validación de las variaciones proteicas encontradas mediante SRM.....	86
2.	ESTUDIO INTEGRADO DE LA ESTENOSIS AÓRTICA DEGENERATIVA EN MUESTRAS HUMANAS	88
2.1.	EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS HUMANAS EMPLEADAS EN LOS ESTUDIOS	88
2.2.	ESTUDIO ”-ÓMICO” EN MUESTRAS DE PLASMA HUMANO.....	90
2.2.1.	ANÁLISIS PROTEÓMICO DE PLASMA MEDIANTE 2D-DIGE.....	90
2.2.1.1.	Validaciones mediante ensayo de turbidimetría.....	93
2.2.2.	ANÁLISIS METABOLÓMICO DEL PLASMA	95
2.3.	ESTUDIO PROTEÓMICO A PARTIR DE MUESTRAS DE TEJIDO HUMANO	99
2.3.1.	ANÁLISIS DE LA VÁLVULA ESTENÓTICA MEDIANTE HISTOLOGÍA MOLECULAR	99
2.3.2.	ESTUDIO DE PROTEÓMICA DIFERENCIAL DE TEJIDO VALVULAR HUMANO MEDIANTE 2D-DIGE.....	104
2.4.	ESTUDIO PROTEÓMICA DIFERENCIAL UTILIZANDO TEJIDO VALVULAR PROCEDENTE DE INDIVIDUOS CON ATEROSCLEROSIS CORONARIA	108
2.5.	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS. INTEGRACIÓN DE RESULTADOS	119

<u>DISCUSIÓN</u>	127
1. ESTUDIO DE PROTEÓMICA DIFERENCIAL UTILIZANDO UN MODELO ANIMAL DE ESTENOSIS AÓRTICA DEGENERATIVA.....	128
2. ESTUDIO DE PROTEÓMICA Y METABOLÓMICA DE LA ESTENOSIS AÓRTICA DEGENERATIVA CON MUESTRAS HUMANAS	131
2.1. ESTUDIO DE PROTEÓMICA Y METABOLÓMICA DIFERENCIAL EN PLASMA	131
2.1.1. ESTUDIO PROTEÓMICO DE PLASMA HUMANO MEDIANTE 2D-DIGE 131	
2.1.2. ESTUDIO METABOLÓMICO DE PLASMA HUMANO	136
2.1.3. INDICIOS A NIVEL PLASMÁTICO DE LA CALCIFICACIÓN DE LA VÁLVULA AÓRTICA.....	144
2.2. ESTUDIO PROTEÓMICO A PARTIR DE MUESTRAS DE TEJIDO HUMANO	144
2.2.1. ANÁLISIS DE LA VÁLVULA ESTENÓTICA MEDIANTE HISTOLOGÍA MOLECULAR	144
2.2.2. ESTUDIO DE PROTEÓMICA DIFERENCIAL DE TEJIDO VALVULAR	147
2.2.3. ESTUDIO PROTEÓMICO DIFERENCIAL UTILIZANDO TEJIDO VALVULAR PROCEDENTE DE INDIVIDUOS CON/SIN ATROSCLEROSIS CORONARIA	151
3. INTEGRACIÓN DE RESULTADOS	156
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	163
<u>ANEXO I: CURRICULUM VITAE</u>	189

ABREVIATURAS

2D-DIGE:	Electroforesis bidimensional diferencial en gel
2-DE:	Electroforesis bidimensional
6PGL:	6-fosfogluconolactona
6PGLasa:	6-fosfogluconolactonasa
ACP:	Análisis de componentes principales
ApoCII:	Apolipoproteína CII
ApoE:	Apolipoproteína E
APS:	Persulfato amónico
ATP:	Adenosín trifosfato
BSTFA:	N,O-Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida
BVA:	Análisis de variaciones biológicas
CFHR1:	Proteína 1 relacionada con el factor H del complemento
CHAPS:	[3-[(3-Colaamidopropil)dimetilamonio]-1 propanosulfonato]
CID:	Disociación inducida por colisión
DAB:	3,3'-diaminobencidina
DH:	Deshidrogenasa
DIA:	Análisis de diferencias dentro del gel
DIGE:	Electroforesis diferencial en gel
DMF:	Dimetilformamida anhidra
DTT:	Ditiotreitol
EAC:	Enfermedad arterial coronaria
EAD:	Estenosis aórtica degenerativa
ECD:	Disociación por captura de electrones
ECV:	Enfermedad cardiovascular
EDA:	Análisis de datos extendido

EI:	Impacto electrónico
ERS:	Estrés del retículo endoplasmático
ESI:	Ionización por electrospray
ETD:	Disociación por transferencia electrónica
ETT:	Ecocardiografía transtorácica
EVG:	Tinción para fibras elásticas Verhoeff's Van Gieson
FADH2:	Flavín adenín dinucleótido
FIBB:	Cadena β del fibrinógeno
FIBG:	Cadena γ del fibrinógeno
FXII:	Factor de coagulación XII
G6DH:	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
G6P:	Glucosa 6-fosfato
GC:	Cromatografía de gases
GC-MS:	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
GSH:	Glutación reducido
GSSG:	Glutación oxidado
H&E:	Tinción con Hematoxilina-eosina
HAPLN1:	Proteína 1 de unión entre hialuronán y proteoglicano
HDL:	Lipoproteínas de alta densidad
HIF-1:	Factor inducido por hipoxia 1
HPLC:	Cromatografía líquida de alta resolución
HRP:	Peroxidasa de rábano
HTA:	Hipertensión arterial
IA:	Insuficiencia aórtica
IAA:	Iodoacetamida
ICAM-1:	Molécula de adhesión intercelular-1
IEF:	Isoelectroenfoque
IgA:	Inmunoglobulina A
IgG:	Inmunoglobulina G

IHQ:	Inmunohistoquímica
IL-1 β :	Interleuquina 1 β
IMS:	Imágenes generadas por espectrometría de masas
IPG:	Gradiente de pH inmovilizado
IT:	Trampa de iones
ITIH4:	Cadena pesada H4 del inhibidor de la inter- α -tripsina
LC-MS/MS:	Cromatografía líquida conectada a espectrometría de masas en tándem.
LC:	Cromatografía líquida
LC-MS:	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
LDL:	Lipoproteínas de baja densidad
LPS:	Lipopolisacárido endotoxina bacteriana
m/z:	Masa /Carga
MALDI:	Ionización por desorción con láser asistida por matriz
MBP-1:	Proteína de unión al promotor de c-myc
min:	Minutos
MM:	Masa molecular
MMP:	Metaloproteinasa
MS/MS:	Espectrometría de masas en tándem
MS:	Espectrometría de masas
MSTFA:	N-metil-(trimetilsilil) trifluoroacetamida
MYL2:	Cadena ligera reguladora de la miosina 2
MYL3:	Cadena ligera de la miosina 3
NADH:	Nicotinamida adenina dinucleótido
ng:	Nanogramos
NMR:	Resonancia magnética nuclear
NZWR:	Conejo blanco de Nueva Zelanda
OCT:	Medio óptimo para corte a baja temperatura
oxLDL:	Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
p/v:	Porcentaje en peso/volumen

PBS:	Tampón fosfato salino
pI:	Punto isoeléctrico
PMF:	Huella peptídica
PMSF:	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
Q:	Cuadrupolo
QqQ:	Triple cuadrupolo
RF:	Radiofrecuencia
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
seg:	Segundos
SBP1:	Proteína de unión al selenio 1
SDS:	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE:	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
SRM:	Monitorización por reacción seleccionada
TEMED:	N,N,N',N',-51 tetrametiletilendiamina
TFA:	Ácido trifluoroacético
TGF- β :	Factor de crecimiento de transformación β
TMS:	Trimetilsilil
TMCS:	Trimethylchlorosilane
TNF- α :	Factor de necrosis tumoral α
TOF/TOF:	Tiempo de vuelo en tándem
TOF:	Tiempo de vuelo
TPM1:	Tropomiosina 1
v/v:	Porcentaje en volumen/volumen
VA:	Válvula aórtica
VCAM-1:	Molécula de adhesión de célula vascular-1
VCP:	Proteína que contiene valosin
VECs:	Células endoteliales valvulares
VEGF:	Factor de crecimiento de endotelio vascular
VI:	Ventrículo izquierdo

VICs:	Células intersticiales valvulares
VSMCs:	Células musculares lisas vasculares
WHHL:	Conejo Watanabe con hiperlipemia heredable
µg:	Microgramo
µl:	Microlitro
µm:	Micra

SUMMARY

1. MULTI-OMIC ANALYSIS OF DEGENERATIVE AORTIC STENOSIS: MOLECULAR PROCESSES DRIVING CALCIFICATION AND THE ROLE OF UNDERLYING ATHEROSCLEROSIS

1.1. INTRODUCTION

Aortic stenosis is characterized by an abnormal narrowing of the aortic valve (AV) opening, producing a blockage of the blood flow from the left ventricle into the aorta. Degenerative aortic stenosis (DAS) is the most common valvular disease in elder population and remains the main cause of aortic valve replacement in developed countries.

Traditionally, this disease had been considered as a consequence of the aging process of the valve. However, recent studies have provided evidence that inflammation plays a key role in the physiopathology of DAS, as well as classical cardiovascular risk factors such as hypertension, hypercholesterolemia, diabetes, smoking, age or sex. Besides, DAS lesion and atherome plaque share histopathological behaviours at initiation, which suggests a deep relationship of atherosclerosis and DAS.

We propose here a multi-omic analysis of DAS using, on one side, a rabbit animal model of the disease to decrease inherent variability of patients' analyses. On the other side, we have recruited human samples from transplants, aortic regurgitation (AR) and DAS patients to perform metabolomic and proteomic analyses. Besides, we have used a differential proteomic approach using AV tissue from these three different origins from patients with and without atherosclerosis, which has allowed us to deepen in the relationship between DAS and atherosclerosis.

1.2. AIM

The aim of this study was to perform a comprehensive study of the molecular mechanisms taking place in the AV during calcification. Furthermore, we sought to

deepen in the relationship between atherosclerosis and DAS, searching for similarities and divergences between both processes.

1.3. MATERIAL AND METHODS

1.3.1. ANIMAL MODEL OF DAS

Male New Zealand White rabbits were fed *ad libitum* with 1% cholesterol-enriched-diet + 50,000 IU vitamin D₂ for 12 weeks. Additionally, rabbits fed with normal rabbit chow were used as controls. The model was monitored through blood analysis and echocardiographic measures to secure an adequate disease development. After sacrificed, AVs were extracted, lysed and analyzed by 2D-DIGE. Histological analysis confirmed AV degeneration in treated animals.

1.3.2. MULTI-OMIC ANALYSIS OF HUMAN SAMPLES

1.3.2.1. Plasma analyses

Plasma samples from patients with DAS and patients with AR were analyzed using 2D-DIGE and GC-MS.

For the proteomic analysis, plasma from 6 DAS patients and 6 AR patients, as controls, were isolated. These samples were immunodepleted using the immunoaffinity column MARS-14 (Agilent technologies). Proteomic analysis of fractionated plasma was performed by 2D-DIGE, seeking to identify low dynamic range proteins involved in the disease process.

To perform the metabolomic analysis of plasma samples by GC-MS, acetonitrile was used to precipitate proteins. Then, supernatants were dried and derivatized prior to the injection in the mass spectrometer.

1.3.2.2. Tissue analyses

We performed two different approaches to characterize AV with DAS: molecular histology using MALDI-IMS and differential proteomics using 2D-DIGE.

Histological sections from 3 regions of a stenotic AV with increasing damage level were used in this experiment. Samples were delipidized, dried onto a vacuum chamber

and subjected to the spray procedure prior to the analysis using a MALDI-TOF spectrometer.

Finally, we performed two different 2D-DIGE experiments. In a first experiment, 2D-DIGE was used to analyze differences in stenotic valves and non-stenotic valves from AR patients. Additionally, a second experiment was performed using 6 different groups of valves: transplant, AR and DAS, with and without atherosclerosis in all cases. After statistical analysis (Student's T-test or ANOVA with Tukey correction, depending on the case), spots of interest were identified using MALDI-TOF/TOF analysis.

1.4. RESULTS AND DISCUSSION

1.4.1. ANIMAL MODEL OF DAS

The existence of DAS was assessed using transthoracic echocardiography, which shows higher transvalvular gradient and thickening of the AV in the rabbits with special diet (pathological group). Moreover, these animals have increased plasma levels of calcium, triglycerides and cholesterol.

After 2D-DIGE analysis, 15 spots with altered expression levels (average ratio >1.5 or <-1.5 and $p\text{-value} \leq 0.05$) were found altered. Eight spots, corresponding to 8 proteins, were identified using MALDI-TOF/TOF analysis. Among identified proteins, a cardiac-tissue specific subgroup of cytoskeleton proteins was found, which may be involved in the osteoblastic differentiation of VICs and in endothelial dysfunction. Besides, we have found proteins related to endoplasmic reticulum stress, hypoxia and inflammation.

1.4.2. MULTI-OMIC ANALYSIS OF HUMAN SAMPLES

1.4.2.1. Plasma analyses

Proteomic and metabolomic approaches and the subsequent integration of these data can provide interesting information of the altered pathways in the organism. Besides, as plasma is an accessible sample, differences found in this fluid are candidates with potential use as biomarkers of disease.

In the 2D-DIGE analysis, we have found 24 spots with differences in their expression (1.5-fold and $p\text{-value} \leq 0.05$). Twenty-one spots were identified, corresponding to 12 different proteins. After classification according to their function, main differences

found were associated to coagulation, lipid transport, inflammation and immune response processes.

The metabolomic study showed 19 altered metabolites, all of them increased in the DAS group. Changes pointed out alterations related to hypoxia, which implied adaptations in the energetic metabolism, but also to matrix remodeling, coagulation, oxidative stress and lipid metabolism.

All together, these results highlighted common altered processes in the plasma from DAS patients, such as coagulation, adaptation to hypoxia and lipid metabolism.

1.4.2.2. Tissue analyses

For MALDI-IMS experiment, 3 different regions from the same AV were analyzed. Consecutive sections were stained to localize elastic fibers, collagen, lipids, myofibroblasts and macrophages.

This methodology generates molecular profiles and two-dimensional ion density maps of peptide signals directly from the surface of the histological sections, which were submitted to unsupervised statistical analyses to check the existence of different molecular zones inside each region.

We found coincidences between regions found using histological techniques and the molecular regions defined by MALDI-IMS. Nevertheless, we have also found structures at a molecular level that may be involved in the development of the disease, which were not detectable using routine histological techniques.

Finally, two different 2D-DIGEs were performed. In the first study, we compared AV tissue from DAS patients and from AR patients. In this case, 32 spots were found differentially expressed (1.5-fold and $p\text{-value} \leq 0.05$). We identified 11 different proteins related to calcification, matrix remodeling, oxidative stress and immune response. After principal component analysis (PCA) and hierarchical clustering, AR valves were found to separate into two different groups according to atherosclerosis incidence.

Taking these results into account, a new study using AV from transplant, AR and DAS patients, with and without atherosclerosis in all cases, was designed. As expected, after

statistical analysis, the greater differences were found when comparing diseased valves (DAS and AR) with control valves from transplants. On the other hand, different patterns of expression exist between valves with and without atherosclerosis, with lower differences between groups when comparing patients with underlying atherosclerosis. The results of this study pointed out that atherosclerosis may induce equivalent molecular processes in the AV, independently of its level of affectation, probably via circulating factors.

1.5. CONCLUSIONS

The use of an animal model has allowed us to study DAS in this species in a controlled ambient, without differences due to external factors and cardiovascular risk factors. We have primarily identified alterations related to cytoskeleton, hypoxia and endoplasmic reticulum stress.

The combination of proteomic and metabolomic studies of human plasma from AR and DAS patients has shown major differences in coagulation and hypoxia adaptation. Besides, lipid transport and oxidative stress related molecules appear altered in both experiments.

Analysis using MALDI-IMS has allowed us to study the superficial peptides distribution of the AV tissue, showing better resolution than the one achieved using routine histological techniques.

Differences in calcification processes, oxidative stress, inflammation and immune response have also been found in the differential proteomic analysis of AV tissue from AR and DAS patients, according to plasma results.

In spite of the fact that the AV from AR patients is not calcified, many differences exist between these valves and AV from transplants, suggesting that this tissue is suffering activation of inflammatory processes although it is not apparently damaged. Furthermore, inflammation and immune response are more severe in valves from DAS patients, which also show many alterations related to matrix remodeling.

The presence of atherosclerosis affects the AV, leading to equivalent molecular processes in the valve and the arteries, even if the AV is apparently healthy.

INTRODUCCIÓN

1. LA VÁLVULA AÓRTICA. BIOLOGÍA Y FUNCIÓN

La válvula aórtica (VA), una de las cuatro válvulas del corazón, se encuentra situada en la raíz aórtica, entre el ventrículo izquierdo (VI) y la arteria aorta, regulando el flujo de sangre hacia la aorta durante la sístole e impidiendo su retorno hacia el ventrículo durante la diástole.

1.1. ESTRUCTURA DE LA VÁLVULA AÓRTICA

Está formada por tres valvas en forma de nido de golondrina, que se insertan en la unión ventrículo-arterial, y por una estructura que la aloja compuesta por un anillo (zona de inserción de los velos con forma de corona de tres picos), los senos de Valsalva (dilataciones entre la pared de la arteria aorta y las valvas semilunares de la válvula aórtica; en dos de estos senos se originan las arterias coronarias) y la unión sinotubular (cinturón distal rico en fibras elásticas que separa la raíz y la aorta ascendente), de forma que la disfunción de cualquiera de estas partes puede alterar la función de la VA (1, 2) (Figura I.1.).

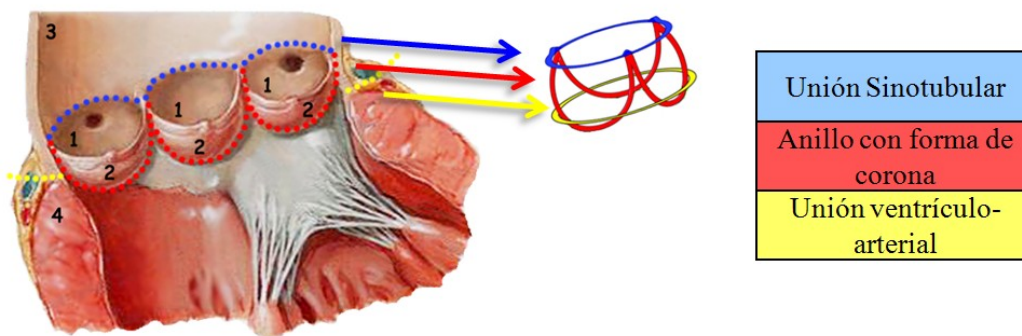


Figura I.1. La válvula aórtica. Estructura del arco aórtico en el que se observan los senos de Valsalva (1) y las valvas con forma de nido de golondrina (2). Toda la estructura se encuentra situada entre la arteria aorta (3) y el ventrículo izquierdo (4) (adaptado de Kasel y col. (3) y Piazza y col. (4)).

Histológicamente, las valvas de la VA están recubiertas de una capa de células endoteliales valvulares (VECs, *Valvular endothelial cells*) y consta de tres capas internas formadas por células intersticiales (VICs, *Valvular interstitial cells*), entre las que se pueden encontrar fibroblastos, células mesenquimales, células musculares lisas (menos de un 5%) y miofibroblastos (2, 5, 6) (Figura I.2.). Las tres capas que la componen son las siguientes:

- 1) Capa fibrosa: situada en el lado aórtico de la valva. Está compuesta por un centro denso de colágeno, responsable de la integridad mecánica de la válvula, y fibroblastos.
- 2) Capa esponjosa (*spongiosa*): porción central de tejido conectivo laxo formada por fibroblastos, células mesenquimales y matriz rica en polisacáridos. Además de proporcionar elasticidad y plasticidad al tejido, actúa como amortiguador reduciendo las vibraciones asociadas al cierre de la válvula.
- 3) Capa ventricular (*ventricularis*): situada en el lado ventricular de la valva, está constituida por tejido conjuntivo denso con muchas capas de fibras elásticas distribuidas radialmente.

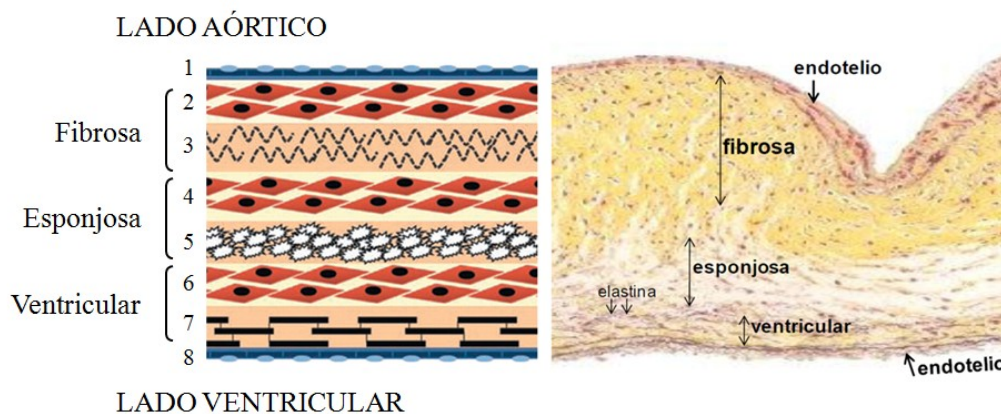


Figura I.2. Capas celulares de la válvula aórtica. A la izquierda representación esquemática de las capas: Endotelio formado por VECs (1 y 8); fibrosa, constituido por VICs (2) y colágeno (3); esponjosa, compuesta por VICs (4) y glucosaminoglicanos (5); y ventricular, con VICs (6) y fibras elásticas (7) (adaptado de (5)). A la derecha, tinción histológica de una sección de válvula aórtica (adaptado de Schoen y col. (7)).

Las VICs son las encargadas de producir y reparar la matriz extracelular secretando el colágeno, la elastina y los glucosaminoglicanos necesarios para mantener la fuerza y elasticidad de la válvula. Por su parte, las VECs presentan una importante función en el mantenimiento de la homeostasis de la sangre regulando la permeabilidad, la producción de sustancias anticoagulantes y antitrombogénicas, el flujo sanguíneo y la respuesta inmune, entre otras funciones (5).

1.2. FUNCIÓN DE LA VÁLVULA AÓRTICA

En condiciones normales, las valvas de la VA se acoplan perfectamente cuando se cierran en diástole y se abren totalmente en la sístole. La VA sólo se abre cuando la presión del VI es mayor que la de la aorta, de forma que la sangre es expulsada desde el VI hacia la aorta durante la sístole ventricular. Después de esta contracción, el VI se relaja mientras la presión disminuye gradualmente hasta estar por debajo de la presión de la aorta. En este momento, la VA se cierra, evitando que la sangre en la aorta vuelva al VI durante la diástole (8).

2. VALVULOPATÍAS AÓRTICAS: DIFERENCIAS ENTRE INSUFICIENCIA Y ESTENOSIS

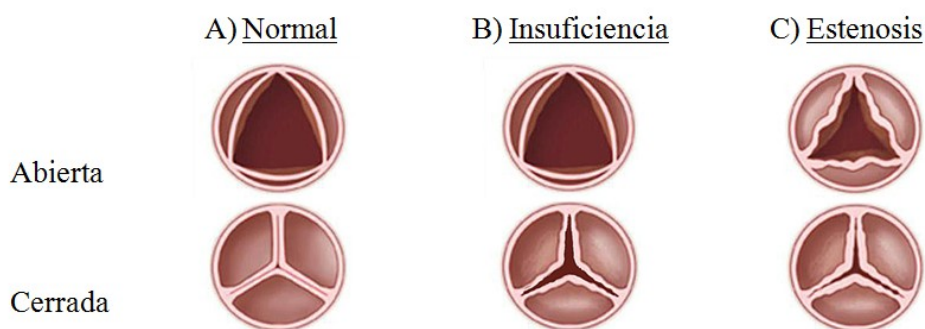


Figura I.3. Diferentes valvulopatías. Esquema representativo de una válvula normal (A) comparada con válvulas afectadas de IA (B) y EA (C).

Las valvulopatías son enfermedades de diversa etiología que afectan a una válvula cardíaca, ya sea morfológica o funcionalmente. La pérdida de integridad de la válvula puede producir una obstrucción del flujo sistólico sanguíneo hacia la aorta (estenosis),

una regurgitación hacia el ventrículo durante la diástole (insuficiencia) o bien una combinación de ambas (9).

En la **insuficiencia aórtica (IA)**, cuando la presión en el ventrículo izquierdo cae por debajo de la presión de la aorta, la válvula aórtica no es capaz de cerrarse completamente, ya sea debido a alteraciones del tejido valvular o de la pared aórtica (Figura I.3.B). Esto provoca un reflujo de sangre desde la aorta hacia el ventrículo izquierdo durante la diástole (regurgitación). Puede presentarse de forma aguda como consecuencia de una disección aórtica, endocarditis infecciosa o traumatismo torácico con rotura valvular, pero es poco habitual. De forma más frecuente, es una enfermedad de curso crónico debida a la dilatación de la raíz aórtica o a la presencia de válvula bicúspide, entre otras (10). La regurgitación aórtica genera una sobrecarga de volumen en el VI, con dilatación de la cavidad e hipertrofia excéntrica de la misma; el volumen de latido aumenta, lo que mantiene el gasto cardiaco anterógrado mientras se mantiene una función sistólica normal (11).

La **estenosis aórtica (EA)** se caracteriza por un impedimento en la apertura de la VA que provoca la obstrucción del flujo sanguíneo desde el ventrículo izquierdo hacia la aorta (Figura I.3.C). Es una enfermedad crónica que puede estar producida por malformaciones congénitas de la VA o aparecer a lo largo de la vida debido, entre otras causas, a la fiebre reumática o a la propia degeneración de la VA (12). Esta última, denominada EA degenerativa (EAD), es la causa más frecuente de valvulopatía en el individuo adulto (13). En el caso de la EA, el VI tiene que generar una mayor presión para vencer la sobrecarga causada por el estrechamiento de la VA y expulsar la sangre hacia la aorta. Al igual que en la IA, y a pesar de originarse por causas mecánicas opuestas, se produce un aumento de grosor del miocardio causando hipertrofia ventricular.

Con el tiempo, la hipertrofia y dilatación ventriculares dejan de ser efectivas como mecanismo compensatorio y pueden aparecer síntomas, como disnea de esfuerzo, angina de pecho, síncope y palpitaciones (14). En fases más avanzadas puede aparecer insuficiencia cardiaca franca. De hecho, en el 17% de los cuadros de insuficiencia cardíaca se encuentra presente una enfermedad valvular (15), siendo además uno de los principales factores predictivos de mortalidad en estos pacientes (16). Esto se debe, entre otras cosas, a que el flujo coronario no aumenta en proporción a la masa

miocárdica, lo que provoca que el tejido sufra una isquemia aunque el paciente no tenga obstrucción de las coronarias. Además, disminuye la contractibilidad del tejido debido a la propia dilatación y a una hiperplasia del tejido intersticial (17)

2.1. CALCIFICACIÓN DE LA VÁLVULA AÓRTICA: LA ESTENOSIS AÓRTICA DEGENERATIVA

La **estenosis aórtica degenerativa (EAD)** es la enfermedad valvular de mayor incidencia en la actualidad y, además, su prevalencia continúa en ascenso debido al progresivo envejecimiento de la población en países occidentales (18, 19). Es una enfermedad crónica que comienza con una etapa inicial de engrosamiento y rigidez de las valvas (esclerosis aórtica) hasta una estenosis severa y calcificada, presentando un largo período asintomático, lo que dificulta su diagnóstico de tal forma que cuando aparecen los síntomas, el paciente se encuentra en una etapa muy avanzada de la enfermedad. Habitualmente, la indicación de la sustitución valvular se determina cuando la EA es considerada como severa en presencia de síntomas como angina de pecho, síncope o disnea (20)

Las primeras descripciones sobre la EA calcificada fueron realizadas por Stokes en 1845 y Möckeberg en 1904. Stokes atribuía la calcificación a la endocarditis mientras que Möckeberg sugirió un proceso degenerativo debido al depósito pasivo de calcio sobre la válvula en individuos de edad avanzada. Durante años se ha considerado esta enfermedad una consecuencia inherente al proceso de envejecimiento de la VA. Sin embargo, en las últimas dos décadas numerosos estudios han profundizado en la histología de la VA y en los mecanismos celulares y moleculares que inician el desarrollo de la lesión. Actualmente, existen una gran variedad de estudios que apoyan la hipótesis de que se trata de una enfermedad con una base inflamatoria y que se encuentra relacionada con factores de riesgo cardiovasculares como la hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes, tabaquismo, edad o sexo (21, 22). La degeneración de la VA comienza con una disfunción endotelial del lado aórtico de la misma, en los puntos sometidos a mayor estrés hemodinámico, como consecuencia de los citados factores de riesgo. Esta disfunción conlleva un fenotipo pro-oxidante de las VECs y un aumento en la permeabilidad que favorece la acumulación de lipoproteínas de baja densidad en el espacio subendotelial de la valva, donde se oxidan (oxLDL), produciendo a su vez activación de las VECs.

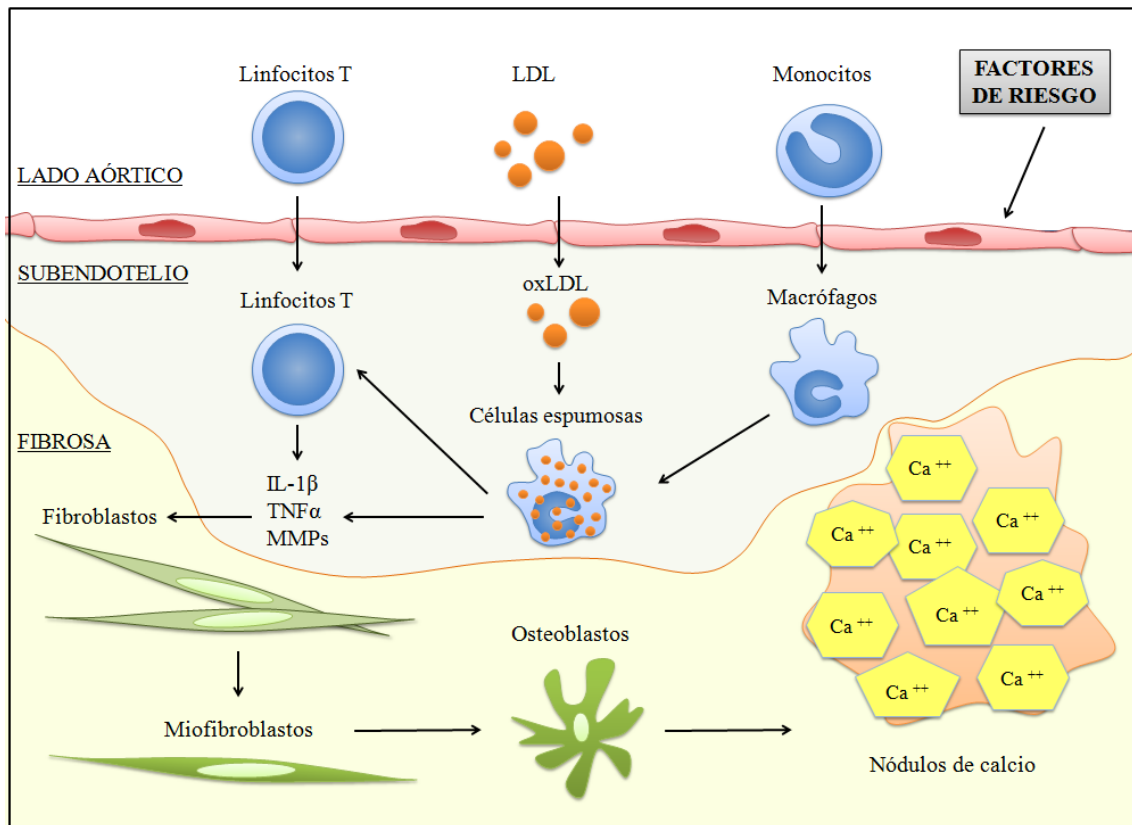


Figura I.4. Mecanismo de calcificación de la válvula aórtica. Esquema representativo donde: IL-1 β = interleuquina 1 β ; MMPs = metaloproteinasas de matriz; oxLDL = lipoproteínas de baja densidad oxidadas; TNF α = factor de necrosis tumoral alfa (adaptado de Freeman y Otto (23)).

Éstas expresan moléculas quimiotácticas y de adhesión tales como E-selectina, molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y molécula de adhesión de célula vascular-1 (VCAM-1) atrayendo a diversas células inflamatorias, como monocitos circulantes y linfocitos T a la capa fibrosa. Una vez allí, los monocitos se diferencian a macrófagos, captan las oxLDL y se transforman en células espumosas. Como consecuencia de la necrosis que sufren las células espumosas se liberan citoquinas y proteínas implicadas en la formación de hueso al medio intersticial, produciéndose la activación de los linfocitos T. Estos últimos liberan citoquinas y metaloproteinasas, degradando el colágeno, la elastina y los proteoglicanos que forman la matriz de la VA. Además, las citoquinas pro-inflamatorias liberadas por ambos tipos de células activan a las VICs de forma que se produce una diferenciación fenotípica de fibroblastos a miofibroblastos. En última instancia, un subgrupo de estos miofibroblastos se diferencian a osteoblastos, lo que conduce a la posterior formación de nódulos de calcio que inmovilizan las valvas y acentúan el grado de obstrucción (23-25) (Figura I.4).

El engrosamiento de la válvula con la consecuente hipoxia del tejido y la respuesta inflamatoria que tiene lugar durante el desarrollo de la enfermedad tienen asociado un efecto angiogénico. El aumento del factor de crecimiento de transformación β (TGF- β) así como el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), entre otros, conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos en las valvas de las VA calcificadas (26-28).

3. ESTENOSIS AÓRTICA Y ATEROSCLEROSIS

Este proceso de degeneración y calcificación presenta diversas similitudes con otra patología cardiovascular de gran prevalencia, la aterosclerosis, por lo que se piensa que ambas enfermedades están relacionadas. La aterosclerosis es una enfermedad que consiste en la acumulación de lípidos y material fibroso (placa de ateroma) en la pared de las arterias, ocasionando un estrechamiento progresivo del vaso y, consecuentemente, y una reducción del flujo sanguíneo. Al igual que en la EAD, el origen de la lesión se produce con una disfunción endotelial que favorece la infiltración de células inflamatorias así como la deposición de lípidos en la pared del vaso (29-31). También se ha descrito en ambas patologías la implicación de la osteopontina en los procesos de calcificación (32-34). Además, se ha visto que los factores de riesgo asociados a la progresión de la aterosclerosis como la edad, género, diabetes, colesterol, hipertensión y tabaquismo están implicados en el desarrollo de la EAD (35, 36).

Sin embargo, también hay que recalcar ciertas diferencias entre las dos patologías. Aunque se inician de manera similar, la VA presenta mucho menor número de células musculares lisas y una calcificación más acuciada debido al papel de las VICs (37). Además, la rigidez de VA y arteria, al ser estructuras funcionalmente tan dispares, provoca consecuencias opuestas. Por este motivo, las manifestaciones clínicas más severas se deben a causas diferentes. En el caso de la EAD, se producen debido al engrosamiento y calcificación de la válvula, que obstruye el flujo sanguíneo. Sin embargo, en el caso de la aterosclerosis es determinante la estabilidad de la placa de ateroma ya que en su interior contiene una gran cantidad de agentes protrombóticos (38). De hecho, la mayoría de los infartos de miocardio, que es la principal causa de muerte derivada de la aterosclerosis, se deben a la ruptura de una placa de ateroma en la coronaria (39). En este sentido, el calcio juega un papel importante en la aterosclerosis ya que está más relacionado con la estabilidad de la placa que con la obstrucción del flujo. La presencia de calcio se ha relacionado con una menor vulnerabilidad de la placa

y, por tanto, mayor protección frente a la ruptura de la misma (40, 41) aunque existe cierta controversia cuando se habla de microcalcificaciones (42). También se han realizado estudios en pacientes con EAD con estatinas, cuya eficacia en la enfermedad coronaria ha sido ampliamente demostrada, sin encontrarse ningún beneficio (43, 44). Además, sólo el 50% de los pacientes con EAD tienen aterosclerosis coronaria (algo acorde con su avanzada edad) mientras que la mayoría de los pacientes con aterosclerosis no presentan EAD. Esto resalta el hecho de que, aunque ambas patologías comparten factores de riesgo, deben existir factores adicionales que contribuyen al desarrollo de EAD (45).

4. MODELOS ANIMALES

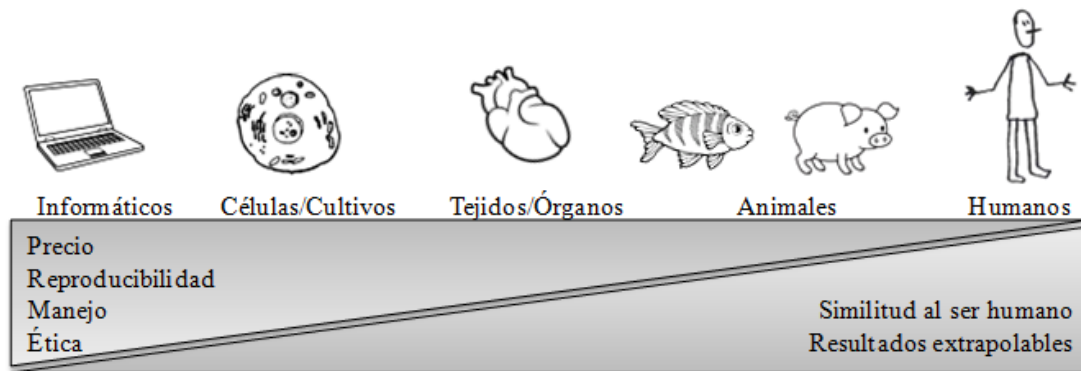


Figura I.5. Tipos de modelos utilizados en estudios biológicos. En esta figura podemos ver en orden creciente de complejidad los diferentes modelos utilizados en los estudios biológicos atendiendo al precio reproducibilidad, manejo, ética, similitud con el ser humano y extrapolación de resultados.

Se define un modelo experimental como cualquier sistema, lógico, físico o biológico, capaz de simular total o parcialmente el proceso que pretendemos estudiar. Dentro de los modelos biológicos existen, en orden creciente de complejidad, los modelos moleculares, celulares, tisulares y animales, situándose en la cúspide el humano a través de los ensayos clínicos (Figura I.5). Como norma general, cuanto más simple sea un modelo más fácil será su interpretación, pero más se alejará de la situación real. Es por eso que los estudios fisiopatológicos suelen comenzar en modelos moleculares y/o celulares sencillos, en cuyos resultados se basará la fase experimental posterior con modelos animales.

Los modelos animales presentan una serie de ventajas metodológicas respecto a la experimentación en humanos. Dado que podemos planificar en el tiempo todos los experimentos, es posible realizar las manipulaciones necesarias de forma simultánea a los distintos grupos de animales. Además, permite un mayor control del experimento ya que podemos controlar factores externos, como la dieta o las condiciones ambientales, e incluso factores genéticos en nuestros animales de experimentación. De hecho, podemos crear grupos experimentales que se diferencien en uno o varios rasgos genéticos o, por el contrario, trabajar con una muestra de individuos genéticamente idénticos (en el caso de trabajar con determinados animales como rata o ratón). Esto se traduce en un incremento en la reproducibilidad de los resultados respecto a los ensayos clínicos y, por lo tanto, una mayor facilidad en su interpretación. No obstante, la experimentación animal también presenta limitaciones, siendo la más importante las diferencias existentes entre humanos y animales, no solo a nivel anatómico sino también respondiendo de forma diferente a enfermedades y tratamientos farmacológicos. Por estos motivos, las conclusiones que se extraen de los estudios con modelos animales no son siempre extrapolables a una situación clínica real, aunque su uso ha contribuido de forma sustancial a la mejora del conocimiento de muchas enfermedades, permitiendo el desarrollo de técnicas diagnósticas y procedimientos preventivos y terapéuticos.

Actualmente la experimentación animal es un requisito legal encaminado a garantizar la seguridad antes de introducir nuevos fármacos y procedimientos en la clínica. Hay que tener en cuenta que siempre que se utilicen animales de experimentación, éstos deben mantenerse en óptimas condiciones, existiendo una normativa y unos procedimientos de regulación cuya finalidad es evitar el sufrimiento de los animales durante el desarrollo de los estudios experimentales (46, 47).

4.1. MODELOS ANIMALES Y EAD

Los modelos animales son una herramienta muy importante para estudiar el inicio y desarrollo de la EAD *in vivo*, así como para establecer la efectividad de las intervenciones terapéuticas. Las especies más utilizadas son el ratón y el conejo, debido en parte a su tamaño y manejabilidad. El mayor inconveniente del modelo de ratón es que su VA difiere a nivel histológico de la humana, al no presentar una estructura en capas (48). A cambio, tienen una alta tasa de reproducción y una vida media corta, lo que permite estudiar la historia natural de la enfermedad en un tiempo corto. Por otra

parte, son animales en los que la manipulación genética es relativamente sencilla, pudiendo trabajar con cepas controladas transgénicas o no (49-51). En el caso de los conejos es posible inducir la EAD mediante una hipercolesterolemia producida por la dieta, sin embargo, en el de los ratones, estos necesitan una predisposición genética para desarrollar la enfermedad. Por otro lado, también están los modelos porcinos, cuyo uso está bastante extendido para el estudio de la aterosclerosis debido a las similitudes existentes entre su sistema circulatorio y el humano. De hecho el metabolismo de sus lipoproteínas es muy similar al de humanos, lo que podría explicar que desarrollen aterosclerosis espontáneamente, de forma análoga a los humanos (52). Existen diferentes modelos de aterosclerosis inducida en cerdos, sin embargo, presentan un complicado manejo debido a su tamaño y un mantenimiento más caro, por lo que hasta la fecha se ha utilizado en pocos estudios de EAD (53, 54)

4.1.1. MODELOS EN CONEJO

En esta Tesis Doctoral hemos utilizado el conejo como modelo animal debido a que su válvula presenta tres capas como ocurre en el caso de la humana (55). Además, al tratarse de un animal de mayor tamaño que el ratón, ésta es más manejable y permite obtener un mayor rendimiento en estudios moleculares. Por otra parte, este animal comparte varios aspectos del metabolismo de las lipoproteínas con los humanos, como la composición de la apolipoproteína B, la producción de apolipoproteína B100 por el hígado y la alta tasa de absorción de colesterol de la dieta (56-58), lo que lo hace un modelo más extrapolable al humano en el estudio de la EAD. Sin embargo, el conejo no forma lesiones ateroscleróticas de forma espontánea, por lo que necesita altos niveles de colesterol y/o suplementos de vitamina D₂ para la inducción de una EAD moderada (59-61).

El modelo de conejo más utilizado para EAD es el conejo blanco de Nueva Zelanda (New Zealand White Rabbit, NZWR) con hipercolesterolemia inducida por la dieta, que puede ser: 1) con niveles variables de colesterol, 2) con niveles moderados de colesterol suplementado con vitamina D₂ o 3) sólo con vitamina D₂. En el primer caso, cuando se administran niveles bajos de colesterol en la dieta, no se aprecia calcificación hasta los 30 meses (55). Sin embargo, al elevar la dosis de colesterol, comienza a apreciarse cierta calcificación a las 12 semanas de tratamiento (59). Suplementando este tipo de dieta con vitamina D₂, se produce un desarrollo de la EAD a las 10-12 semanas, con

suficiente calcificación y engrosamiento para causar una disminución del área de apertura de la VA (61). Este modelo es el más habitual, ya que produce mayor grado de lesión y el desarrollo de ésta es más rápido que utilizando de forma individual el tratamiento con vitamina D₂ o la dieta rica en colesterol (60, 62)

Al igual que en roedores, también existen modelos en conejos que presentan alteraciones genéticas en el receptor de LDL y/o apolipoproteínas. Es el caso del conejo Watanabe con hiperlipemia heredable (Watanabe heritable hyperlipidemic, WHHL), que presenta un defecto en el receptor de LDL (63).

5. LA INVESTIGACIÓN A TRAVÉS DE LAS CIENCIAS –ÓMICAS

5.1. PROTEÓMICA

La secuenciación del genoma ha generado una gran cantidad de información y ha despertado el interés por el estudio directo de los productos codificados por los genes, es decir, las proteínas. En 1994, Wilkins acuñó el término proteoma, fusión de “proteína” y “genoma”, para referirse a la dotación completa de proteínas expresadas en un organismo o sistema biológico, incluyendo sus modificaciones, en un momento dado y unas condiciones determinadas (64). La Proteómica es, por tanto, la ciencia encargada de estudiar de manera dinámica el proteoma permitiendo identificar y clasificar a las proteínas con respecto a su función y a las interacciones que establecen entre ellas (65). Dado que las proteínas son el producto final de la expresión génica, la Proteómica constituye una poderosa herramienta para el estudio de sistemas biológicos, ya que el proteoma refleja un estado concreto del organismo y varía según su situación funcional (66).

Dentro de las múltiples aplicaciones que tiene en el campo de la Biomedicina, destacan los estudios de Proteómica de "Expresión Diferencial" para identificar alteraciones en los niveles de expresión debido a procesos fisiopatológicos o agentes externos. Su objetivo es definir qué proteínas están implicadas en esos procesos para facilitar la búsqueda de dianas farmacológicas y de biomarcadores diagnósticos. Los enfoques proteómicos clásicos para este fin se basan principalmente en el análisis comparativo de los perfiles proteicos de dos o más grupos diferentes (individuos sanos frente a patológicos, enfermos sometidos a distintos tratamientos etc.) mediante el uso combinado de la electroforesis bidimensional (2-DE) y la espectrometría de masas

(MS). Sin embargo, el desarrollo de nueva instrumentación analítica, especialmente en el ámbito de la MS con la aparición de espectrómetros cada vez más potentes, así como las mejoras en las técnicas de ionización suave, han multiplicado de forma espectacular el número de proteínas que pueden identificarse en una mezcla compleja y han dado lugar a la descripción de proteomas que no se conocían hasta el momento. Por otro lado, el avance de la bioinformática ha sido fundamental en este desarrollo, permitiendo una creciente capacidad para reunir, almacenar, procesar y visualizar la gran cantidad de datos que se generan en los estudios proteómicos.

5.1.1. MÉTODOS EMPLEADOS EN PROTEÓMICA

Debido a la gran variedad de técnicas y metodologías que existen dentro del campo de la Proteómica, es de vital importancia elegir la más apropiada en función del tipo de muestra, el diseño experimental y la finalidad del estudio. En general, los experimentos proteómicos pueden dividirse en tres etapas básicas:

- 1) Preparación de la muestra
- 2) Separación de proteínas
- 3) Análisis por MS e identificación de proteínas

Hay que tener en cuenta que todas las etapas del flujo de trabajo están relacionadas entre sí por lo que es importante que las técnicas usadas durante la preparación de la muestra sean compatibles con las utilizadas en la separación. Del mismo modo, la elección del tipo de análisis de MS debe ser determinada en función de la técnica de separación empleada.

5.1.1.1. Preparación de la muestra

Una adecuada obtención y preparación de la muestra es fundamental para que los estudios proteómicos sean fiables, de hecho podemos decir, sin exagerar, que es el paso crítico de los análisis proteómicos. En el caso de los estudios biomédicos, es común el análisis de tejido, células y fluidos biológicos. Dado que son muestras muy diferentes y que pueden provenir de distintos orígenes, es muy importante utilizar un protocolo adaptado, tanto a la muestra como al tipo de proteínas al que va dirigido (proteínas solubles, de membrana, etc.).

El primer paso de preparación de la muestra es la obtención/aislamiento del material biológico que vamos a necesitar. Hay que estandarizar el protocolo de obtención: tipo de tubos, uso o no de torniquete en extracciones de sangre, tiempo desde la obtención hasta el procesado, almacenamiento, etc. Para plasma, por ejemplo, las muestras de sangre deben ser procesadas rápidamente, pero para suero se debe proporcionar suficiente tiempo para la coagulación adecuada. Si utilizamos células es fundamental el lisado de las mismas (mediante métodos físicos o químicos) mientras que si analizamos tejido será necesario añadir un paso que permita su disgregación. Uno de los puntos críticos es la temperatura: la mayoría de los procedimientos deben realizarse a un máximo de 4°C con el objeto de reducir la actividad de las proteasas presentes en la muestra, cuya actividad podemos neutralizar además mediante el uso de inhibidores.

La eliminación de sustancias contaminantes que puedan interferir con análisis posteriores, o su dilución hasta límites tolerables por la metodología, es un paso imprescindible. Por ejemplo, la concentración de sales debe reducirse mediante diálisis o precipitación de las proteínas en muestras que vayan a ser analizadas mediante electroforesis bidimensional, ya que éstas impiden un correcto isoelectroenfoco de las proteínas debido a un aumento de la conductividad. Otros contaminantes, como los lípidos, forman complejos con proteínas de membrana disminuyendo su solubilidad. También es necesaria la eliminación de polisacáridos, ácidos nucleicos y cualquier otra sustancia que pueda provocar distorsiones en la separación e identificación de las proteínas.

La solubilización de las proteínas mediante su disociación y desnaturalización es un paso crítico para conseguir estudiar las proteínas de una mezcla compleja de forma individualizada. La desnaturalización se consigue con la adición de agentes caotrópicos, como la urea o la tiourea, al tampón de solubilización para romper los enlaces hidrofóbicos de las proteínas, así como las interacciones intramoleculares. Para impedir que se formen de nuevo las interacciones hidrofóbicas y mantener a las proteínas en solución se debe incluir un detergente como CHAPS, SDS o Tritón X-100. Una vez desnaturalizadas, las proteínas deben ser reducidas y alquiladas para evitar la formación de enlaces disulfuro entre los grupos tiol de las cisteínas y así prevenir su plegamiento. El ditiotreitól (DTT), β -mercaptoetanol y las fosfinas son los agentes reductores más utilizados mientras que la iodoacetamida, las vinilpiridinas o algunos derivados de la

acrilamida son agentes alquilantes habituales (67-70). Es importante que los compuestos utilizados sean compatibles con las técnicas proteómicas que se vayan a realizar más adelante.

Debido a que la solubilización genera habitualmente mezclas proteicas demasiado complejas que son muy difíciles de separar, con frecuencia se opta por el fraccionamiento previo a la separación de la muestra, lo que permite aumentar el número de identificaciones y mejorar la detección de proteínas presentes en menor concentración. Se pueden aislar y caracterizar orgánulos y otras estructuras subcelulares para reducir la complejidad respecto al extracto proteico completo (71). También se puede enriquecer la muestra en proteínas de interés mediante purificación por afinidad (72) o, por el contrario, utilizar anticuerpos específicos para eliminar o reducir la concentración de proteínas de gran abundancia que dificultan el estudio de las proteínas de interés, como suele hacerse en el caso de la albúmina sérica del plasma sanguíneo (73) y en el de otras proteínas de gran abundancia en la sangre.

5.1.1.2. Separación de proteínas

Como hemos visto, la mayoría de las muestras biológicas son mezclas complejas de proteínas por lo que es imprescindible el uso de una o varias técnicas de separación previas al análisis por MS, pudiendo utilizarse una combinación de varias técnicas de manera consecutiva. Existen diversas técnicas de separación basadas en diferentes propiedades como la electroforesis capilar, que permite separar las proteínas en función de su relación masa/carga, o el isoelectroenfoque en solución (*'off-gel'*) que lo hace según su punto isoelectrico (pI), pero las técnicas más habituales, y las utilizadas en esta Tesis Doctoral, son la electroforesis bidimensional (2-DE) y la cromatografía, principalmente la cromatografía líquida (LC) bidimensional.

1) Electroforesis bidimensional (2-DE)

La 2-DE es una técnica de separación de mezclas complejas de proteínas según su punto isoelectrico (pI) y su masa molecular (MM). Puede aplicarse a una gran variedad de muestras biológicas y, además, presenta una gran capacidad resolutive que se consigue mediante dos pasos electroforéticos consecutivos: 1) isoelectroenfoque (IEF) y 2) electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) (74, 75).

Durante el IEF, las proteínas de la muestra son separadas en un gradiente de pH gracias a la aplicación de un campo eléctrico (76). Dado que las proteínas son moléculas anfotéricas, tendrán carga positiva cuando se encuentren en regiones de pH inferiores a su punto isoeléctrico y carga negativa cuando estén en regiones de pH superiores. Esta característica hará que, al aplicar una diferencia de potencial, las proteínas se muevan por el gradiente hasta alcanzar la región donde el pH coincida con su pI, momento en el que la proteína tiene carga neta neutra y se detiene su movimiento. Actualmente, se utilizan tiras comerciales de acrilamida con gradiente inmovilizado de pH (IPG) que se hidratan mediante la utilización de un tampón de rehidratación. Es importante evitar en este paso reactivos que puedan modificar la carga neta de las proteínas como detergentes iónicos (SDS) o β -mercaptoetanol.

Antes de realizar la segunda dimensión, es necesario realizar un tratamiento de equilibrado de las tiras IPG (con la muestra ya enfocada) que le aportará el SDS necesario para la electroforesis, y en el que se provoca la disociación de los puentes disulfuro mediante reducción de los grupos tiol de las proteínas y se previene su re-oxidación mediante alquilación. La electroforesis SDS-PAGE se realiza según el protocolo descrito por Laemmli (77). La poliacrilamida empleada en la polimerización va a formar una red que ralentiza la migración de las proteínas de forma directamente proporcional a la MM de las mismas. Diferentes porcentajes de acrilamida puede utilizarse en función del rango de MM que queramos resolver.

Puesto que la separación del SDS-PAGE se realiza de forma perpendicular al isoelectroenfoco, el resultado es un mapa de proteínas con unas coordenadas x e y que, además, puede teñirse permitiendo la visualización de las manchas proteicas. Existen diferentes métodos de tinción con diferencias notables en relación a la sensibilidad, linealidad, homogeneidad y reproducibilidad a la hora de detectar las proteínas (78). Actualmente las más utilizadas son la tinción de plata (con alta sensibilidad pero baja linealidad), azul de Coomassie (con diferentes sensibilidades según el tipo de compuesto (79)) o tinciones fluorescentes como en *SYPRO Ruby* u *Oriole* (80). Los geles teñidos se escanean y digitalizan utilizando un escáner apropiado según sea una tinción colorimétrica o fluorescente. Esas imágenes se exportan a programas especializados, como *PDQuest* (Bio-Rad) o *SameSpots* (Nonlinear Dynamics), que permiten la detección y cuantificación de las manchas proteicas, así como el análisis estadístico, con

el objetivo de detectar perfiles de expresión característicos de los grupos de estudio y las diferencias entre ellos (81, 82). Las manchas proteicas de interés pueden escindir-se del gel para su posterior identificación por MS.

Una de las ventajas de esta metodología es la obtención de un mapa de proteínas intactas que proporciona información acerca de los cambios en los niveles de expresión proteica, isoformas o modificaciones postraduccionales. Sin embargo, es difícil estudiar ciertos grupos de proteínas como las muy alcalinas o las proteínas de membrana, que exigen una optimización de los pasos de la preparación de la muestra para poder ser analizadas (83).

Electroforesis bidimensional diferencial en gel (2D-DIGE)

Con el fin de incrementar la sensibilidad, reproducibilidad y fiabilidad del análisis de expresión diferencial utilizando 2-DE, se ha desarrollado una metodología basada en un marcaje covalente de las proteínas antes del IEF: la electroforesis bidimensional diferencial en gel (2D-DIGE) (84). Está basada en unas moléculas fluorescentes denominadas fluoróforos o fluorocromos que presentan la misma MM pero diferentes espectros de excitación y emisión, lo que permite su detección de manera independiente. Existen dos versiones comerciales de los fluoróforos: los de marcaje mínimo (tres fluorocromos: Cy2, Cy3 y Cy5) y los de marcaje a saturación para muestras escasas (dos fluorocromos: Cy3 y Cy5), con diferentes sensibilidades y mecanismos de unión a las proteínas. En el caso del marcaje mínimo, que es el que hemos usado en este trabajo, cada gel bidimensional puede contener tres muestras: dos pertenecientes a diferentes grupos del estudio y una tercera, llamada estándar interno, que contiene una mezcla a partes iguales de todas las muestras del análisis. Este estándar se marcará siempre con el fluorocromo Cy2 (según instrucciones de la casa comercial) y se incluirá en todos los geles, lo que nos permite realizar una cuantificación más precisa ya que ayuda a normalizar los resultados de cuantificación de las manchas proteicas, minimizando las posibles diferencias técnicas producidas durante toda la manipulación (85). Después, pueden digitalizarse las imágenes de los geles obteniendo una imagen de cada fluorocromo por separado empleando un escáner de fluorescencia y posteriormente importarlas a un programa específico, como *DeCyder* (GE Healthcare), donde se realiza un procesamiento de las mismas, además de un análisis estadístico y cuantitativo (86).

En resumen, la técnica 2D-DIGE permite una reducción en el número de geles empleados mejorando la reproducibilidad de los mismos. Además, al ser un método de fluorescencia, proporciona mayor sensibilidad y linealidad en el rango dinámico (87) y, al incluir el estándar interno, mejora la fiabilidad de la comparación entre geles (85).

2) *Cromatografía líquida (LC)*

La cromatografía líquida (LC) es una técnica de separación en la que los componentes de una mezcla compleja son separados en base a su diferente velocidad de desplazamiento al ser arrastrados por una fase móvil líquida a través de un lecho cromatográfico que contiene la fase estacionaria. Es una técnica que puede aplicarse a una gran variedad de moléculas, como péptidos o proteínas, para separarlas en función de sus propiedades físicas y/o químicas, existiendo diferentes tipos según el soporte cromatográfico que se utilice. Las más utilizadas son las de intercambio iónico, fase reversa, afinidad y exclusión molecular.

Esta metodología presenta una gran versatilidad ya que puede utilizarse como paso complementario a la 2-DE (88-90) o bien utilizarse varias columnas cromatográficas diferentes de forma consecutiva (91). Además, la LC puede acoplarse directamente a un espectrómetro de masas (LC-MS) mediante el empleo de una fuente de ionización tipo electrospray (ESI) (92).

5.1.1.3. Análisis por espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS) es un método analítico que utiliza el movimiento de iones en campos electromagnéticos para clasificarlos en función de su relación masa/carga (m/z). Se realiza con unos equipos llamados espectrómetros de masas que son capaces de ionizar las moléculas, separarlas según su m/z y detectarlas. Aunque el primer espectrómetro de masas fue desarrollado a principios del siglo XX, hasta la aparición de las primeras técnicas de ionización suave como el electrospray (ESI) (93) y la ionización por desorción con láser asistida por matriz (MALDI) (94) en la década de los 80, no se pudo aplicar la MS al estudio de biomoléculas como las proteínas. Esta técnica presenta una gran sensibilidad, con límites de detección de hasta attomoles (10^{-18} moles), y es muy versátil, permitiendo determinar la estructura de compuestos de múltiples tipos independientemente de su volatilidad, polaridad o estado (sólido, líquido

o gaseoso). Además, permite la medición exacta de la masa molecular de un analito, así como de los productos de su fragmentación enzimática o mecánica, con las que se lleva a cabo la identificación del mismo. En el campo de la Proteómica, los espectrómetros de masas se utilizan frecuentemente para identificar proteínas, detectar sus modificaciones covalentes y, en el caso de las proteínas recombinantes, para caracterizarlas y como control de calidad (95).

1) Estructura básica de un espectrómetro de masas

Los espectrómetros de masas están constituidos por tres elementos fundamentales que pueden combinarse entre sí, determinando las características del equipo en términos de resolución, velocidad, sensibilidad y exactitud en la medida de la masa (96, 97). Estos elementos son (Figura I.6):

- *Fuente de ionización*: convierte las moléculas en iones en fase gaseosa. En el caso de la Proteómica, los tipos de fuentes de ionización se basan en métodos de ionización suave, aptos para muestras no volátiles y térmicamente inestables, en los que la muestra se transforma directamente en iones gaseosos. Se utilizan de forma habitual la ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI) y la ionización por electrospray (ESI).
- *Analizador de masas*: separa los iones procedentes de la fuente aprovechando su diferencia de comportamiento dentro de un campo electromagnético debido a su diferente m/z . Además, debe ser capaz de enviar los iones separados al detector. Los analizadores de masas más comúnmente utilizados son el cuadrupolo o trampa lineal (Q, Quadrupole), el de tiempo de vuelo (TOF, *Time-Of-Flight*), la trampa iónica (IT, *Ion Trap*) o la trampa orbital (Orbitrap), y pueden emplearse tanto de manera individual como en tándem.
- *Detector*: Los detectores tienen como función detectar el flujo de iones que sale del analizador y convertir esa información en una señal eléctrica que se transmite a un ordenador, donde se registra en forma de un espectro de masas. Este espectro representa la abundancia relativa de los iones detectados respecto de su relación m/z y permite la identificación del compuesto. Posteriormente, estos datos pueden ser procesados y

presentados mediante un programa de tratamiento y análisis de datos. Las características más importantes que debe presentar un detector son sensibilidad, exactitud, resolución, tiempo de respuesta, estabilidad, amplio intervalo dinámico y un nivel de ruido bajo.

Es habitual el uso de espectrómetros de masas con dos analizadores separados por una celda de colisión, lo que se denomina espectrometría de masas en tándem o MS/MS. Las distintas combinaciones de fuentes de ionización y analizadores de masas utilizadas en el desarrollo de esta Tesis Doctoral se encuentran detalladas más adelante, en este mismo apartado.

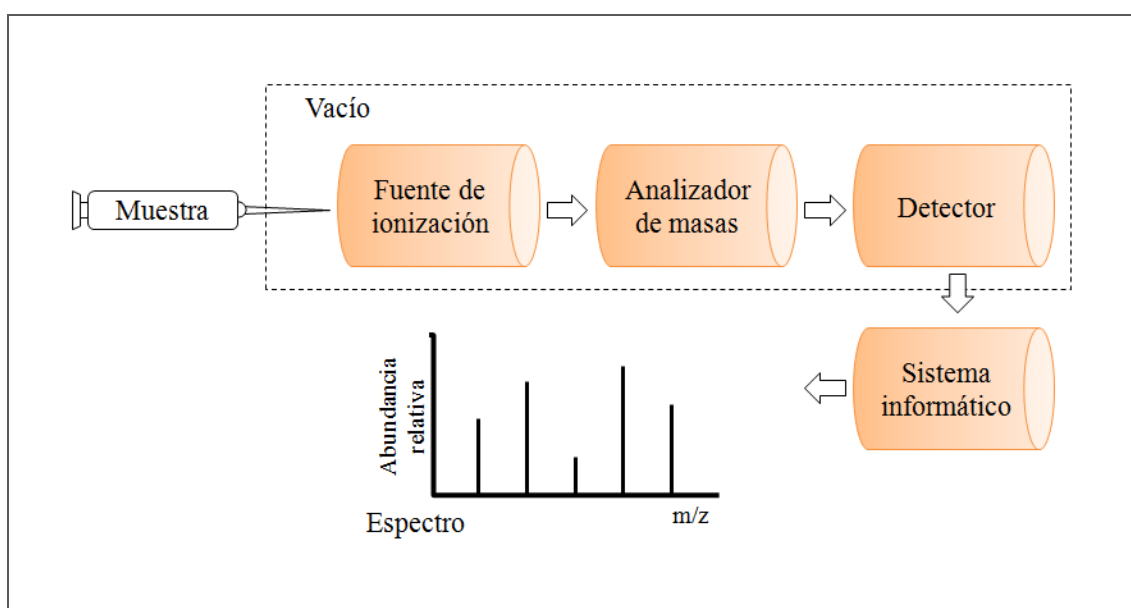


Figura I.6. Diferentes elementos de un espectrómetro de masas. Todo espectrómetro consta de las siguientes partes: sistema de introducción de muestras, sistema de vacío, fuente de ionización, analizador de masas y detector de iones.

2) Identificación de proteínas: huella peptídica y espectrometría de masas en tándem

Existen dos aproximaciones diferentes a la hora de identificar proteínas mediante MS.

La estrategia más sencilla se denomina **huella peptídica** (PMF, *peptide mass fingerprint*) y se basa la identificación de una proteínas mediante la detección de las masas de los péptidos obtenidos tras una digestión enzimática. La digestión se lleva a cabo antes de la ionización de la muestra, siendo lo más habitual el uso de la enzima

tripsina debido a que corta específicamente en el extremo C-terminal de los residuos de lisina y arginina. Tras el análisis en el espectrómetro, se compara, mediante un motor de búsqueda, el espectro obtenido con los espectros teóricos de una base de datos que contiene las digestiones teóricas de todas las proteínas descritas. De esta forma, obtenemos un listado de las posibles proteínas ordenadas según su mayor correlación con el espectro, lo que se corresponde con un mayor valor de significación. Este tipo de identificación suele utilizarse en el caso de mezclas de baja complejidad como manchas proteicas de geles 2-DE o bandas de geles 1-DE y fracciones cromatográficas sencillas.

Sin embargo, cuando tenemos mezclas complejas o queremos confirmar una identificación obtenida por PMF, se necesita más información que la que se obtiene del espectro de masas de los péptidos detectados de la proteína a identificar. Para ello se utilizan espectrómetros de masas con dos analizadores separados por una celda de colisión, lo que se denomina **espectrometría de masas en tándem** o MS/MS. En el primer analizador se genera el espectro de masas de la proteína y se seleccionan o miden los valores m/z de los péptidos intactos ionizados (ión precursor). Los péptidos seleccionados pasan a la celda de colisión, que normalmente está presurizada con un gas inerte, y colisionan con las moléculas neutras del gas lo que provoca la fragmentación del ión precursor en pequeños fragmentos cargados (iones producto). Este proceso se denomina disociación inducida por colisión (CID). Existen dos nuevos métodos de fragmentación basados en la transferencia de electrones a los iones presentes en la cámara de colisión denominados disociación por captura de electrones (ECD) y disociación por transferencia de electrones (ETD). Los iones producto entran en el segundo analizador donde se genera un nuevo espectro de masas denominado espectro de fragmentación. Este espectro es característico de cada péptido, lo que permite realizar la identificación de la proteína completa e incluso la secuenciación total o parcial del péptido.

La interpretación de los espectros de masas constituye una parte fundamental de esta metodología. Debido a la cantidad de información que se genera, se necesita un sistema informático para el control del equipo. Sin embargo, aunque existen programas que realizan la interpretación de los espectros, en esta fase del trabajo, la experiencia del espectrometrista es fundamental. De hecho, pese a la capacidad de procesamiento de

datos que proporciona actualmente la informática, el chequeo manual e integración de los resultados obtenidos es una práctica muy recomendable.

3) *Espectrómetros y métodos utilizados en esta Tesis Doctoral*

Durante el desarrollo de este trabajo se han empleado dos espectrómetros de masas diferentes para los análisis proteómicos: 1) MALDI-TOF/TOF para la identificación de proteínas de interés encontradas durante los estudios de expresión diferencial y 2) ESI-triple cuadrupolo (QqQ) para la cuantificación dirigida de proteínas previamente identificadas mediante monitorización por reacción de selección (SRM, *selected reaction monitoring*).

Identificación de proteínas mediante MALDI-TOF/TOF

Está formado por una fuente de ionización MALDI y dos analizadores tipo TOF, separados por una cámara de colisión (Figura I.7).

En el caso de la ionización MALDI, el analito se mezcla con un compuesto aromático (denominado matriz) en presencia de un disolvente orgánico sobre una superficie metálica, de forma que ambas co-cristalizan al evaporarse el solvente. Estos cristales se someten a pulsos cortos de láser ultravioleta en condiciones de alto vacío, lo que produce que la absorción de energía por parte de la matriz sea convertida en energía de excitación, transfiriéndose un protón a la muestra. Además, el aumento de energía conlleva una rápida sublimación de la muestra de forma que el analito queda ionizado y en fase gaseosa. La acción de un campo eléctrico (20-25kV) produce el movimiento de los iones del analito hacia el analizador de masas.

En los analizadores tipo TOF se mide el tiempo que necesitan los iones acelerados por un campo eléctrico para recorrer un tubo de vuelo, cuya longitud depende de las características del instrumento, sometidos a un vacío y en ausencia de campo eléctrico y/o magnético. La velocidad que alcanzan los iones será directamente proporcional a su m/z y, por lo tanto, el tiempo de vuelo será inversamente proporcional a este cociente. Algunos analizadores TOF incluyen un espejo electrostático, denominado reflector, al fondo del tubo para aumentar la longitud del tubo de vuelo y, por tanto, la resolución del equipo. Al tener dos analizadores en tándem, todos los péptidos son analizados en el primer TOF, pero solo los seleccionados pasan a la celda de colisión, donde se

fragmentan. Los iones así generados entran en el segundo TOF, generándose el espectro de fragmentación.

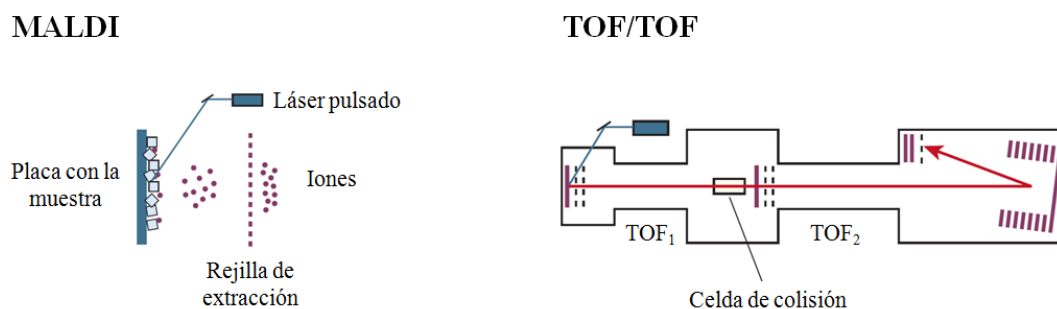


Figura I.7. Espectrómetro de masa MALDI-TOF/TOF. Este equipo consta de una fuente de ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI) y analizador tipo tiempo de vuelo/tiempo de vuelo (TOF/TOF). El cálculo de la m/z del analito se basa en el tiempo que necesitan los mismos para recorrer el tubo de vuelo. B) Fuente de ionización por electrospray (ESI) y analizador triple cuadrupolo (QqQ). Adaptado de Aebersold y col. (96)

Es habitual la utilización de equipo MALDI-TOF/TOF para el análisis de biomoléculas ya que permite analizar un amplio intervalo de masas de forma rápida, con espectros sencillos y buena sensibilidad para la detección de péptidos. Sin embargo, presentan una baja reproducibilidad debido a la dificultad para controlar el proceso de cristalización y la producción de iones, así como una baja resolución para la determinación de las masas, por lo que suele utilizarse para la identificación de mezclas de baja complejidad como manchas proteicas de geles 2-DE o bandas de geles 1-DE y fracciones cromatográficas sencillas (97).

Validación mediante monitorización por reacción de selección usando ESI-QqQ

El equipo usado en este caso consta de una fuente de ionización ESI y un analizador de tipo triple cuadrupolo (QqQ), el cual está compuesto por tres analizadores tipo Q en tándem (Figura I.8).

En este tipo de ionización, la muestra se disuelve en un tampón volátil y ácido, y se pasa por un fino capilar metálico que está sometido a un alto voltaje y a una corriente de gas a alta temperatura. A la salida del capilar, debido a la repulsión de las cargas eléctricas, la solución se dispersa en forma de aerosol, con pequeñas gotas altamente cargadas que se evaporan rápidamente. Cuando se ha eliminado todo el solvente, quedan los analitos

ionizados y en fase gaseosa, lo que provoca que sean acelerados por el campo eléctrico hacia el analizador de masas. El ESI tiene la ventaja de que puede acoplarse directamente a cromatografía líquida y electroforesis capilar. Además, permite el análisis de un amplio rango de pesos moleculares y presenta una gran sensibilidad.

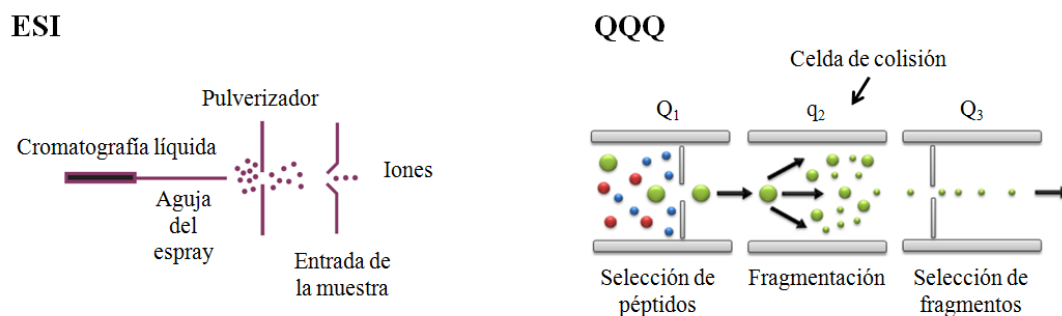


Figura I.8. Espectrómetro de masa ESI-QQQ. Este equipo consta de una fuente de ionización por electrospray (ESI) y analizador triple cuadrupolo (QqQ). En los experimentos de SRM, los iones de interés son seleccionados en el cuadrupolo 1 (Q1) y fragmentados en el cuadrupolo 2 (q2). A continuación, se separan los fragmentos en el cuadrupolo 3 (Q3), donde se mide su relación m/z . Adaptado de Aebersold y col. (96)

Los analizadores tipo Q están formados por cuatro barras metálicas con campos eléctricos opuestos dos a dos. A cada par de varillas se les aplica un potencial de corriente continua y otro de radiofrecuencia (RF). Al aplicar un voltaje de RF variable, se produce el movimiento de los iones en función de su m/z , actuando el cuadrupolo como un filtro: solo un determinado ión de m/z concreta tendrá una trayectoria estable y llegará al detector.

En el QqQ, el cuadrupolo 1 (Q1) y el cuadrupolo 3 (Q3) funcionan como analizadores mientras que el cuadrupolo 2 (q2) funciona como celda de colisión. Los iones de interés son seleccionados en el Q1 y fragmentados en el q2. En el Q3 se separan los fragmentos y se mide su relación m/z . De esta forma, tenemos dos selecciones de masa/carga: una para el péptido intacto o precursor (m/z 1) y otra para los fragmentos de ese péptido o transiciones (m/z 2), pudiendo medir múltiples transiciones en un único método. Este método de análisis se denomina monitorización por reacción de selección (SRM, *selected reaction monitoring*) y nos proporciona una forma de cuantificación, y a su vez de validación, única, ya que no vamos a detectar una mezcla de compuestos, sino que sólo observaremos nuestro compuesto de estudio, de modo específico y dirigido (98,

99). Además, permite obtener espectros de masas altamente selectivos, con gran sensibilidad.

5.1.2. HISTOLOGÍA MOLECULAR: IMÁGENES USANDO MALDI-MS

Uno de los últimos avances en el campo de la Proteómica es la posibilidad de estudiar la distribución de proteínas o moléculas pequeñas directamente sobre el tejido mediante el uso de imágenes generadas por MS (MALDI-IMS, MALDI *imaging mass spectrometry*). En este caso, la ionización se produce directamente sobre una sección histológica recubierta de matriz y colocada sobre un portaobjetos especial, de manera que los espectros de masas se registran de forma secuencial cuando el laser rastrea toda la superficie del tejido (100). De este modo, proteínas, péptidos y metabolitos pueden medirse sin perder información espacial, siempre que se mantenga la integridad química y estructural de la muestra durante su preparación, por lo que el protocolo que se emplee debe evitar la deslocalización y degradación de los analitos (101). Para ello, es muy importante el manejo de la muestra desde su obtención y en los pasos posteriores como el corte, la transferencia de la sección a la placa de MALDI, la aplicación de la matriz y el almacenaje posterior del tejido (102). Lo más recomendable es el uso de secciones de tejido fresco, sin embargo, a veces es necesario incluir la muestra en gelatina o agarosa para facilitar los cortes en el criostato (103-105). Para obtener la mayor información posible, es conveniente realizar una comparación de las imágenes obtenidas de cortes sometidos a tinciones tradicionales mediante microscopia óptica, con las imágenes obtenidas por MS (106). Esto suele realizarse utilizando secciones adyacentes: una para histología y la siguiente para IMS. Sin embargo, en algunos tejidos es difícil relacionar visualmente los dos cortes debido a diferencias en la arquitectura del tejido. Para solventar ese problema, lo más conveniente es poder realizar la histología y el perfil proteico sobre la misma sección. Esto ha motivado el estudio de la compatibilidad entre las tinciones histológicas habituales con el MALDI-IMS encontrándose que el violeta de cresilo y el azul de metileno, entre otros, no comprometen la calidad de los espectros de masas (106). Por otro lado, la realización de estas tinciones supone una mayor manipulación del tejido, lo que conlleva un mayor riesgo de degradación proteica y alteraciones de la muestra.

El MALDI-IMS permite el estudio del tejido completo manteniendo su estructura y focalizar el análisis de MS a regiones morfológicas de interés.

5.2. METABOLÓMICA

De forma análoga a la Proteómica, la Metabolómica es la ciencia que estudia el metaboloma de una muestra biológica, definiéndose el metaboloma como el conjunto de productos finales y subproductos de las diferentes vías metabólicas que existen en los seres humanos y otros sistemas vivos (107, 108). Los metabolitos pueden ser sintetizados de forma endógena, lo que se estima que ocurre con más de 2.000 metabolitos diferentes, o incorporados desde el exterior con la dieta, como en el caso de las vitaminas (109, 110). Dado que el metaboloma se ve influido tanto por factores internos como externos, es un indicador directo del estado del organismo y de su actividad bioquímica en un momento determinado. En el transcurso de un análisis metabolómico de muestras biológicas humanas es necesario tener en cuenta que los niveles de muchos metabolitos pueden verse afectados por factores individuales tales como la edad, sexo, dieta, nivel de actividad, y la medicación (111).

Diferentes aproximaciones metabolómicas son necesarias para cubrir la amplia variedad de metabolitos existentes. La resonancia magnética nuclear (NMR) y la MS, esta última acoplada a un método de separación como la cromatografía líquida o de gases (LC-MS o GC-MS), son las principales plataformas utilizadas en metabolómica. Afortunadamente, los grandes avances tecnológicos experimentados por la MS y la NMR posibilitan el análisis de metabolitos con propiedades químicas (polaridad, solubilidad, volatilidad, etc.) muy diferentes. Esto facilita a los investigadores la identificación de posibles biomarcadores y proporciona una mejor comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a un cambio fisiológico. Además, permite a los clínicos medir las moléculas de interés con fines diagnósticos.

5.2.1. MÉTODOS UTILIZADOS EN METABOLÓMICA

Los análisis metabolómicos pueden dividirse en dos tipos, dirigidos o no dirigidos, que básicamente se diferencian en la sensibilidad y el número de metabolitos detectados. Los estudios no dirigidos, denominados de huella dactilar metabólica, persiguen la identificación de tantos metabolitos como sea posible con el fin de clasificar los fenotipos asociados a un estado concreto, por ejemplo en el estudio de una enfermedad o para evaluar un tratamiento (112). Son los más adecuados para el descubrimiento de nuevos biomarcadores pero la sensibilidad se ve severamente afectada. Por otro lado,

los estudios metabolómicos dirigidos o de perfil metabolómico, se limitan al estudio de un conjunto predeterminado de metabolitos relacionados con una vía metabólica específica (113, 114). En este enfoque, los metabolitos diana se seleccionan de antemano, lo que es de gran ayuda a la hora de escoger el mejor método para su extracción y medición posterior. En este caso, se mejoran mucho los límites de detección a cambio de limitar el número de moléculas analizadas.

De manera similar a lo relatado anteriormente para la Proteómica, un experimento metabolómico consta normalmente de tres partes:

- 1) Preparación de la muestra
- 2) Separación y detección de los metabolitos
- 3) Análisis de datos e identificación de los metabolitos

Al igual que los experimentos proteómicos, es muy importante definir el experimento en función del tipo de muestra y la finalidad del experimento.

5.2.1.1. Preparación de la muestra

La preparación de la muestra para estudios metabolómicos es fundamental ya que el número de metabolitos analizables y la calidad de los datos obtenidos dependen de ello. La naturaleza de los análisis metabolómicos requiere que se mantenga la integridad de un gran número de metabolitos muy variables en concentración y propiedades químicas. Existen diferentes protocolos adaptados al tipo y cantidad de muestra disponible, rango dinámico de los analitos, plataformas que se van a emplear en el análisis y, por supuesto, características del metaboloma que se quiere analizar. Sin embargo, existen unas directrices generales que son comunes a todos los procedimientos. De forma general, se debe mantener la integridad de la muestra durante su obtención, almacenaje y procesado para evitar cambios metabólicos indeseados. Para ello, es recomendable seleccionar el protocolo más rápido y simple para disminuir la pérdida y/o degradación de los metabolitos (115, 116). Además, el procesado debe llevarse a cabo a baja temperatura e incorporar un paso que inhiba el metabolismo para que el estudio sea representativo del momento en el que se toma la muestra. La preparación de la muestra también implica un paso de extracción de metabolitos, que debe ser optimizado para obtener el mayor número y cantidad posible así como mejorar la reproducibilidad. Los

métodos más comunes para metabolitos polares incluyen solventes, ultrafiltración o temperatura para bloquear las actividades enzimáticas a la vez que minimizan la extracción de biomoléculas complejas: lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos (117). Para metabolitos poco polares, como glicerolípidos, esfingolípidos y colesterol, la extracción puede realizarse con solventes apolares como cloroformo (118). Si es necesario utilizar algún reactivo durante la preparación de la muestra que interfiera con el análisis y detección posteriores, se puede añadir un paso de limpieza *a posteriori* y previa al análisis para eliminarla, pero lo ideal es evitarlo para reducir al máximo la pérdida de analitos que podría suponer este paso (117).

5.2.1.2. Separación y detección de metabolitos

Una vez preparada la muestra, hay que llevar a cabo la separación y el análisis del conjunto de metabolitos que la componen. Las aproximaciones más empleadas son la NMR y la MS, esta última acoplada a un método de separación como LC o cromatografía de gases (GC) (119, 120). La plataforma empleada va a depender de las características físico-químicas de los metabolitos de interés. Cada una presenta una serie de ventajas e inconvenientes en el análisis de los diferentes compuestos por lo que el uso combinado de ambas es muy recomendable. La tabla I.1. muestra las principales ventajas e inconvenientes de cada metodología.

La NMR es una técnica de análisis espectroscópico utilizada para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones y/o neutrones, basada en que éstos presentan espín magnético, es decir, son magnéticamente activos (121). La NMR solo necesita una preparación mínima de la muestra, es muy reproducible y proporciona información estructural de los metabolitos, por lo que es especialmente útil para la identificación de nuevos metabolitos (122). También permite cuantificar la concentración de las distintas moléculas presentes en una mezcla. Sin embargo, la MNR presenta baja sensibilidad y resolución espectral, por lo que no es adecuada para la identificación de metabolitos que se encuentran a baja concentración (123).

Dentro de la cromatografía acoplada a MS, las dos principales estrategias para la separación de metabolitos son la LC, para compuestos no volátiles en solución, y la GC, para compuestos volátiles. La LC presenta una mayor versatilidad que la GC, sin embargo, la GC tiene mayor resolución y tiempos de retención más reproducibles.

Además, el patrón de fragmentación también es más reproducible, lo que ha dado lugar a la creación de bibliotecas de espectros de masas que facilitan la labor de identificación de los metabolitos que componen la mezcla. Sin embargo, la GC-MS abarca un rango de masa limitado y el ion molecular a menudo no se detecta debido a la fragmentación, lo que dificulta la identificación de compuestos desconocidos.

VENTAJAS	PLATAFORMA	DESVENTAJAS
Mínima preparación de la muestra No destruye la muestra Reproducibilidad Información estructural	NMR	Sensibilidad Resolución
No necesita derivatización Variedad de metabolitos	LC-MS	No existen buenas bibliotecas de espectros
Sensibilidad Reproducibilidad Bibliotecas de espectros	GC-MS	Requiere derivatización Rango de masa limitado

Tabla I.1. Principales ventajas e inconvenientes de tres de las metodologías empleadas en Metabolómica.

Dado que la GC-MS ha sido la técnica de elección para el análisis metabolómico en esta Tesis Doctoral, se explica con más detalle en el siguiente apartado.

1) Métodos utilizados en esta Tesis Doctoral: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Del mismo modo que en los estudios proteómicos, la MS utiliza el valor m/z para identificar metabolitos. Una explicación más detallada sobre la MS puede encontrarse en el apartado “5.1.1.3. Análisis por espectrometría de masas”.

Una buena separación cromatográfica antes del análisis por MS es fundamental para reducir la complejidad de la muestra y mejorar la resolución, evitando que los picos cromatográficos de los diferentes metabolitos puedan solapar y permitiendo el análisis de un elevado número de metabolitos con una gran sensibilidad. La **GC-MS** es una plataforma ampliamente usada para el análisis de compuestos volátiles tales como ácidos grasos y ácidos orgánicos (124). Debido a que la separación en GC se produce en función de los diferentes puntos de ebullición de los compuestos presentes en la mezcla, es necesario que los metabolitos a separar sean volátiles y estables térmicamente. Por

eso, los metabolitos volátiles y de bajo peso molecular puede analizarse directamente, como en el caso del análisis de aire exhalado para la búsqueda de biomarcadores de enfermedad (125). Sin embargo, en la mayoría de los casos, los metabolitos son sensibles a la temperatura necesaria para su separación, o no son volátiles en el intervalo de temperaturas que permite utilizar el analizador. En estos casos, es necesario realizar un paso previo al análisis denominado derivatización que lo que hace es transformar un compuesto en un producto de estructura química similar pero con propiedades químicas diferentes, para aumentar así el número de metabolitos detectables utilizando métodos basados en la GC. La derivatización puede realizarse en un único paso mediante sililación, aunque lo más habitual es el uso de un paso de oximación previo a la sililación para disminuir el número de productos secundarios que darán lugar a análisis cualitativos y cuantitativos erróneos (126). Entre los reactivos de derivatización más utilizados se encuentran el BSTFA (N,O-Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida) y el MSTFA (N-metil-(trimetilsilil) trifluoroacetamida) (115, 127, 128).

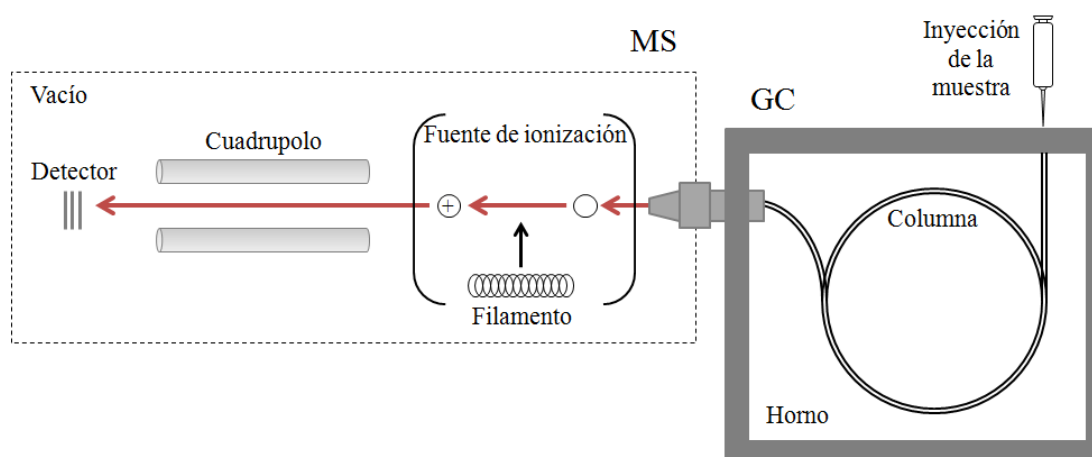


Figura I.9. Esquema de la estructura de un GC-MS. Tras ser inyectada, la muestra pasa a un horno donde se encuentra la columna y de ahí a la fuente de ionización, donde se generan iones positivos por impacto electrónico. Los iones pasan al analizador de masas, que en este caso es un cuadrupolo, y por último llegan al detector.

La muestra se inyecta en el GC que consta de un horno en el que se encuentra la columna (Figura I.9). Mediante la programación de una rampa de temperatura se consigue que los metabolitos pasen de forma escalonada al MS en función de su punto de ebullición. En este caso, dado que se trata de moléculas pequeñas que tras su separación cromatográfica se encuentran en estado gaseoso, se emplea un tipo de ionización denominado ionización por impacto electrónico (EI, *electronic impact*). Las

moléculas son golpeadas por un haz de electrones de alta energía generado en un filamento metálico calentado a altas temperaturas y se convierten en iones positivos. Este impacto puede dar lugar simplemente a la generación de un ion positivo o bien a una ruptura en fragmentos más pequeños, a su vez cargados positivamente. Todos estos fragmentos pasan al analizador de masas, que en este caso se trata de un cuadrupolo (ver apartado “5.1.1.3. Análisis por espectrometría de masas”). Por último, el detector registra todos los iones según su relación m/z y los cuantifica según su abundancia relativa, dando lugar al espectro de masas de cada metabolito ionizado.

5.2.1.3. Análisis de datos

El análisis metabolómico de una muestra genera grandes cantidades de datos en bruto que requieren un importante procesamiento previo. Existen una gran variedad de programas informáticos diseñados para facilitar y automatizar el análisis de estos datos mediante la eliminación del ruido, detección de los picos correspondientes a la señal, la normalización y la comparación de múltiples conjuntos de datos mediante una correcta alineación de las señales (129-133). Otra dificultad de la Metabolómica es la identificación de los metabolitos de un modo automático, debido a la falta de bases de datos completas y la complejidad química de muchos de los metabolitos aunque actualmente, existen bases de datos que incluyen un gran número de compuestos (134).

6. BIOLOGÍA DE SISTEMAS E INTEGRACIÓN DE RESULTADOS

El sistema cardiovascular interacciona con todos los componentes del organismo y, además, las enfermedades cardiovasculares (ECV), incluyendo la EAD, son enfermedades multifactoriales. Por este motivo, estudiar por separado los diferentes mecanismos que afectan a genes, proteínas o metabolitos no es suficiente para explicar los procesos fisiológicos y patológicos que se dan en este sistema. La integración de los resultados de las -ómicas a través de la biología de sistemas es esencial para identificar redes de metabolitos y proteínas asociados a un proceso biológico. En el caso de la EAD, se han descrito interacciones entre múltiples tipos celulares (células intersticiales, macrófagos, linfocitos, células endoteliales, etc.) con multitud de proteínas interconectadas que se expresan de forma variable en los diferentes componentes. Normalmente esas redes se deducen de publicaciones previas tras una exhaustiva búsqueda bibliográfica basada en asociaciones conocidas con otras enfermedades o vías

metabólicas. La existencia de grandes bases de datos que compilan los hallazgos de toda la comunidad científica como GeneBank (secuencias genéticas) (135) UniProt (proteínas) (136) o Golm Metabolome Database (metabolitos) (137) es indispensable para comparar e integrar resultados procedentes de estudios diferentes. Además, la representación esquemática de redes de interacción es una de las estrategias más comunes en Biología de Sistemas, ya que permite estudiar complejas relaciones biológicas de una manera ordenada y metódica. Diferentes herramientas informáticas son capaces de generar redes biológicas, muchas de ellas basadas en Cytoscape, una herramienta gratuita para visualización de redes de interacción que además permite la integración de datos de expresión y genómica en dichas redes de interacción (138, 139). PANTHER (140) y DAVID (141, 142) son programas gratuitos accesibles a través de internet que proporcionan una completa variedad de herramientas de análisis funcional como análisis de la función molecular, ontología y rutas en las que participan genes y/o proteínas, para ayudar a los investigadores a entender el significado biológico que se oculta tras un listado de genes/proteínas. Otros programas interesantes son Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com), que proporciona las funciones biológicas más importantes presentes en un conjunto de proteínas junto con su significación estadística, o STRING, una base de datos de interacciones proteicas empíricas o predichas incluyendo asociaciones directas (físicas) e indirectas (funcionales) (143).

Usando una aproximación integrada, podremos obtener una imagen más completa de los mecanismos moleculares que existen durante el desarrollo de la EAD.

7. LAS -ÓMICAS EN LA EAD

El estudio de las ECV ha sido frecuentemente abordado mediante análisis proteómico, en búsqueda de biomarcadores con carácter pronóstico, diagnóstico, así como de dianas terapéuticas. Sin embargo, no ha ocurrido así con la EAD, a pesar de la utilidad de este tipo de análisis en la caracterización molecular de la enfermedad y como fuente de potenciales biomarcadores.

Como hemos visto, existe una población de VICs implicadas en la proliferación celular y en la síntesis de la matriz extracelular, que juegan un papel fundamental en el desarrollo de la EAD y cuya diferenciación en miofibroblastos primero, y

posteriormente en células similares a osteoblastos, provoca la calcificación del tejido valvular (5). Bertacco y col, en el año 2010, (144) realizaron el primer estudio proteómico de células aisladas de la VA. Para ello utilizaron una subpoblación de VICs bovinas que expresaban marcadores de osteoblastos (fosfatasa alcalina y osteocalcina) y promovieron la calcificación de colágeno de la matriz como respuesta a la endotoxina (LPS). En este estudio, se compararon VICs con y sin tratamiento de LPS mediante 2-DE, estudiando por separado las proteínas del citosol y de la membrana celular. Los resultados mostraron alteraciones en diferentes proteínas (34 citosólicas y 10 de membrana) que estaban implicadas en plegamiento de proteínas mediado por chaperonas, metabolismo y transporte proteico, organización del citoesqueleto, homeostasis del óxido nítrico y reacciones redox, confirmando que existen cambios estructurales, metabólicos y de señalización en las VICs aórticas que han adquirido un fenotipo pro-calcificante.

Los estudios a nivel de tejido completo proporcionan una valiosa información acerca de los procesos moleculares que están teniendo lugar a nivel local. En el año 2011, utilizando un modelo murino, Angel y col. (145) realizaron un estudio proteómico de la VA y la válvula pulmonar a nivel de tejido completo. Analizaron el proteoma de ambas válvulas procedentes de ratones adultos mediante LC-MS/MS con el objetivo de describir un perfil proteico asociado al mantenimiento del tejido así como proporcionar una plataforma para futuros estudios proteómicos comparativos acerca del proceso patológico de la EAD. Recientemente, se ha realizado en nuestro laboratorio un estudio comparativo sobre tejido humano de VA afectada de EAD frente a tejido control. Para ello, se desarrolló un protocolo para analizar la VA calcificada utilizando 2D-DIGE (146), que posteriormente se utilizó para realizar un estudio comparativo entre VA estenóticas y VA sanas procedentes de necropsias (147). Mediante esta aproximación, se encontraron proteínas diferencialmente expresadas implicadas en procesos clave relacionados con la ECV como fibrosis, homeostasis y coagulación.

Para obtener una visión más completa de un proceso fisiopatológico hay que tener en cuenta que existe un intercambio de moléculas entre los tejidos y la circulación sanguínea, lo que además implica la posible liberación de marcadores tisulares con utilidad clínica. Por eso es importante complementar los estudios de tejido con estudios de plasma o secretoma. Ambos tipos de estudios se han llevado a cabo en nuestro

laboratorio utilizando muestras humanas. En el primer caso, se realizó un análisis comparativo mediante 2D-DIGE utilizando plasma de pacientes con EAD frente a plasma de individuos sanos (148). Para realizar un barrido lo más amplio posible, se utilizaron distintos protocolos de preparación del plasma previo al análisis usando plasma completo, plasma deplecionado mediante cromatografía de afinidad y plasma ecualizado. Este estudio destaca la EAD como proceso inflamatorio asociado a alteraciones en la homeostasis sanguínea y coagulación. También resalta la importancia de la proteólisis como mecanismo regulador en el proceso de la patología. El análisis y la identificación de proteínas secretadas por células o tejidos es de gran interés ya que, no solo proporcionan información acerca de procesos fisiopatológicos, sino que también constituyen una importante fuente de biomarcadores y de potenciales mediadores que puedan actuar como factores paracrinos o autocrinos (149). Con el objetivo de estudiar el secretoma de VA calcificadas y VA sanas, se realizó el cultivo de explantes valvulares en presencia de medio con aminoácidos marcados (150). Posteriormente, se analizó el sobrenadante mediante LC-MS/MS. Se encontró un gran número de proteínas de la ECM, indicando que existe una remodelación tisular activa como consecuencia de la pérdida de elasticidad de la VA.

En estos estudios, se han encontrado proteínas moduladas por la EAD previamente descritas en aterosclerosis, lo que apoya la teoría de que son enfermedades relacionadas entre sí de alguna manera. De hecho, varios autores han estudiado en otros tejidos del corazón como el miocardio o la aorta el efecto de diferentes valvulopatías y su relación con la aterosclerosis. En varios trabajos conjuntos, Baykut, Bergquist y col. (151, 152) realizaron estudios proteómicos comparativos sobre muestras de miocardio procedente de aurícula derecha en dos tipos de pacientes diferentes: un grupo sufría enfermedad coronaria y otro, enfermedad valvular aórtica. El objetivo de este estudio era comprobar si existía una relación en los mecanismos moleculares implicados en la respuesta del miocardio al desarrollo de ambas patologías. En un primer análisis (152), hallaron patrones de distribución característicos de cada enfermedad. Posteriormente, la identificación de las proteínas les permitió sugerir la desmina, el lumican y la isoenzima adenilato ciclasa como posibles biomarcadores específicos, a nivel del miocardio (151). Por otro lado, Matt y col. (2007) (153, 154) realizaron estudios proteómicos comparativos mediante 2-DE y MS utilizando muestras de aneurisma de aorta, con y sin dilatación, de pacientes con VA bicúspide y tricúspide. El objetivo de estos trabajos era

conocer el mecanismo molecular desencadenante de esta patología y saber si existe una asociación con el tipo de VA del paciente. Tras las identificaciones (154), encontraron diferencias a nivel de diferentes fosfoproteínas así como cuatro formas fosforiladas diferentes de la HSP27, concluyendo que existen diferentes mecanismos asociados a la dilatación aórtica. Utilizando los mismos grupos experimentales, Kjellqvist y col (2013). (155) analizaron sus perfiles proteicos, mediante 2D-DIGE, y génicos, mediante estudios de expresión de ARNm. Sus resultados también apoyan la hipótesis de que existen mecanismos moleculares divergentes, tanto a nivel proteómico como transcriptómico, que dan lugar al aneurisma aórtico según el tipo de VA (bicúspide o tricúspide) de los pacientes. En un intento más directo de relacionar la enfermedad arterial y la EAD, Neufeld y col. (2014) (156) estudiaron la arteria renal, ya que es un sitio en el que de manera habitual se producen lesiones ateroscleróticas, y la VA de cerdos sanos. El objetivo de este estudio era estudiar el papel de la captación de LDL durante el estadio temprano de la aterosclerosis y la EAD. Estos investigadores, utilizaron cromatografía de afinidad seguida de iTRAQ para definir las proteínas implicadas en la retención del LDL en los dos tipos de muestras, concluyendo que la decorina y el biglican son las dos proteínas que más contribuyen a esa retención, tanto en VA como en arteria, debido a su interacción con residuos de lisina de la apolipoproteína B.

Tras la revisión bibliográfica, queda patente la importancia de determinados procesos biológicos, como inflamación y homeostasis, para el desarrollo de la EAD. Además, destaca la importancia del remodelado de la matriz extracelular como característica fundamental de esta enfermedad.

En cuanto al análisis metabolómico, no tenemos constancia de que se haya realizado ningún estudio a gran escala hasta la fecha. Las aproximaciones clásicas para estudios de moléculas pequeñas concretas incluyen el uso del GC, pero utilizando otro tipo de detectores menos sensibles que la MS. De esta forma se han estudiado los efectos, de forma individual, del colesterol y otros esteroides procedentes de plantas en la EAD (157-159). Sin embargo, esta aproximación no es comparable a la realización de estudios masivos de metabolitos mediante el uso de la NMR o la MS.

OBJETIVOS

El objetivo fundamental de la presente Tesis Doctoral es el estudio global de los mecanismos moleculares que tienen lugar en la válvula aórtica durante el proceso de calcificación que ocurre en la EAD, así como profundizar en la relación existente entre la aterosclerosis y la EAD, buscando similitudes y diferencias entre ambos procesos patológicos. La finalidad de este trabajo es seleccionar un panel de proteínas y metabolitos de interés con valor potencial como biomarcadores diagnósticos y pronósticos de la enfermedad, así como nuevas dianas terapéuticas.

De este objetivo principal se derivan los siguientes objetivos particulares:

1. Desarrollar un modelo animal de EAD y estudiar el tejido valvular aórtico sano y estenótico mediante electroforesis bidimensional diferencial.
2. Estudiar la expresión diferencial de proteínas en plasma deplecionado de pacientes con EAD frente a pacientes con IA mediante electroforesis bidimensional diferencial en gel.
3. Realizar un estudio metabolómico de plasma completo de pacientes con EAD frente a pacientes con IA mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
4. Realizar un estudio de histología molecular mediante MALDI-IMS en secciones de tejido humano de una válvula aórtica estenótica con creciente grado de afectación.
5. Estudiar la expresión diferencial de proteínas en tejido valvular de pacientes con EAD frente a pacientes con IA mediante electroforesis bidimensional diferencial en gel.
6. Estudiar la influencia de la aterosclerosis sobre la estenosis aórtica mediante análisis de expresión diferencial en gel de proteínas empleando válvulas procedentes de trasplantes, pacientes con IA y pacientes con EAD, clasificados en función de la presencia de enfermedad arterial coronaria subyacente.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS

1.1. MODELO ANIMAL

Para el modelo animal se utilizaron 16 conejos macho de raza Nueva Zelanda blanca (NZWR, *New Zealand White Rabbit*), con pesos comprendidos entre 2 y 2.5 kg. Los animales se dividieron de manera aleatoria en 2 grupos, en los que se llevó a cabo diferente protocolo de alimentación. El grupo control recibió pienso normal de conejo mientras que al patológico se le proporcionó pienso enriquecido con un 1% de colesterol y 50000 UI/Kg de vitamina D₂ (Harlan). Los animales se alimentaron *ad libitum* durante 12 semanas. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del IIS-Fundación Jiménez Díaz, centro en el que se llevó a cabo todo el manejo de los animales.

Para el estudio de la evolución del modelo animal, se realizaron ecocardiografías transtorácicas al inicio del experimento (t=0), a las 6 semanas (t=6) y a las 12 semanas (t=12). También se tomaron muestras de sangre de la vena marginal de la oreja. A las 12 semanas los animales fueron sacrificados con una inyección de ketamina (100 mg/kg) y xilazina (20mg/kg) y diseccionados para extraer la VA objeto de estudio. Tras ser lavadas con suero salino para eliminar los restos de sangre, dos valvas fueron congeladas y almacenadas a -80°C para la posterior extracción proteica. La tercera valva fue fijada en formalina tamponada al 10% durante 24h y después incluida en parafina para la posterior obtención de cortes histológicos.

1.1.1. ECOCARDIOGRAFÍA

Las imágenes de ultrasonidos se obtuvieron con una sonda de aplicación neonatal S12-4, una sonda sectorial de banda ancha de 4 a 12 MHz de rango de frecuencia, conectada a un ecógrafo HD11XE (Philips Medical Imaging). Se visualizó el eje largo paraesternal para observar la morfología y la apertura de la válvula. Además, el gradiente transvalvular aórtico se registró usando Doppler de onda continua desde planos apicales.

1.1.2. ANÁLISIS DE SANGRE

Se realizaron análisis de sangre a t=0, t=6 semanas y t=12 semanas en el servicio de análisis clínicos del IIS-Fundación Jiménez Díaz. Mediante ensayos enzimáticos de rutina, se midieron los valores de calcio, fósforo, potasio, triglicéridos, colesterol total y colesterol LDL, HDL y no-HDL (medido como colesterol total menos HDL).

1.1.3. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS

Con las muestras incluidas en parafina se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina (H&E), para observar la estructura general de la válvula, y rojo de alizarina para la visualización de depósitos de calcio. Además, se realizaron inmunohistoquímicas (IHQ) con anticuerpos monoclonales contra RAM11 y α -actina (DAKO) para localizar macrófagos y miofibroblastos, respectivamente. Estas muestras se desparafinaron previamente a los procesos de tinción e IHQ de la siguiente manera: incubación a 60°C 1h, 3 lavados con xilol de 5min, etanol 100%, etanol 96% y etanol 70% y agua.

Los protocolos de tinción general y específica utilizados fueron los siguientes:

1) *Hematoxilina-eosina*

- Fijación con acetona fría y secado al aire
- Lavado con agua
- Tinción con hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich) durante 10 min
- Lavado con agua
- Tinción con eosina en solución alcohólica (Sigma-Aldrich) durante 30 seg
- Deshidratación en batería de alcoholes (70%, 95%, 100%)
- Xilol
- Montaje con DPX (Fluka)

2) *Rojo de Alizarina*

- Tinción con una solución de rojo de alizarina S (Sigma-Aldrich) 2% (p/v), pH 4.1-4.3 durante 5 min
- Eliminación del exceso de colorante con papel secante

- Deshidratación en acetona y acetona-xilol (1:1)
- Xilol
- Montaje con DPX (Fluka)

3) *Inmunohistoquímicas: RAM11 y α -actina*

- Recuperación antigénica mediante la solución comercial *Target Retrieval Solution* pH 9 (10x) 3-in-1 (Dako) durante 30 min en autoclave a 97°C.
- Lavado en PBS
- Fijación con acetona fría y secado al aire
- Lavado con agua
- Delimitación de secciones con bolígrafo de IHQ (Invitrogen)
- Bloqueo con suero normal de cabra 10% (para RAM11) o BSA 10% (para α -actina) durante 1 hora
- Incubación con anticuerpo primario: dilución 1:100 (ambos anticuerpos) en diluyente de anticuerpos (Dako) durante 30 min
- 3 lavados de 5 min en PBS-T
- Bloqueo de las peroxidases endógenas con H₂O₂ al 3% durante 5 min
- Lavado de 5 min en PBS-T
- Incubación anticuerpo secundario: dilución 1:100 (*Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins-HRP*, Dako) durante 30 min
- 3 lavados de 5 min en PBS-T
- Revelado con 3,3'-diaminobencidina (DAB, Dako)
- Lavado con agua
- Tinción de fondo con hematoxilina durante 1 min
- Lavado con agua
- Deshidratación en batería de alcoholes (70%, 95%, 100%)
- Xilol
- Montaje con DPX (Fluka)

1.2. MUESTRAS HUMANAS

1.2.1. SELECCIÓN DE SUJETOS Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Para realizar los estudios de esta Tesis Doctoral se utilizaron muestras de individuos con EAD, con IA e individuos sometidos a transplante cardiaco (sin valvulopatías). Las

muestras de pacientes con EAD e IA se obtuvieron a partir de individuos sometidos a cirugía de reemplazo valvular aórtico, tanto en el Hospital Virgen de la Salud (Toledo) como en el Hospital Universitario Gregorio Marañón (Madrid). En el caso de las IA, solo se han considerado aquellas debidas a una dilatación del arco aórtico para evitar la afectación de la válvula. También se obtuvieron muestras de individuos procedentes de operaciones de trasplantes de corazón, tanto en el Hospital Gregorio Marañón como en el Hospital La Fe (Valencia), siendo el motivo del trasplante ajeno a patología valvular aórtica, por lo que la VA no debería presentar afectación. Se descartaron las muestras (sangre y tejido) de pacientes con VA bicúspides, doble afectación aórtica (EAD e IA) y/o lesión mitral. Además, se examinaron las VA de trasplantes e IA para comprobar que eran macroscópicamente normales y que no presentaban ningún grado de calcificación. El estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por los Comités Éticos de los hospitales implicados en la obtención de muestras. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes.

La sangre se recogió en tubos pretratados con EDTA y se sometió a una centrifugación de 10 minutos a 1125g a 20°C para el aislamiento del plasma. Por otro lado, las VA se lavaron con suero salino para eliminar los posibles contaminantes de sangre. Ambas muestras se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

El número de muestras pertenecientes a cada grupo, así como sus características basales y sus factores de riesgo cardiovascular, se encuentran recogidos en los resultados.

1.2.2. CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA

Para realizar el análisis histológico, una de las valvas de cada VA fue fijada en formalina al 10% durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se descalcificaron utilizando el reactivo comercial Shandon TBD-1 (Thermo Scientific) y se incluyeron en medio óptimo para corte a baja temperatura (OCT, *Optimal Cutting Temperature compound*). Se realizaron cortes histológicos de 6 µm y se estudiaron por tinción de H&E, tinción para fibras elásticas Verhoeff's Van Gieson (EVG) y tinción de lípidos Rojo Oleoso (Oil Red). También se realizaron IHQs para confirmar la presencia de macrófagos y miofibroblastos utilizando anticuerpos frente a CD68 y α -actina, respectivamente.

1) *Hematoxilina-eosina*

Se siguió el protocolo detallado en el apartado “1.1.3.Análisis histológicos”.

2) *Tinción de fibras elásticas (EVG)*

- Fijación con acetona fría y secado al aire
- Tinción con hematoxilina de Verhoeff (10 ml de hematoxilina alcohólica, 4 ml de cloruro férrico 10% y 4 ml de lugol) durante 30 min
- Lavado con agua corriente
- Diferenciación en cloruro férrico 2% durante 1-2 min
- Aclarar con agua
- Incubación con tiosulfato sódico 5% durante 1 min
- Lavado en agua
- Tinción de fondo con solución de Van Gieson (100 µl de fucsina ácida 1% y 4.5 ml de ácido pícrico)
- Deshidratación en batería de alcoholes (95%, 100%, 100%)
- Xilol
- Montaje con DPX (Fluka)

3) *Tinción de lípidos (Oil Red)*

- Fijación con formalina
- Tinción con una solución de Oil Red O (Sigma-Aldrich) 0.6% (p/v) en isopropanol 60%, filtrada en el momento, durante 20 min
- Lavado con agua
- Tinción de fondo con hematoxilina durante 1 min
- Montaje con gelatina glicerinada

4) *Inmunohistoquímicas: CD68 y α -actina*

Se siguió el protocolo detallado en el apartado “1.1.3.Análisis histológicos”, con las siguientes modificaciones:

- Bloqueo con BSA 10% durante 1 hora (tanto en el caso de CD68 como α -actina)

- Incubación con anticuerpo primario: dilución 1:50 para CD68 y 1:100 para α -actina en diluyente de anticuerpos (Dako) durante 30 min

2. ESTUDIOS PROTEÓMICOS

2.1. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS

Cómo hemos visto en la Introducción, la preparación de la muestra es un paso importante que debe ser cuidadosamente adaptado a cada tipo de muestra. Una vez preparados los extractos, la concentración de proteína de cada muestra se determinó usando el método de Bradford-Lowry (Bio-Rad protein assay)(160), guardándose después las mismas a -80°C hasta el momento de su utilización.

2.1.1. PLASMA

Para la realización del estudio proteómico de plasma se llevó a cabo un fraccionamiento de la muestra con el objetivo de eliminar las proteínas mayoritarias que pueden enmascarar a aquéllas menos abundantes en el plasma.

2.1.1.1. Depleción de las proteínas mayoritarias del plasma

La inmunodepleción de las muestras de plasma se llevó a cabo mediante cromatografía líquida utilizando un cromatógrafo HPLC 1200 series (Agilent Technologies) con una columna de afinidad MARS Hu-14, 4,6mm x 50mm (Agilent Technologies) (161). Esta columna contiene anticuerpos policlonales contra 14 proteínas que constituyen el 94% del contenido proteico total del plasma: albúmina, IgG, antitripsina, IgA, transferrina, haptoglobina, fibrinógeno, α -2-macroglobulina, α -1-glicoproteína, IgM, apolipoproteína AI, apolipoproteína AII, complemento C3 y transtiretina. El protocolo utilizado fue el recomendado por la casa comercial, que incluye el uso de 2 tampones especiales denominados Tampón A y Tampón B (Agilent Technologies) (Figura MM.1).

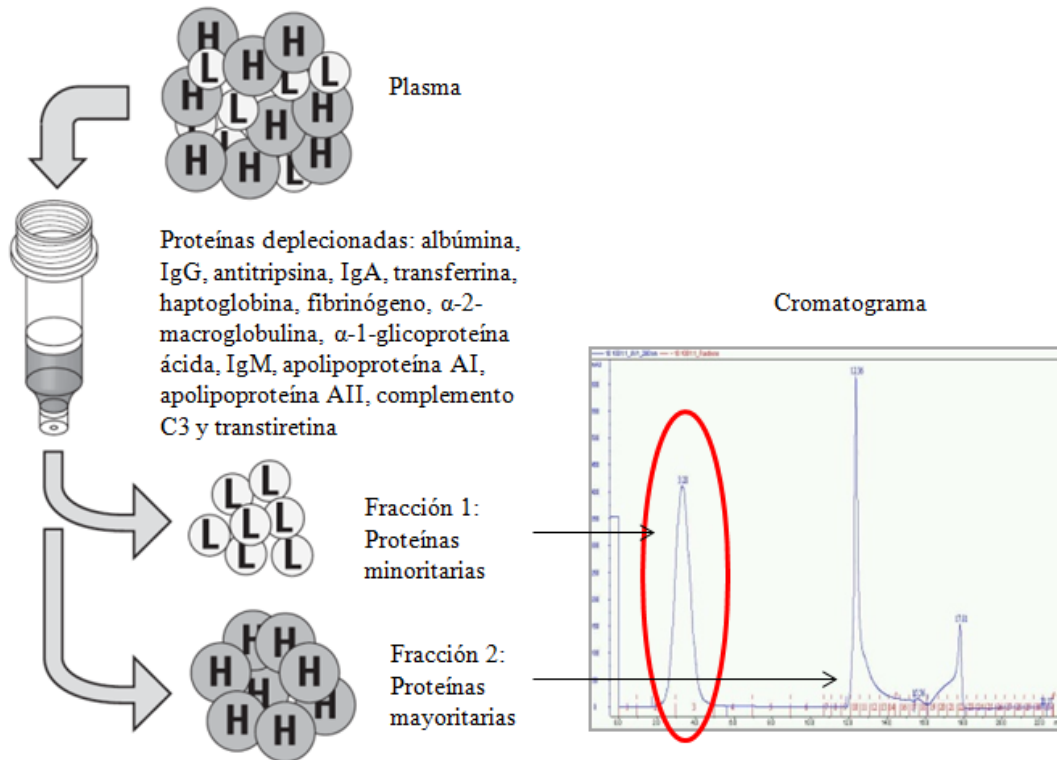


Figura MM.1. Depleción de proteínas mayoritarias. Esquema representativo de la depleción donde se indican las proteínas deplecionadas mediante cromatografía de afinidad.

El tampón A es un tampón fosfato de pH neutro indicado para realizar los pasos de inyección de la muestra, equilibrado y lavado de la columna, mientras que el tampón B, con urea y de pH ácido, está indicado para llevar a cabo la elución de las proteínas mayoritarias retenidas por la columna. Para cada pinchada en el HPLC, 20 μ l de plasma fueron diluidos con 60 μ l de Tampón A y centrifugados a través de un filtro de acetato de celulosa de 0.22 μ m. Tanto la inyección como los pasos cromatográficos se realizaron según las indicaciones de la casa comercial (Tabla MM.1.). Una vez realizadas las carreras correspondientes, se recogieron las fracciones de las proteínas no retenidas (minoritarias) y se pasaron a tubos concentradores (Centrifugal Filter Amicon Ultra, Ultracel 3K, Millipore), que fueron centrifugados a 4000g durante 25 min. Para eliminar los restos de tampón A se realizaron 4 lavados con un tampón de bicarbonato amónico (65 mM AMBIC, 0.5 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y 0.5 mM ácido etildiaminotetraacético (EDTA)) consistentes en añadir 4.5 ml de este tampón y repetir los pasos de centrifugación hasta dejar un volumen de 250-500 μ l de muestra cada vez. Tras el último lavado, cada muestra quedó en un volumen de 200-250 μ l y fue

dializada frente a 20 mM Tris utilizando tubos comerciales con una membrana de 1 KDa de poro (Mini Dialysis Kit, GE Healthcare).

	TIEMPO (min)	% A	% B	FLUJO (ml/min)		TIEMPO (min)	% A	% B	FLUJO (ml/min)
1	0.00	100	0	0.125	5	11.51	0	100	1.000
2	9.50	100	0	0.125	6	16.00	0	100	1.000
3	9.51	100	0	1.000	7	16.01	100	0	1.000
4	11.50	100	0	1.000	8	25.00	100	0	1.000

Tabla MM.1. Pasos cromatográficos para la depleción de proteínas mayoritarias. Programa cromatográfico empleado indicando el tiempo de carrera así como el porcentaje de tampón A o B y el flujo empleado en cada momento.

2.1.2. TEJIDO

El primer paso para la obtención de los extractos proteicos consistió en pulverizar las valvas con nitrógeno líquido en un mortero. Dado que las válvulas de humano y de conejo presentan grandes diferencias de tamaño, y dada la mayor calcificación de las de origen humano, la extracción de proteínas se realizó de forma diferente.

2.1.2.1. **Modelo animal**

En este caso, se llevó a cabo un protocolo simple de extracción, con el objetivo de minimizar la pérdida de material proteico. Tras machacar el tejido, el polvo se mezcló con un solución de lisis compuesta por 7M Urea, 2M Thiourea, 4% p/v CHAPS y 1% p/v DTT. Esta solución se sometió a 2 ciclos de sonicación-hielo para favorecer la extracción de proteínas del tejido y se centrifugó a 14000g, posteriormente se recogió el sobrenadante correspondiente al extracto proteico de la muestra.

2.1.2.2. **Humano**

En este caso, al tratarse de un tejido más grueso y con mayor presencia de lípidos y nódulos calcificados, se utilizó una extracción en dos pasos basada en el método que nuestro grupo había descrito previamente (146) con ligeras modificaciones. Para ello, se le añadió al polvo obtenido una solución de lisis compuesta por PBS, 2.5 mM DTT,

0.1% SDS y 1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Esta solución se sometió a 5 ciclos de sonicación-hielo y se centrifugó a 14000g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante 1 (E1), que contenía la mayor parte de las proteínas solubles, fue recogido y conservado a 4°C. Sobre el precipitado se añadió una solución de 7M Urea, 2M tiourea y 4% CHAPS para maximizar la extracción de proteínas hidrofóbicas y de membrana. Tras otros 5 ciclos de sonicación-hielo y la centrifugación, se recogió el sobrenadante (E2) y se juntó con el E1. Este extracto proteico se filtró mediante centrifugación utilizando filtros de 0.22 μm y se dializó frente a 20 mM Tris utilizando unos tubos comerciales con una membrana porosa de 1 KDa de punto de corte.

2.2. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DIFERENCIAL (2D-DIGE)

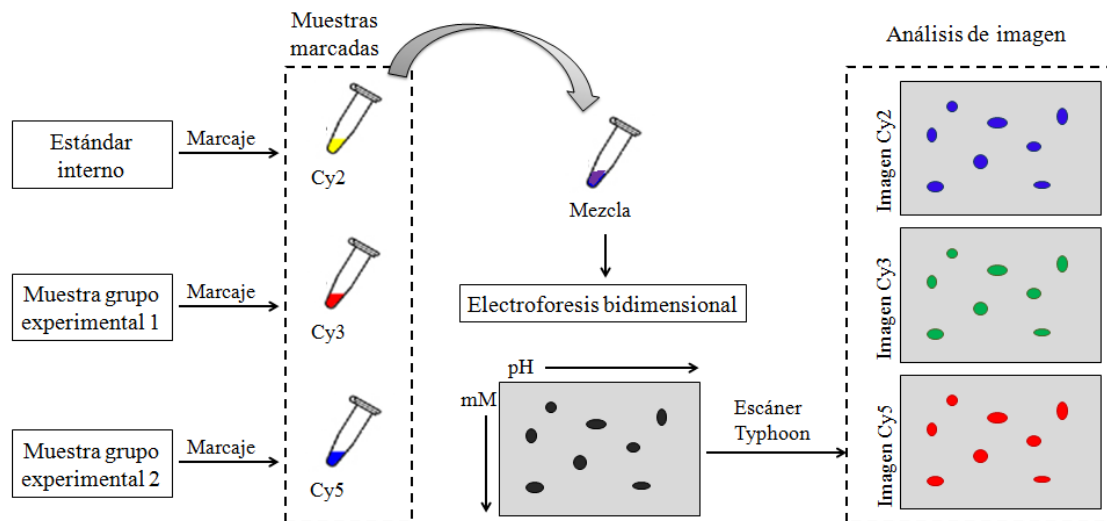


Figura MM.2. Esquema del protocolo de 2D-DIGE. Las proteínas de hasta tres muestras distintas, antes de ser separadas, son marcadas con fluoróforos diferentes y espectralmente distinguibles. Las tres muestras son mezcladas y separadas en un único gel, reduciendo la variabilidad entre geles y mejorando la reproducibilidad y la capacidad de extraer información cuantitativa de los análisis. Así, este sistema permite la cuantificación estadística de pequeñas variaciones en los niveles de expresión de proteínas entre distintas muestras.

Antes de la electroforesis, se realizó una precipitación con acetona de la cantidad necesaria de proteína y se disolvió en tampón de marcaje a pH 8.5 (7M Urea, 2M Tiourea, 4% CHAPS y 30 mM Tris) a una concentración final de 7 mg/ml. El protocolo completo del 2D-DIGE se encuentra esquematizado en la figura MM.2.

2.2.1. MARCAJE

Antes de proceder con el IEF, es necesario preparar un estándar interno que corresponderá a una mezcla de todas las muestras que formen parte del estudio. Después, 50 μg de proteína del estándar interno (por gel) y 50 μg de proteína de cada muestra se marcaron covalentemente utilizando el kit comercial *DIGE fluor minimal dyes* (GE Healthcare). De acuerdo con las especificaciones de la casa comercial, el estándar interno se marcó siempre con el fluorocromo Cy2 mientras que las muestras de cada grupo experimental se marcaron alternativamente con Cy3 y Cy5. De esta forma, en cada gel incluimos un estándar interno, un extracto del grupo patológico y uno del grupo control (150 μg de proteína total), disminuyendo la variabilidad producida por el manejo experimental.

Una vez preparadas las muestras, procedimos a reconstituir los fluorocromos del kit según las instrucciones de la casa comercial. Para ello, se disolvieron los fluorocromos liofilizados en dimetilformamida anhidra (DMF, Sigma-Aldrich), obteniéndose una solución madre de 1 mM de concentración que puede quedar almacenada a -20°C . Esta solución se diluyó después en DMF hasta 400 pmol/ μl , concentración de la solución de trabajo a la que deben utilizarse los fluorocromos para el marcaje. Para el 2D-DIGE se utilizaron 50 μg de cada muestra a los que se añadieron 400 pmol (1 μl) del fluorocromo correspondiente (Cy3 o Cy5, según el diseño experimental). En el caso del estándar interno, se marcó la mezcla entera con el Cy2 (manteniendo la proporción de proteínas y fluorocromo) antes de separar la cantidad correspondiente a cada gel. Las muestras se incubaron en hielo durante 30 min en oscuridad, para permitir la reacción de marcaje, que se detuvo posteriormente añadiendo 1 μl de lisina 10 mM por cada 50 μg de muestra e incubando de nuevo en hielo durante 10 min y en oscuridad.

2.2.2. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2-DE)

Las muestras marcadas se combinaron según el diseño experimental correspondiente, de forma que en cada vial estaban los 150 μg de proteína correspondiente a cada gel. En todos los casos, con motivo de evitar un posible sesgo por el marcaje con diferente fluorocromo, se alternaron muestras marcadas con Cy3 y Cy5 en cada uno de los grupos experimentales. En la tabla MM.2. se encuentran las condiciones experimentales de los 2D-DIGE elaborados en esta Tesis Doctoral.

ORIGEN	CONEJO		HUMANO											
TIPO DE MUESTRA	V. AÓRTICA		PLASMA		V. AÓRTICA									
Experimento	2D-DIGE 1		2D-DIGE 2		2D-DIGE 3		2D-DIGE 4							
Grupos experimentales	C	EAD	IA	EAD	IA	EAD	Sin EAC			Con EAC				
							T	IA	EAD	T	IA	EAD		
Nº de muestras/grupo	6	6	6	6	5	5	3	3	6	3	3	6		
Nº de geles	6		6		5		12							
% Geles	10%		12%		12%		10%							

Tabla MM.2. Grupos de estudio y condiciones empleadas para cada uno de los 4 experimentos 2D-DIGE realizados. Se incluyen el origen y tipo de cada muestra, nº de muestras de cada grupo empleadas, nº de geles necesarios por experimento y porcentaje de acrilamida de esos geles.

2.2.2.1. Isoelectroenfoque (IEF)

Cada vial se llevó a un volumen final de 450 µl de tampón de rehidratación (7M urea, 2M tiourea y 4% CHAPS) con un 40 mM DTT y 2% v/v de anfólitos (IPG Buffer pH 3-10). Para el isoelectroenfoque, se emplearon tiras IPG de 24 cm con un intervalo de pH 4-7, que se rehidrataron con las mezclas proteicas de forma pasiva durante toda la noche. A la mañana siguiente, se situaron las tiras en una bandeja especial de cerámica (*Ettan IPGphor Manifold Ceramic Tray*, GE Healthcare) que a su vez se situó en una unidad *Ettan IPGphor 3* (GE Healthcare) para la realización del IEF. Los programas utilizados para las diferentes muestras fueron los siguientes:

- 1) *Tejido*: 1 h a 500 V, 2 h hasta 1000 V (en gradiente), 3 h hasta 8000 V (en gradiente y 8000 V hasta 96000 V/h totales).
- 2) *Plasma*: 30 min a 500 V, 3 h hasta 3500 V (en gradiente), 3 h a 3500 V, 3 h hasta 6000 V (en gradiente) y 6000 V hasta 69000 V/h totales.

2.2.2.2. Equilibrado

Tras el IEF, las tiras IPG se equilibraron en un tampón compuesto por 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 6M urea, 87% v/v glicerol, 2% p/v SDS y azul de bromofenol. El equilibrado se realizó en dos pasos: uno para reducir las proteínas, añadiendo un 1% de DTT al tampón

de equilibrado, y otro para evitar la re-oxidación de las mismas mediante la adición de un 2.5% p/v de IAA al tampón.

Se incubó la tira durante 20 minutos con cada solución, a temperatura ambiente y en agitación. Tras un lavado con agua bidestilada, las tiras quedaron listas para la segunda dimensión.

2.2.2.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)

La segunda dimensión se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Laemmli con algunas modificaciones. Se utilizó el sistema de electroforesis *Ettan DALT six* (GE Healthcare) que incorpora un soporte de montaje de geles y una cubeta de electroforesis que permiten polimerizar y correr hasta 6 geles simultáneamente, disminuyendo la variabilidad experimental. Se realizaron geles de 24 x 20 cm al 10 y 12% de acrilamida, según el análisis (ver Tabla MM.2). Como catalizadores de la reacción de polimerización se añadieron persulfato amónico (APS) y N,N,N',N'-51 tetrametiletilendiamina (TEMED). La preparación de los geles siempre se realizó 24h antes de empezar la segunda dimensión para asegurar que la reacción de polimerización fuera completa.

Una vez que tuvimos listos los geles, se situó cada tira IPG de forma horizontal sobre el extremo superior de un gel, evitando la presencia de burbujas entre la tira y la superficie del gel. La electroforesis tuvo lugar a 25°C, aplicando 1 W/gel durante toda la noche.

2.2.3. DIGITALIZACIÓN Y ANÁLISIS DE IMÁGENES

Después de realizar la segunda dimensión, los geles 2D-DIGE fueron digitalizados utilizando un escáner de fluorescencia *Typhoon 9400* (GE Healthcare), que permite obtener imágenes de cada fluorocromo por separado debido a las diferentes longitudes de onda de excitación y emisión que presentan cada uno de ellos. Las imágenes obtenidas fueron importadas al programa *DeCyder Differential Analysis Software* (GE Healthcare), versión 7.0, con el que se realizó el procesamiento y análisis estadístico de las imágenes a través de los diferentes módulos que presenta:

1) Análisis diferencial en gel (DIA, *Differential in-gel analysis*): utilizando este módulo se realizó la co-detección de las 3 imágenes de cada gel así como la cuantificación de las manchas proteicas. En este programa, la abundancia se expresa como una relación de muestra/estándar interno: Cy3/Cy2 y Cy5/Cy2, lo que permite tener un valor de intensidad normalizado para cada mancha. Una vez completada esta fase, los datos generados son importados al siguiente módulo.

2) Análisis de variación biológica (BVA, *Biological Variation Analysis*): con este módulo se efectuó el emparejamiento de las manchas entre los distintos geles del experimento y el análisis estadístico de los niveles de expresión de las manchas en los diferentes grupos de estudio. En este análisis se consideró que existía variación cuando los niveles de expresión estaban alterados en $\pm 50\%$ y dicha variación se consideró estadísticamente significativa cuando se encontraba dentro del intervalo de confianza del 95% ($p < 0.05$) determinado por la prueba *t*-Student o ANOVA, según el caso.

3) Análisis de expresión diferencial (EDA, *Extended Data Analysis*): a través de este módulo se realizaron los análisis de componentes principales (ACP) y el de agrupación jerárquica, empleando las manchas proteicas con diferencias significativas entre los grupos de estudio. El ACP es un método estadístico que se utiliza para reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos, encontrar las causas de su variabilidad y ordenarlas por importancia.

2.2.4. TINCIÓN DE LOS GELES

Para la identificación de las proteínas que se encontraron diferencialmente expresadas, los geles del experimento 2D-DIGE se tiñeron después de su digitalización. En algunos casos fue necesaria la realización de 2-DE convencionales (sin marcaje fluorescente previo) con mayor cantidad de proteína (geles preparativos), según el protocolo descrito en el apartado “2.2.2. Electroforesis bidimensional“, para la visualización e identificación de las manchas proteicas más pequeñas.

2.2.4.1. Tinción con plata

Para esta tinción se utilizó el kit comercial *PlusOne Silver Staining* (GE Healthcare) basado en el método de Heukeshoven y Dernick (162). Esta técnica es la más sensible, aunque el rango de detección lineal es más amplio en las técnicas que utilizan

compuestos fluorescentes (87). El protocolo se realizó a temperatura ambiente y en agitación siguiendo las indicaciones de la casa comercial y se escanearon en un densitómetro GS-800 (BioRad).

2.2.4.2. Tinción fluorescente

La tinción fluorescente utilizada en este caso fue *OrioleTM* (Bio-Rad). Aunque la sensibilidad de este método es menor que la de la tinción de plata, es totalmente compatible con la MS, lo que facilita la identificación de proteínas. Además, es una tinción rápida y sencilla que solamente consta de un paso de incubación de 90 min. La visualización de los geles se realizó en un escáner de fluorescencia *EXQuest Spot Cutter* (Bio-Rad). Este aparato permite, no sólo la visualización, sino también seleccionar y cortar de forma automática las manchas proteicas de interés.

2.3. IDENTIFICACIÓN POR MS

El análisis por espectrometría de masas de los digeridos enzimáticos de las manchas proteicas se llevó a cabo en la Unidad de Proteómica del Hospital Nacional de Parapléjicos, SESCAM (Toledo).

Con este fin, las manchas proteicas de interés se cortaron tras la tinción correspondiente y se digirieron automáticamente empleando un digestor *Ettan Digester* (GE Healthcare). El protocolo de digestión utilizado fue el descrito por Shevchenko y col. (163), con ligeras modificaciones. Para ello, los fragmentos del gel fueron reducidos y alquilados utilizando 10 mM DTT y 55 mM IAA (Sigma-Aldrich), respectivamente, ambos disueltos en 50 mM bicarbonato amónico (99% pureza; Scharlau). Posteriormente, estos fragmentos se lavaron con 50 mM bicarbonato amónico en metanol 50% (grado HPLC, Scharlau) y acetonitrilo 70% (grado HPLC, Scharlau), tras lo cual se secaron en una centrífuga de evaporación al vacío (Thermo Fisher). A continuación, se añadió tripsina modificada de cerdo (Grado para secuenciación; Promega) a una concentración final de 20 ng/μl en 20 mM bicarbonato amónico y se incubó durante toda la noche a 37°C para llevar a cabo la digestión. Finalmente se utilizó acetonitrilo 60% en agua y 0.1% de ácido fórmico (99.5% pureza; Sigma-Aldrich) para realizar la extracción peptídica.

Una vez finalizada la digestión, se mezcló una alícuota de 0.5 μ l con 0.5 μ l de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxycinnámico (Sigma-Aldrich) en acetonitrilo 50% y 0.1% de ácido trifluoroacético. La mezcla se depositó en capa fina en una placa del espectrómetro *384 Opti-TOF 123x81 mm MALDI* (AB Sciex) y se secó a temperatura ambiente. Los espectros de MS y MS/MS fueron obtenidos en modo automático en un espectrómetro de masas *4800 Plus MALDI-TOF/TOF Analyzer* (AB Sciex). La adquisición de los mismos se realizó en modo ión-positivo con un láser Nd:YAG de 355 nm de longitud de onda, a una frecuencia de 200 Hz, obteniéndose entre 100 y 2000 espectros individuales. Para el análisis de fragmentos de iones en modo TOF/TOF, los precursores fueron acelerados a 8 kV y seleccionados en la puerta de entrada de iones. Los fragmentos generados por colisión de los precursores con aire en la cámara de colisión CID fueron además acelerados a 15 kV en la fuente 2 y sus masas fueron analizadas después de pasar por el reflector de iones. El análisis automático de los datos de masas se realizó usando el programa informático *4000 Series Explorer v.3.5.3* (AB Sciex). La calibración interna de los espectros de masas del MALDI-TOF fue realizada usando 2 iones de la autólisis de tripsina ($m/z = 842.510$ y $m/z = 2211.105$, respectivamente). Para las calibraciones del MALDI-MS/MS, se utilizaron espectros de iones fragmento obtenidos a partir de una mezcla de calibrantes de la casa comercial (4700 Cal Mix, AB Sciex). Los datos de MALDI-MS y MS/MS fueron combinados mediante el programa *GPS Explorer v.3.6* (AB Sciex), que permitió la realización de búsquedas no redundantes en la base de datos de proteínas *Swissprot 56.2* usando el programa *Mascot versión 2.2* (Matrix Science) (164). Los parámetros de búsqueda establecidos fueron: tolerancia de masas de 50 ppm, carbamidometilación de cisteínas como modificación fija y oxidación de metionina como variable; y la pérdida máxima de un lugar de corte por parte de la tripsina. Los espectros de MS y MS/MS y las búsquedas fueron revisadas manualmente en detalle usando este programa.

2.4. VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS

Para la validación de las proteínas encontradas diferencialmente expresadas en los análisis 2D-DIGE, se emplearon grupos independientes de muestras, a excepción de las validaciones del modelo animal. En este caso, debido a la limitación del número de animales, se empleó el plasma de los mismos conejos para corroborar los resultados encontrados en el tejido valvular.

2.4.1. MONITORIZACIÓN POR REACCIÓN SELECCIONADA (SRM)

Para la validación mediante SRM, las proteínas de los extractos se redujeron y alquilaron mediante dos incubaciones consecutivas: 100 mM DTT (Sigma-Aldrich) durante 30 min a 37°C seguido de 550 mM IAA (Sigma-Aldrich) durante 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad, en ambos casos en presencia de 50 mM bicarbonato amónico (99% pureza, Scharlau). A continuación, se añadió 50 mM bicarbonato amónico, 15% acetonitrilo (grado LC-MS, Scharlau) y una solución de tripsina modificada de cerdo a una relación final de 1µg tripsina por cada 50 µg de proteína. Tras la incubación a 37°C durante toda la noche, la digestión se detuvo añadiendo 2% de ácido fórmico y las muestras se limpiaron utilizando columnas de centrifugación con resina C18 (Pep-Clean, Pierce). El digerido triptico se secó en una centrífuga de evaporación al vacío y se resuspendió en una solución de 2% acetonitrilo con 2% ácido fórmico antes del análisis por MS.

Para el análisis LC-MS/MS se utilizó un sistema constituido por un nano-LC TEMPO (AB Sciex) combinado con un muestreador automático nano-LC y acoplados a un triple cuadrupolo 4000 QTRAP (AB Sciex) con una fuente *NanoSprayII* (AB Sciex). Se hicieron tres inyecciones para cada muestra (4 µl conteniendo 8 µg de proteína) usando fase móvil A (2% ACN/98% H₂O, 0.1% FA) con un flujo de 10 µl/min durante 5 min. Los péptidos se cargaron en un cartucho de micro-precolumna (AcclaimPepMap 100 C18.5 µm, 100 Å; 300 µm x 5 mm) para preconcentrar y desalinizar las muestras. La cromatografía líquida de fase reversa se realizó en una columna C18 (Onyx Monolithic C18, 150 x 0,1 mm., Phenomenex) en gradiente de fases A y B (98% ACN/2% H₂O, 0.1% FA). Los péptidos se eluyeron con un flujo de 900 nl/min, siguiendo los siguientes pasos: de 2% a 15% de fase B durante 2 min, de 15% a 30% de fase B durante 18 min, de 30% a 50% de fase B durante 5 min, de 50% a 90% de fase B durante 2 min y finalmente el 90% de fase B para regenerar la columna durante 3 min. Para finalizar, la columna se regeneró con un 2% de fase B durante 15 min más.

Tanto el nano-LC TEMPO como el sistema 4000 QTRAP se controlaron mediante el programa informático *Analyst* v.1.4.5. El MS se configuró para funcionar en modo de iones positivos con voltaje de espray de ionización de 2800 V y a una temperatura del interfaz de 150°C. La fuente y la cortina de gas se establecieron a 20 y 10 psi, respectivamente utilizándose nitrógeno en ambos casos. La energía de la colisión fue optimizada para

obtener la máxima eficiencia de transmisión y sensibilidad para cada transición de SRM. El algoritmo *IntelliQuan* incluido en el programa *Analyst* 1.4.5 se utilizó para calcular las áreas de pico correspondientes después de integración. Para comparar la abundancia relativa de cada muestra, las áreas de pico fueron normalizadas frente al cromatograma total iónico (TIC, *total ion chromatogram*).

2.4.2. TURBIDIMETRÍA

Las validaciones por turbidimetría se basan en la formación de compuestos insolubles mediante la combinación de la proteína de interés con el anticuerpo específico correspondiente. Esto produce un cambio de absorbancia proporcional a la concentración de proteína en la muestra, que puede ser cuantificada por comparación con un calibrador de concentración conocida.

Estos ensayos se llevaron a cabo en el laboratorio de análisis clínicos Seralab (Oviedo), utilizando un analizador químico BS200E (Mindray). Todos los reactivos fueron de la marca Spinreact y se utilizaron según las instrucciones de la casa comercial. Brevemente, la cantidad adecuada de muestra en cada ensayo se mezcló con el diluyente y, tras ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada utilizando una longitud de onda de 340nm, se midió la absorbancia de la mezcla. A continuación, se añadió el anticuerpo correspondiente, se incubó 2 min y se procedió a una nueva medición. La cantidad de proteína de cada muestra se calculó en base a una calibración de 6 puntos. Además, se utilizó un control de calidad, como recomienda el fabricante.

2.5. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE INTERACCIONES PROTEICAS

El análisis funcional de los datos se realizó utilizando la herramienta bioinformática DAVID v6.7. (*Database for Annotation, Visualisation and Integrated Discovery*), que permite el análisis de ontología y enriquecimiento (141, 142). De esta forma, se exploraron las principales funciones biológicas asociadas a nuestras proteínas de interés, así como los términos de ontología génica (GO, *gene ontology*) más representados. A continuación, se realizó un agrupamiento con los términos estadísticamente significativos ($p < 0.05$, determinado por la prueba *t*-Student) para disminuir los términos redundantes y calcular el valor de enriquecimiento y la significación estadística en cada caso. Por otro lado, se realizó el análisis de interacciones proteicas, tanto físicas como

funcionales, utilizando STRING v9.1. (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) (143). En ambos casos, se utilizó como referencia el conjunto del genoma/proteoma completo de humano para estudiar el enriquecimiento.

3. ESTUDIOS METABOLÓMICOS

El análisis metabolómico de plasma de pacientes con EAD frente a pacientes con IA se realizó mediante GC-MS.

3.1. EXTRACCIÓN DE METABOLITOS DE PLASMA

Para precipitar las proteínas del plasma, a 50 µl de muestra se añadieron 50 µl de acetonitrilo y se agitaron enérgicamente con un vórtex durante 30 seg. Después se centrifugó a 12000g durante 10 min, se recogieron 75 µl del sobrenadante y se llevaron a sequedad calentando la muestra a 70°C durante 1h (165).

3.2. DERIVATIZACIÓN DE LA MUESTRA

Antes del análisis, se procedió a la derivatización de la muestra mediante una reacción de sililación en la que se sustituyeron los hidrógenos activos de los compuestos de la muestra por grupos TMS (trimetilsilil). Este procedimiento se llevó a cabo en dos pasos consecutivos (165). Primero, se incubó la muestra seca con 40 µl de hidrocloreuro de metoxiamina (20 mg/ml) en piridina (Sigma-Aldrich) durante 24h a temperatura ambiente con agitación orbital, con el fin de proteger los grupos carbonilo. Transcurrido ese tiempo, se añadieron a la muestra 20 µl de BSTFA + 1% TMCS (Supelco) y se incubó a 70°C durante 1h para que se produjese la reacción de derivatización. Para finalizar, se añadieron 5 µl de pentadecanoato de metilo (10 ppm) utilizado como estándar interno, se centrifugó la muestra a 12000g y se recogieron 50 µl de sobrenadante para su inyección en el GC-MS.

3.3. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Para el análisis se utilizó un cromatógrafo de gases 6890N (Agilent Technologies) unido a un detector de masas de cuadrupolo simple 5975c (Agilent Technologies). La columna cromatográfica utilizada fue una HP-5MS (5% fenilmetilsiloxano de 30 m x 250 µm x 0.25 µm, Agilent Technologies). El programa de temperaturas utilizado fue el

siguiente: temperatura inicial de 60°C, seguido de una rampa de 5°C/min hasta alcanzar 285°C, temperatura que se mantuvo durante 2 min completando así un ciclo cromatográfico de 47 min. La inyección de la muestra (1 µl) se realizó en modo *splitless*, es decir, sin fraccionamiento de la muestra previo a entrar en la columna, utilizando helio como gas portador a un flujo constante de 1.5 ml/min. La temperatura del inyector y de la interfase fueron 230 y 290°C respectivamente. La adquisición se realizó en modo SCAN con un voltaje de impacto electrónico de 70 eV, la temperatura de la fuente de iones fue de 230°C y se escaneó un rango de masas entre 50-600 Da a una relación de 0.99 scan/seg.

3.4. CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS

La adquisición de los datos de cada inyección así como la integración, cuantificación e identificación de los picos cromatográficos se llevó a cabo utilizando el programa ChemStation (Agilent Technologies).

Una vez obtenidos los cromatogramas, los espectros de masas de cada uno de los picos cromatográficos fueron comparados con los espectros de masas contenidos en la librería NIST 2.0 (National Institute of Standards and Technology), considerándose identificados aquellos metabolitos cuya puntuación de identificación fuese igual o superior a 60. Posteriormente, la integración del cromatograma permitió calcular las áreas bajo la curva de cada pico identificado, que se normalizaron utilizando el pentadecanoato de metilo como estándar interno.

3.5. ANÁLISIS DE DATOS

El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando MetaboAnalyst 2.0. (166, 167), que permite el análisis estadístico y facilita la interpretación funcional de los datos mediante el análisis de las vías metabólicas. Para ello, se importaron los valores normalizados de las áreas de los picos obtenidos tras la integración y se procedió a una normalización de los datos para reducir la variabilidad técnica y conseguir que los datos tuvieran una distribución Gaussiana. Además, la varianza de los metabolitos más abundantes tiende a enmascarar señales más pequeñas pero potencialmente significativas, lo que también se corrige mediante la normalización de los datos (168). Para ello, se transformó cada variable restándole su media y dividiendo por la desviación estándar (autoescalado). A

continuación, se realizó el análisis estadístico mediante *t*-Student y se calculó la variación entre grupos considerándose significativos aquellos con un *p*-valor ≤ 0.05 y un coeficiente de variación > 2 o < -2 . Este programa también nos permitió llevar a cabo el análisis multivariante mediante ACP y agrupación jerárquica así como el análisis de rutas metabólicas. En este último caso, se utilizó la biblioteca de compuestos de *Homo sapiens* y se realizó el test exacto de Fisher para los análisis estadísticos.

4. ANÁLISIS HISTOLÓGICO MEDIANTE MALDI-IMS

Para el análisis de péptidos sobre regiones histológicas utilizando MALDI-MS (MALDI-IMS, *MALDI imaging mass spectrometry*) se utilizó una valva de un paciente con EAD, sin fijar ni descalcificar.

4.1. PREPARACIÓN DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS

Se seleccionó un fragmento de la valva con diferentes niveles de calcificación, incluyendo el tejido comprendido entre la inserción en la aorta hasta el extremo libre de la valva. Para evitar el uso de OCT, se sujetó la muestra a la pletina del criostato utilizando agua fría y llevándola a congelación. Se hicieron cortes de 10 μm de grosor y se recogieron en portaobjetos especiales con superficie conductiva de óxido de indio y estaño (ITO, *Indium tin oxide*) (Bruker Daltonics). La degradación del tejido se evitó manteniendo los portaobjetos dentro del criostato o en hielo seco en todo momento para evitar así la descongelación de los cortes. Se estudiaron 3 regiones de la valva, separadas entre sí por una distancia de 800 μm . Los cortes de las regiones intermedias se recogieron utilizando portaobjetos normales para la realización de tinciones histológicas habituales.

A continuación, se situaron los portaobjetos en un desecador a vacío durante 30 min y se sometieron al siguiente proceso de lavado para la deslipidación de la muestra:

- 70% etanol fresco durante 30 seg
- 100% etanol durante 30 seg
- Deshidratante Carnoy (60% etanol/ 30% cloroformo/ 10% ácido acético) durante 2 min
- 100% etanol durante 30 seg
- 0.2% TFA en agua durante 30 seg

- 100% etanol durante 30seg

Por último, se introdujeron los portaobjetos otra vez en el desecador durante 15 min y se congelaron a -80°C , protegidos de la humedad, hasta su utilización. Las muestras así conservadas se enviaron a la Unidad de Proteómica del CIC BioGUNE (Bilbao), donde se llevó a cabo el resto del proceso.

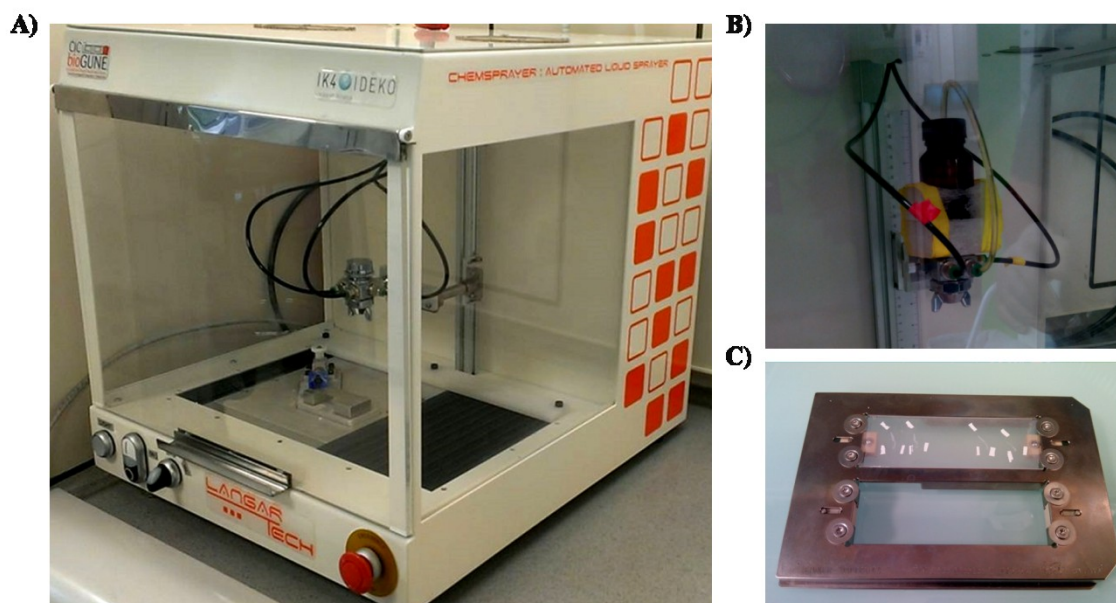


Figura MM.3. Análisis peptídico sobre regiones histológicas. Para la deposición de la matriz se utilizó un espray automático Langartech 1.0. (A), construido gracias a la colaboración del CIC BioGUNE e Ideko-IK4. Consta de una base neumática móvil, donde se sitúa la muestra, y un espray con el que se rocía la matriz (B). A continuación, los portaobjetos se sitúan en un adaptador especial (C) para el análisis en el MALDI-TOF. Para situar los cortes correctamente en el MALDI-TOF, se realizan marcas blancas realizadas con lápiz corrector, que se utilizan como referencia.

4.2. DEPOSICIÓN DE LA MATRIZ

Antes de nada, se situaron los portaobjetos en el desecador durante 20 min para evitar la presencia de agua tras la congelación.

La deposición de la matriz se llevó a cabo utilizando un espray automático denominado Langartech 1.0., construido gracias a la colaboración del CIC BioGUNE e Ideko-IK4 (Figura MM.3). Se trata de un dispositivo de uso particular que ha permitido obtener valores de resolución espacial al nivel de los mejores dispositivos comerciales disponibles en el mercado. Tras la optimización de los parámetros del espray para

obtener gotas pequeñas (<1mm) y homogéneas, se roció cada portaobjetos con la matriz: ácido sinapínico en 70:30 acetonitrilo:0.2% TFA. Se realizaron 10 ciclos de espray (5 pases) y secado (3 pases) en cada caso.

4.3. ADQUISICIÓN DE ESPECTROS DE IMÁGENES

Los portaobjetos se situaron en un adaptador especial (MTP Slide Adaptor II, Bruker Daltonics) y se analizaron utilizando un espectrómetro Autoflex III Smartbeam MALDI-TOF (Bruker Daltonics). La adquisición de datos se llevó a cabo en modo lineal, con un rango de masas de 1-30 kDa y siguiendo una matriz de disparos separados entre sí por 75 µm. Las especificaciones de disparo y ionización fueron las siguientes: modo lineal positivo, con voltajes de 20 kV (ion source 1), 18.5 kV (ion source 2) y 9 kV (lente), extracción iónica pulsada (120 ns), supresión de matriz hasta 1000 Th. Se realizó una calibración de masa mediante un punto adyacente al tejido de Protein 1 Calibration Standard (Bruker Daltonics) [7 standards en el rango 5000 a 20000 Da]

El programa informático para la adquisición y detección de espectros fue Fleximaging v3.0. (Bruker daltonics).

4.4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los datos de cada experimento fueron exportados al programa informático ClinProt Tools v2.2. (Bruker Daltonics) para la realización del análisis estadístico. Este programa nos permitió encontrar las masas representativas de todos los espectros y llevar a cabo el análisis multivariante mediante ACP y agrupación jerárquica no supervisada (Unsupervised Clustering) para observar la distribución diferencial de masas en la superficie del tejido. El ACP nos mostró las áreas sometidas a más variación interzonal, mientras que la agrupación jerárquica destacó, en base a los resultados del ACP, las relaciones y disimilitudes entre estas regiones.

RESULTADOS

Tal y como ya hemos visto en la Introducción, los modelos animales presentan una serie de ventajas metodológicas respecto a la experimentación en humanos, aportando, principalmente, mayor reproducibilidad de los resultados respecto a los ensayos clínicos ya que permite realizar las manipulaciones necesarias de forma simultánea a los distintos grupos de estudio y controlar factores externos. Sin embargo, siempre existen diferencias existentes entre humanos y animales, no solo a nivel anatómico, sino también respondiendo de forma diferente a enfermedades y tratamientos farmacológicos. Por este motivo, en el desarrollo de esta tesis, decidimos llevar a cabo un modelo animal en conejos y, además, trabajar con muestras humanas, de forma que ambos estudios sean complementarios entre sí.

1. ESTUDIO INTEGRADO DEL DESARROLLO DE ESTENOSIS AÓRTICA DEGENERATIVA EN UN MODELO ANIMAL

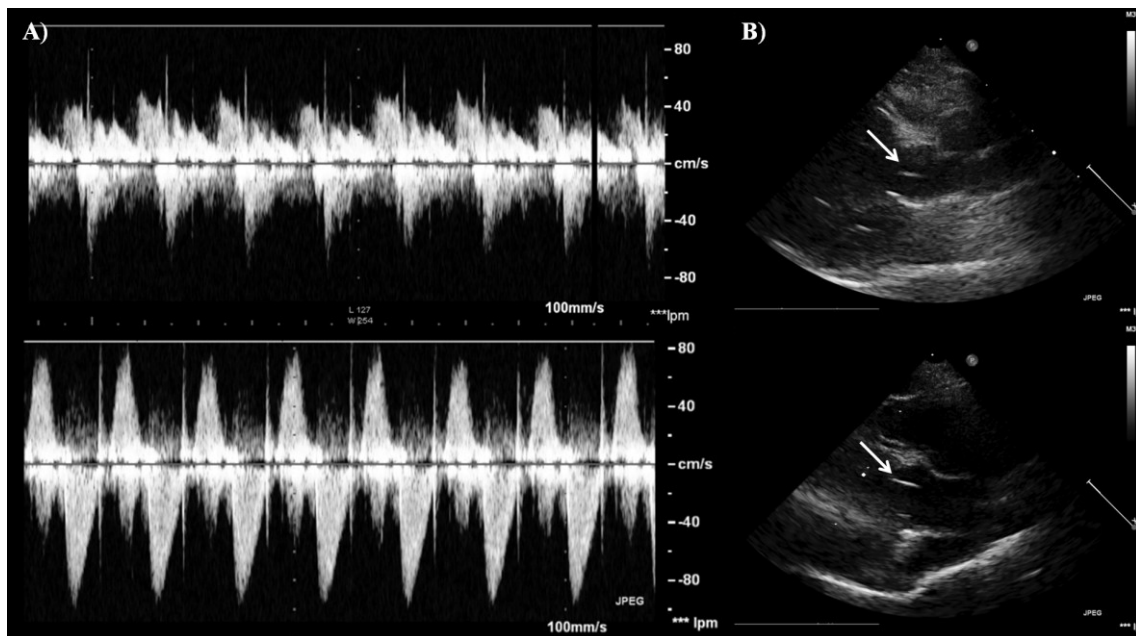


Figura R.1. Ecocardiogramas representativos del modelo animal. A) Se muestran como representación los gradientes transvalvulares aórticos de un conejo control (arriba) y uno patológico (abajo). B) Válvula aórtica (flecha) de conejo control (arriba) y patológico (abajo).

Durante el modelo animal, realizamos diferentes estudios para evaluar el desarrollo de la enfermedad en los animales.

La existencia de EAD se confirmó usando ecocardiografía transtorácica (ETT). Por un lado, se midió el gradiente transvalvular, siendo mayor en los conejos con dieta especial que en los controles (Figura R.1A). También se observó mayor grosor de la VA en el grupo patológico (Figura R.1B).

Además, se realizaron análisis de sangre a diferentes tiempos (t=0, t=6 semanas y t=12 semanas) durante los 3 meses del desarrollo del modelo. Se midieron los valores de calcio, fósforo, potasio, triglicéridos, colesterol total y colesterol LDL, HDL y no-HDL.

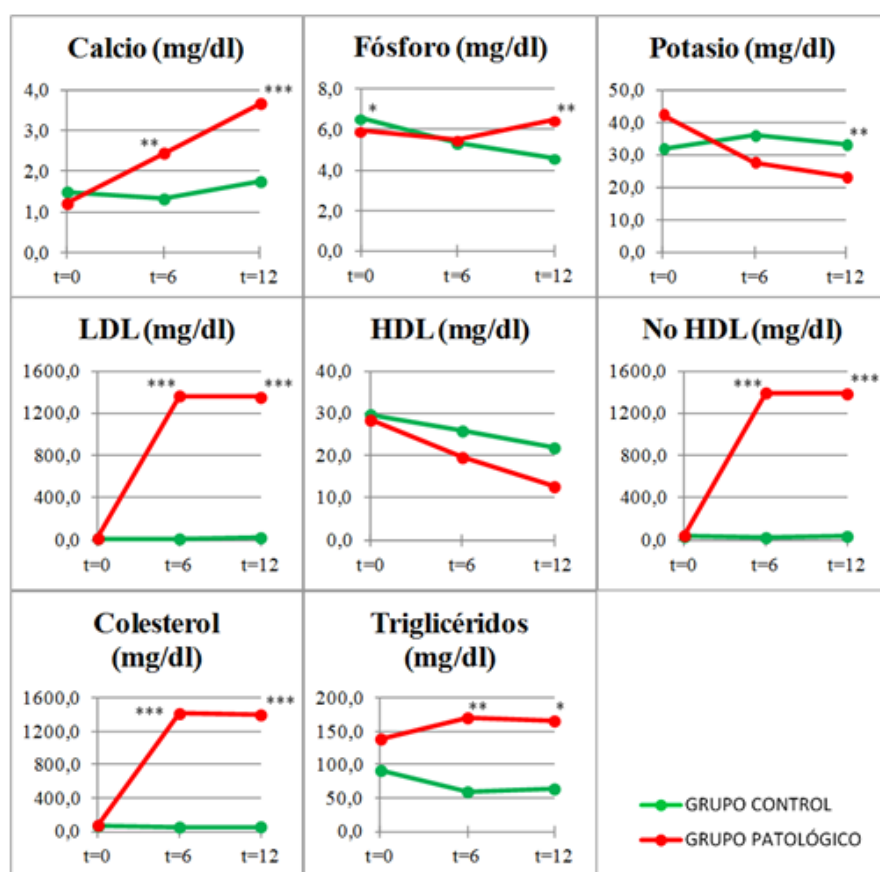


Figura R.2. Representación de los resultados de los análisis bioquímicos mostrando la media de cada grupo. Se señalan las diferencias estadísticamente significativas: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) o $p < 0.001$ (***).

Al final del modelo se encontraron niveles significativamente más altos en el grupo patológico en el caso de las medidas realizadas para calcio (3.67 ± 0.98 vs 1.74 ± 0.5 mg/dL, $p < 0.001$), fósforo (6.47 ± 1.31 vs 4.6 ± 0.54 mg/dL, $p < 0.01$), colesterol total (1399 ± 29.48 vs 53.28 ± 17.33 mg/dL, $p < 0.0001$), triglicéridos (165.67 ± 99.44 vs

63.57±22.84 mg/dL, $p<0.05$), colesterol LDL (1353.17±55.16 vs 23±14.05 mg/dL, $p<0.0001$) y colesterol no-HDL (1386.33±38.94 vs 35.71±12.26 mg/dL, $p<0.0001$). Sin embargo, encontramos disminuidos los niveles de potasio (23.15±3.89 vs 33.15±6.77 mg/dL, $p<0.01$) y no encontramos diferencias significativas en los niveles de colesterol HDL (12.67±12.31 vs 21.86±7.36 mg/dL, $p=0.12$) (Figura R.2).

A nivel macroscópico, las VA del grupo patológico estaban engrosadas y habían perdido flexibilidad respecto a las VA sanas. Además, la caracterización histológica realizada con rojo de alizarina de las VA de los animales sometidos a dieta hipercolesterolémica, reveló la existencia de depósitos de calcio. También se observó mayor expresión de RAM11 y α -actina en las VA patológicas, indicando una mayor infiltración de macrófagos a la VA así como un mayor número de miofibroblastos (Figura R.3).

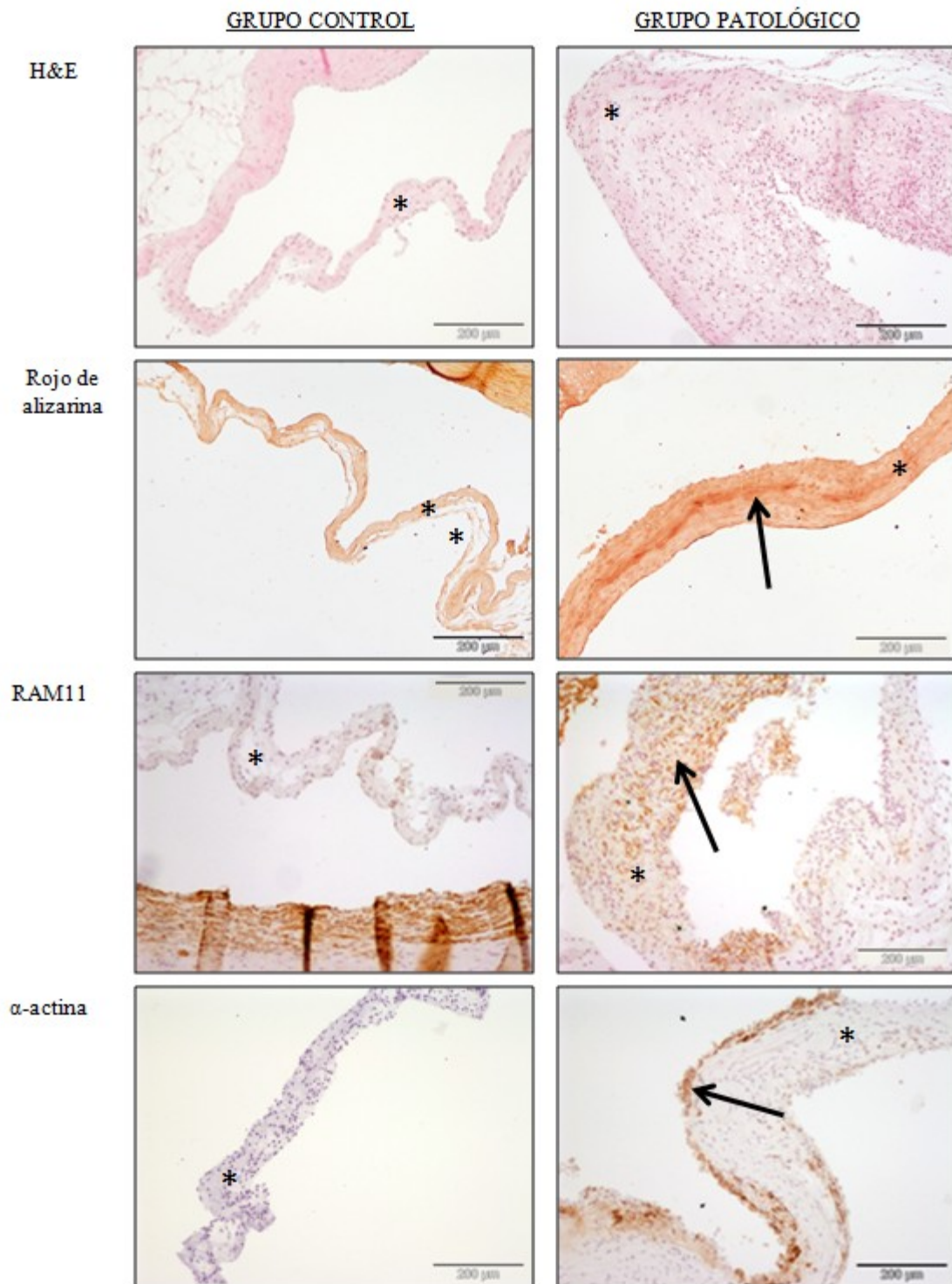


Figura R.3. Histología de las válvulas de conejo. En la tinción H&E se aprecia un engrosamiento de la VA (*) en el grupo patológico mientras que en la tinción rojo de alizarina se observa, además del engrosamiento, la aparición de depósitos de calcio (flecha). En las IHQ para la detección de macrófagos (RAM11) y miofibroblastos (α -actina) se observa mayor cantidad de tinción en las VA del grupo patológico (flecha).

1.1. ESTUDIO DE PROTEÓMICA DIFERENCIAL UTILIZANDO VÁLVULA AÓRTICA DE CONEJO

El análisis de proteómica diferencial de muestras de tejido de válvulas aórticas de conejo constó de un experimento 2D-DIGE con 6 geles bidimensionales, según las condiciones de la tabla MM.2. Las imágenes fluorescentes se exportaron al programa *DeCyder*. Se encontraron 15 manchas proteicas diferencialmente expresadas ($p \leq 0.05$, Average ratio > 1.5 o < -1.5), de las cuales 5 estaban aumentadas en el grupo patológico y 10 en el control (R.4.A).

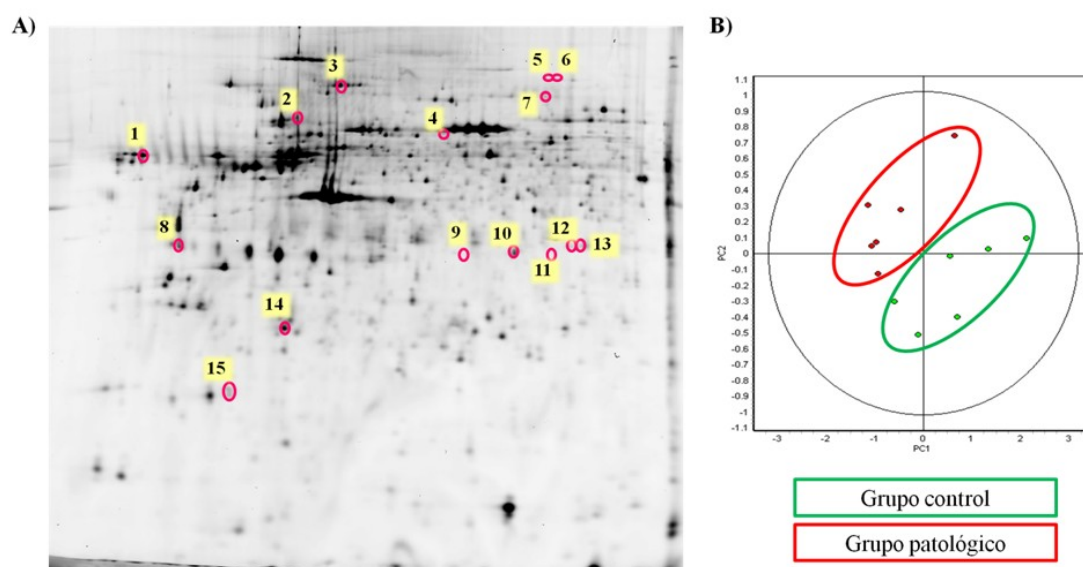


Figura R.4. Resultados del 2D-DIGE de válvula de conejo. Se muestra la imagen de un gel representativo del estudio donde aparecen indicadas las manchas proteicas diferencialmente expresadas (A). Además, en el análisis de componentes principales se observa una buena separación de los grupos experimentales de estudio (B).

También se realizó un ACP empleando las manchas proteicas diferenciales, lo que nos permitió ver que las muestras se agrupaban en función de los dos grupos experimentales (R.4.B).

Los posteriores análisis mediante MALDI-TOF/TOF permitieron la identificación de 8 manchas proteicas que correspondieron a 8 proteínas. Las proteínas identificadas que estaban aumentadas en el grupo patológico fueron las siguientes: calreticulina, transglutaminasa 2 y ATPasa del retículo endoplasmático transicional. Mientras que la albúmina sérica, la cadena α -1 de la tropomiosina, la cadena B de la L-lactato deshidrogenasa, la cadena ligera de la miosina 3 y la cadena ligera reguladora de la

miosina 2 (isoforma de músculo cardiaco/ventricular) estaban aumentadas en controles. La relación de manchas proteicas alteradas y sus identificaciones se encuentra en la tabla R.1. Además, se incluyen los resultados estadísticos y la función principal de cada una de ellas.

	Nº ACCESO (UniProt)	NOMBRE DE LA PROTEÍNA	RELACIÓN C/P	P-VALOR	FUNCIÓN
1	P15253	Calreticulina	-2.38	0.013	Chaperona
2	G1SK42	Tranglutaminasa-2	-1.85	0.025	Aciltransferasa
3	P55072	ATPasa del retículo endoplasmático transicional	-1.67	0.038	Hidrolasa
4	P49065	Albúmina sérica	1.74	0.011	Antioxidante / Transporte
5	-	No identificada	-1.57	0.039	
6	-	No identificada	-1.74	0.032	
7	-	No identificada	1.68	0.004	
8	P58772	Cadena α -1 de la Tropomiosina	5.28	0.046	Proteína muscular
9	-	No identificada	1.54	0.036	
10	P13490	Cadena B de la L-Lactato deshidrogenasa	1.67	0.023	Oxidorreductasa
11	-	No identificada	1.63	0.031	
12	-	No identificada	1.61	0.034	
13	-	No identificada	1.51	0.038	
14	G1T375	Cadena ligera de la Miosina 3	5.41	0.040	Proteína muscular
15	Q7M2V4	Cadena ligera reguladora de la Miosina 2, isoforma músculo cardiaco/ventricular	6.03	0.041	Proteína muscular

Tabla R.1. Identificaciones tras el análisis 2D-DIGE del modelo animal. Se muestra el número de mancha proteica, el número de acceso, los resultados estadísticos (*p*-valor según el análisis de *t*-Student y cociente de variación control/paciente) y función principal.

1.2. Validación de las variaciones proteicas encontradas mediante SRM

Para las validaciones de modelo animal, se realizó un experimento mediante SRM utilizando el plasma de los animales. De esta forma, tratamos de localizar aquellas proteínas cuyas alteraciones se reflejaran a nivel de plasma, ya que presentan mayor valor como biomarcadores.

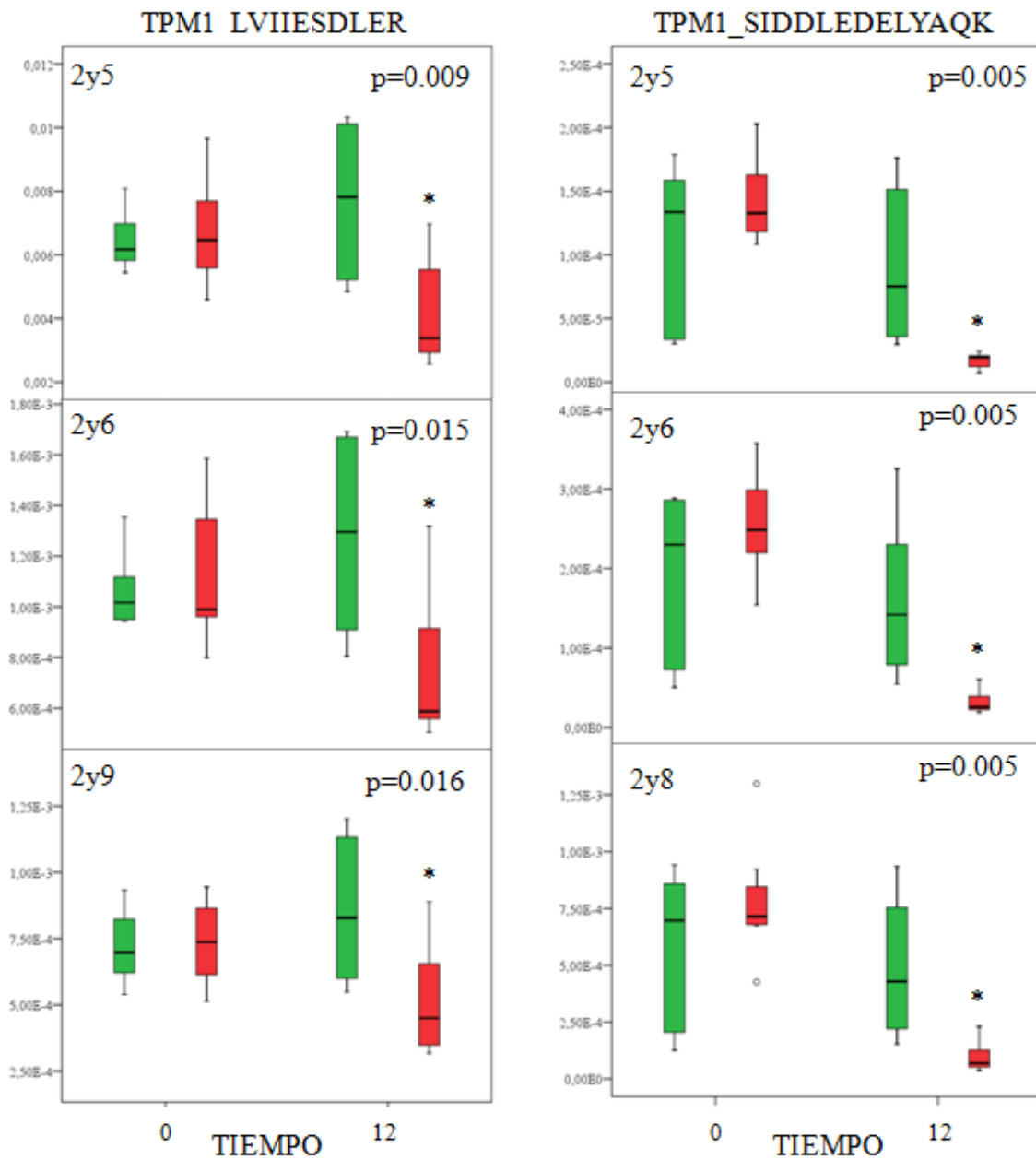


Figura R.5. Cuantificación mediante SRM de las 3 transiciones para cada uno de los 2 péptidos de la tropomiosina 1 (LVIIESDLER y SIDDLEDELYAQK). Se muestra el valor de significación (calculado mediante *t*-Student) correspondiente a la comparación entre el grupo control y el patológico al final del modelo (T=12 semanas).

Las miosinas no se detectaron en el plasma, por lo que no pudieron analizarse (ni la cadena ligera de la miosina 3, ni la cadena ligera reguladora de la miosina 2). Del resto de proteínas, la tropomiosina 1 se encontró disminuida en el grupo patológico, al igual

que sucedió en el tejido. El resto de cambios tisulares no se reflejaron a nivel plasmático.

Se midieron los niveles de proteína a tiempo 0 y al final del estudio, para comprobar que las variaciones habían tenido lugar a lo largo del estudio. En la figura R.5 se muestran los péptidos y las transiciones analizadas, señalándose el valor de significación calculado mediante *t*-Student de cada uno de ellos al final del estudio.

2. ESTUDIO INTEGRADO DE LA ESTENOSIS AÓRTICA DEGENERATIVA EN MUESTRAS HUMANAS

Realizamos estudios proteómicos y metabolómicos utilizando tanto plasma como tejido, con el objetivo de integrar los resultados obtenidos. El plasma es una muestra muy utilizada en la búsqueda de biomarcadores debido a su fácil obtención, mientras que los análisis de tejido proporcionan información de los mecanismos moleculares que ocurren a nivel local. Por eso, el análisis de los 2 tipos de muestra proporciona información complementaria de gran valor. En estos estudios, hemos empleado pacientes con IA como controles para aislar los cambios debidos a calcificación. Por último, hicimos un estudio final del papel de la enfermedad arterial coronaria (EAC) subyacente en la EAD con 2 tipos de controles: trasplantes y pacientes con IA.

2.1. EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS HUMANAS EMPLEADAS EN LOS ESTUDIOS

En primer lugar, las muestras procedentes de reemplazos valvulares y trasplantes se estudiaron a nivel macroscópico, observándose que las muestras con EAD presentaban un notable engrosamiento de las valvas así como una importante calcificación ectópica. Las VA controles, tanto procedentes de pacientes con IA como de trasplantes, se caracterizaron por su flexibilidad, aspecto traslúcido y ausencia de calcificación.

A continuación, se realizó un estudio histológico de la VA humana con y sin calcificación. En el caso de las muestras con EAD, se observó la existencia de macrófagos (CD68) y miofibroblastos (α -actina), acumulación de lípidos, denudamiento del endotelio y desplazamiento y alteración de la lámina elástica subendotelial, con engrosamiento de la capa fibrosa (Figura R.6). En cambio, las VA control no presentaron calcificación y la presencia de macrófagos y miofibroblastos era

notablemente menor. En estas válvulas se podían diferenciar claramente las capas fibrosa y ventricular, además de las capas de endotelio en ambos lados externos de la valva.

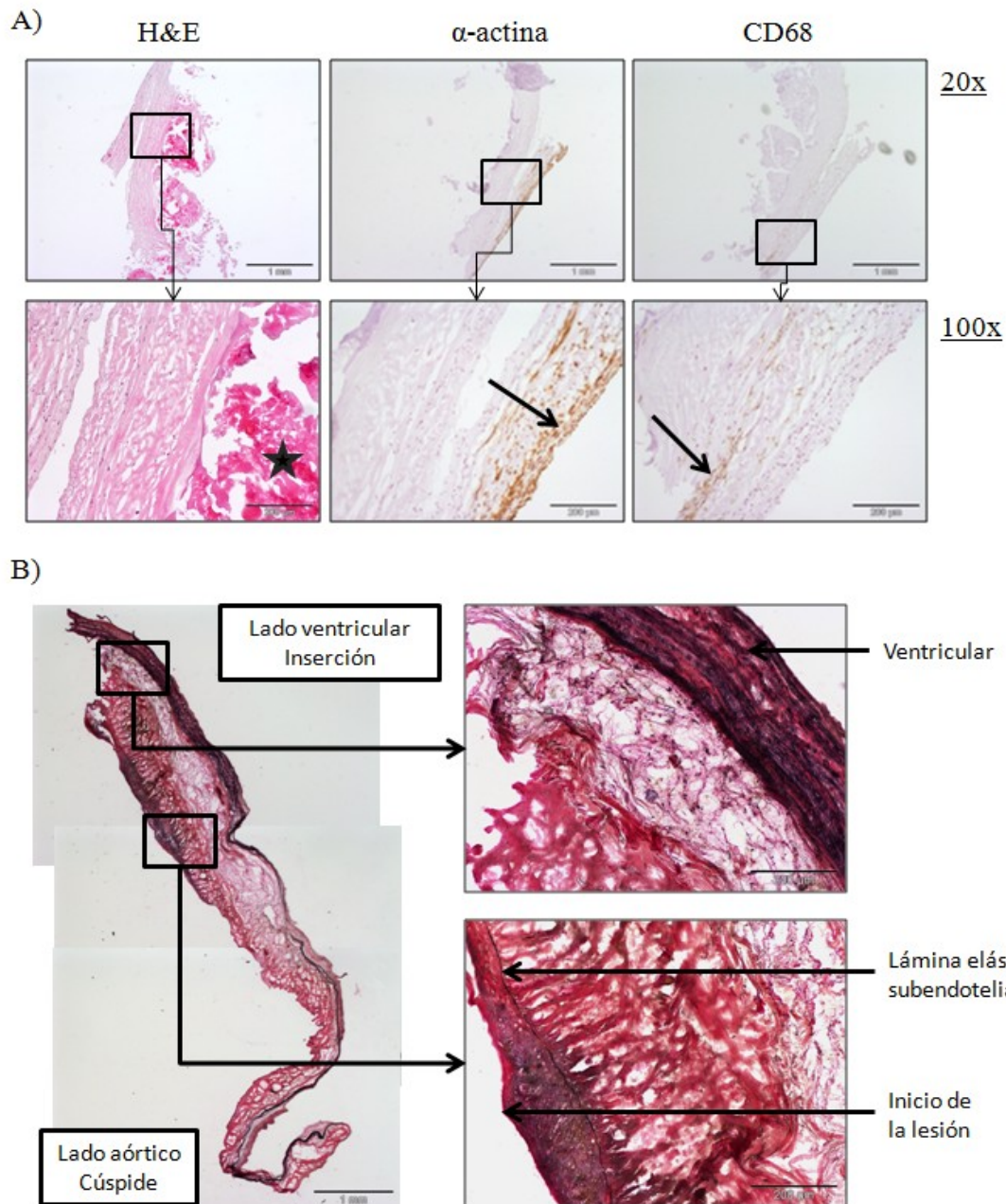


Figura R.6. Tinciones histológicas de una VA estenótica. A) Tinción de H&E en la que se observa el nódulo de calcio (estrella) e IHQ de α -actina (miofibroblastos) y CD68 (macrófagos). Se señalan con una flecha las zonas con tinción positiva. B) Tinción de fibras elásticas de una región menos afectadas. Aún se conserva la estructura de las fibras elásticas de la capa ventricular. Sin embargo, se aprecia un acúmulo de lípidos en la región subendotelial (entre la zona de inicio de la lesión y la lámina elástica subendotelial). La lámina elástica se irá desplazando según aumenta la acumulación de lípidos y células inflamatorias, hasta perder completamente su estructura.

2.2. ESTUDIO “-ÓMICO” EN MUESTRAS DE PLASMA HUMANO

El plasma humano es una muestra ampliamente utilizada en la búsqueda de biomarcadores debido, en parte, a que se obtiene de forma poco invasiva. Además, es una muestra fundamental para el diagnóstico de enfermedades y su control terapéutico, que se analiza de forma rutinaria en todos los laboratorios de análisis clínicos.

2.2.1. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE PLASMA MEDIANTE 2D-DIGE

El estudio de expresión diferencial de proteínas mediante 2D-DIGE en plasma de pacientes con EAD frente a pacientes con IA se realizó utilizando 6 individuos de cada grupo utilizando las condiciones de la tabla MM.2. Los individuos se seleccionaron para evitar diferencias significativas en los factores de riesgo cardiovasculares entre los dos grupos de estudio y tener así poblaciones lo más homogéneas posibles (Tabla R.2). Los detalles del protocolo utilizado se encuentran en el apartado 2 de Material y Métodos.

	IA (n=6)	EA (n=6)	P-VALOR
Edad	70.33±6.62	73.17±2.48	0.35
Sexo (%Hombres/Mujer)	83 / 17	83 / 17	1.00
FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR			
% Obesidad	33	17	1.00
% HTA	67	83	1.00
% Dislipemia	33	33	1.00
% Diabetes	17	17	1.00
% Fumadores	0	0	1.00
% Enfermedad coronaria	67	67	1.00

Tabla R.2. Características clínicas de los individuos utilizados en el análisis 2D-DIGE de plasma. La significación estadística se calculó mediante t-Student en el caso de edad (por ser una variable continua) y mediante el estadístico exacto de Fisher en el resto de casos (variables nominales)

Utilizando el *DeCyder*, se realizó un análisis estadístico mediante una *t*-Student ($p \leq 0.05$) y se excluyeron aquellas manchas proteicas que no aparecieran en el 90% de los geles y/o que no presentaran un cociente de variación mayor a ± 1.5 . Tras la aplicación de estos criterios, encontramos 24 manchas proteicas diferencialmente expresadas (Figura R.7C), 18 aumentadas y 6 disminuidas en EAD.

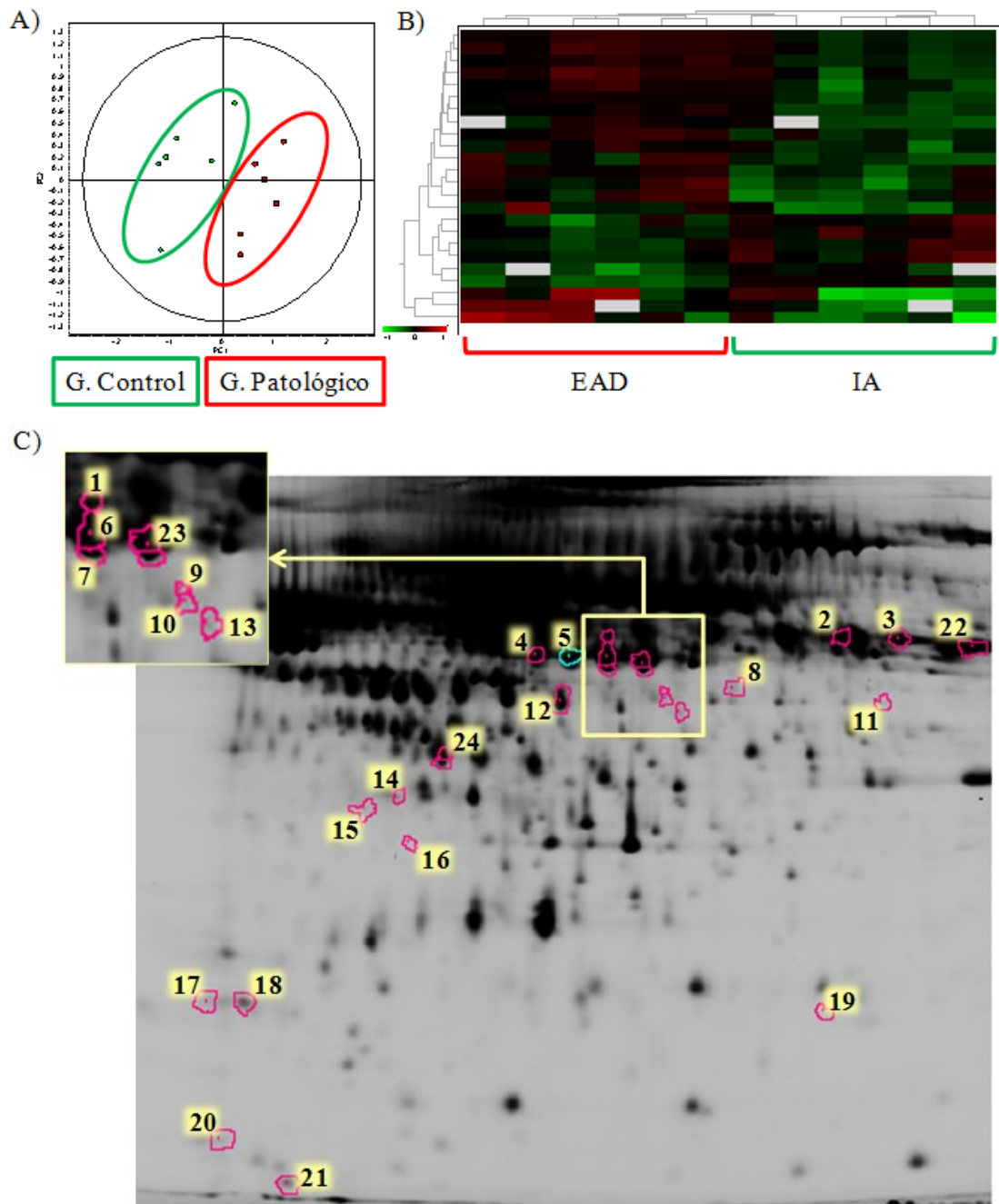


Figura R 7. Resultados del 2D-DIGE de plasma. Los análisis multivariantes de componentes principales (A) y agrupación jerárquica (B) mostraron una buena separación de los grupos experimentales. En la imagen también se muestra el gel maestro indicando las manchas proteicas diferencialmente expresadas (C).

Para confirmar una buena separación de los grupos de estudio se realizaron análisis de ACP y agrupación jerárquica empleando las manchas proteicas diferencialmente expresadas (Figura R.7A y B).

	Nº ACCESO (UniProt)	NOMBRE DE LA PROTEÍNA	RELACIÓN C/P	P-VALOR	FUNCIÓN	MM KDa, TEÓRICO	pI, TEÓRICO
1	Q14624	Cadena pesada H4 del inhibidor de la inter- α -tripsina	-1.68	0.004	Inhibidor de proteasas/fase aguda	103357	6,51
2	P02675	Cadena β del fibrinógeno	-1.56	0.006	Coagulación	55928	8.54
3	P02675	Cadena β del fibrinógeno	-1.8	0.009	Coagulación	55928	8.54
4	P02679	Cadena γ del fibrinógeno	-1.6	0.003	Coagulación	51511	5.37
5	P02679	Cadena γ del fibrinógeno	-1.61	0.002	Coagulación	51511	5.37
6	P02679	Cadena γ del fibrinógeno	-1.64	0.003	Coagulación	51511	5.37
7	P02679	Cadena γ del fibrinógeno	-1.73	0.020	Coagulación	51511	5.37
8	Q03591	Proteína 1 relacionada con el factor H del complemento	-1.95	0.015	Activación del complemento	37650	7.39
9	Q03591	Proteína 1 relacionada con el factor H del complemento	-1.66	0.012	Activación del complemento	37650	7.39
10	Q03591	Proteína 1 relacionada con el factor H del complemento	-2.01	0.015	Activación del complemento	37650	7.39
11	Q03591	Proteína 1 relacionada con el factor H del complemento	-1.95	0.020	Activación del complemento	37650	7.39
12	-	No identificada	-2.7	0.039			
13	-	No identificada	-2.96	0.017			
14	P00748	Factor de coagulación XII	1.72	0.029	Hidrolasa, proteasa / Coagulación	67792	8.04
15	-	No identificada	1.66	0.011			
16	P01008	Antitrombina III	1.7	0.032	Inhibidor de proteasas / Coagulación	52602	6.32
17	P0C0L4	Complemento C4-A	1.64	0.031	Vía del complemento	192785	6.66
	P0C0L5	Complemento C4-B			Vía del complemento	192751	6.89
18	P0C0L4	Complemento C4-A	1.79	0.024	Vía del complemento	192785	6.66
	P0C0L5	Complemento C4-B			Vía del complemento	192751	6.89
19	P00738	Haptoglobina	-3.48	0.037	Fase aguda	45205	6.13
20	P04004	Vitronectina	-1.54	0.036	Adhesión celular	54305	5.55
21	P02655	Apolipoproteína C-II	-1.95	0.042	Degradación y transporte de lípidos	11283	4.64
22	P02675	Cadena β del fibrinógeno	-1.71	0.018	Coagulación	55928	8.54
23	P02679	Cadena γ del fibrinógeno	-1.65	0.004	Coagulación	51511	5.37
24	Q14624	Cadena pesada H4 del inhibidor de la inter- α -tripsina	1.94	0.001	Inhibidor de proteasas / Fase aguda	103357	6,51
	P10909	Clusterina			Chaperona / Apoptosis	52494	5.88

Tabla R.3. Identificaciones tras el análisis 2D-DIGE de plasma. Se muestra el número de mancha proteica, el número de acceso, los resultados estadísticos (p -valor según el análisis de t -Student y cociente de variación control/paciente), función principal, punto isoelectrico y masa molecular teórica.

Las manchas de interés se escindieron de los geles y se analizaron mediante MALDI-TOF/TOF. De las 24, se identificaron 21 que correspondieron a 12 proteínas únicas (Tabla R.3.). Se encontraron aumentadas en EAD las cadenas β (FIBB) y γ (FIBG) del fibrinógeno (3 y 5 manchas proteicas, respectivamente), la proteína 1 relacionada con el

factor H del complemento (CFHR1) (4 manchas proteicas), la haptoglobina, la vitronectina, la apolipoproteína CII (ApoCII) y la cadena pesada H4 del inhibidor de la inter- α -tripsina (ITIH4). Estaban disminuidas en EAD el factor de coagulación XII, la antitrombina III y el complemento 4 (A y B) (2 manchas proteicas). En el caso de las manchas proteicas 17 y 18, el análisis mediante MS proporcionó dos identificaciones con la misma puntuación: complemento C4A y complemento C4B. Este se debe a la homología existente entre las dos: el número de aminoácidos de las dos es el mismo, con una homología de más del 99% (169) y los fragmentos analizados por MS/MS aparecen en ambas. En el caso de la mancha proteica 24, se obtuvo una mezcla de dos proteínas en la identificación: la cadena pesada H4 del inhibidor de la inter- α -tripsina y la clusterina. En la tabla se muestra la identificación de cada mancha proteica con los resultados estadísticos y la función.

Se realizó una clasificación de las proteínas encontradas en base a su función, teniendo en cuenta la base de datos Uniprot (Figura R.8). Se observaron dos grupos predominantes: proteínas implicadas en inflamación/respuesta inmune y proteínas implicadas en coagulación.

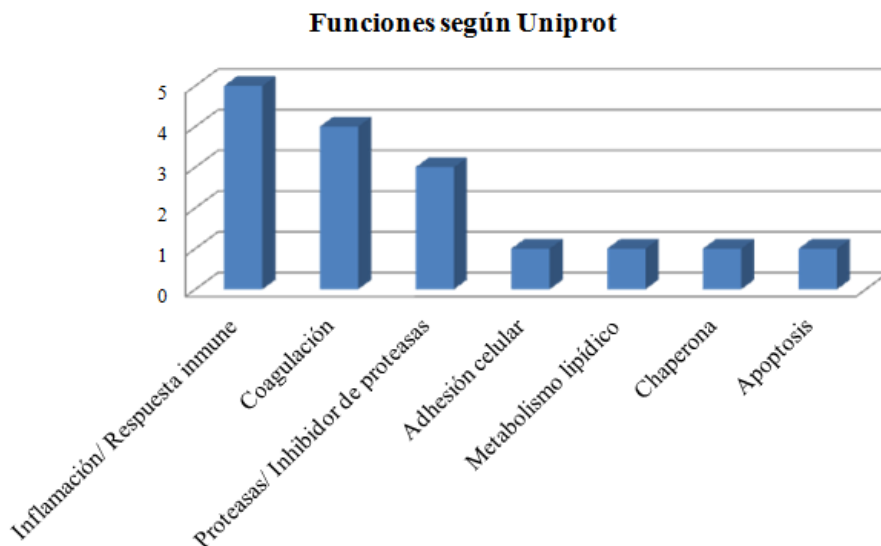


Figura R.8. Funciones principales de las proteínas encontradas en el 2D-DIGE de plasma.

2.2.1.1. Validaciones mediante ensayo de turbidimetría

Las validaciones de plasma se realizaron mediante ensayos de turbidimetría, que proporcionan una cuantificación absoluta de la proteína y, además, hay que destacar que

son fácilmente aplicables en el entorno clínico. Fueron validadas la antitrombina III y la haptoglobina, ambas en un grupo independiente de individuos formado por 9 pacientes con IA y 38 con EAD (Tabla R.4).

	IA (n=9)	EAD (n=38)	P-VALOR
Edad	65.56±12.65	74.18±8.09	<0.05 *
Sexo (%Hombres/Mujer)	78 / 22	50 / 50	0.160
FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR			
% Obesidad	44	24	0.237
% HTA	56	82	0.183
% Dislipemia	33	53	0.461
% Diabetes	0	29	0.092
% Fumadores	0	21	0.323
% Enfermedad coronaria	11	32	0.410

Tabla R.4. Características clínicas de los individuos utilizados en la validación mediante turbidimetría. La significación estadística se calculó mediante *t*-Student en el caso de edad (por ser una variable continua) y mediante el estadístico exacto de Fisher en el resto de casos (variables nominales)

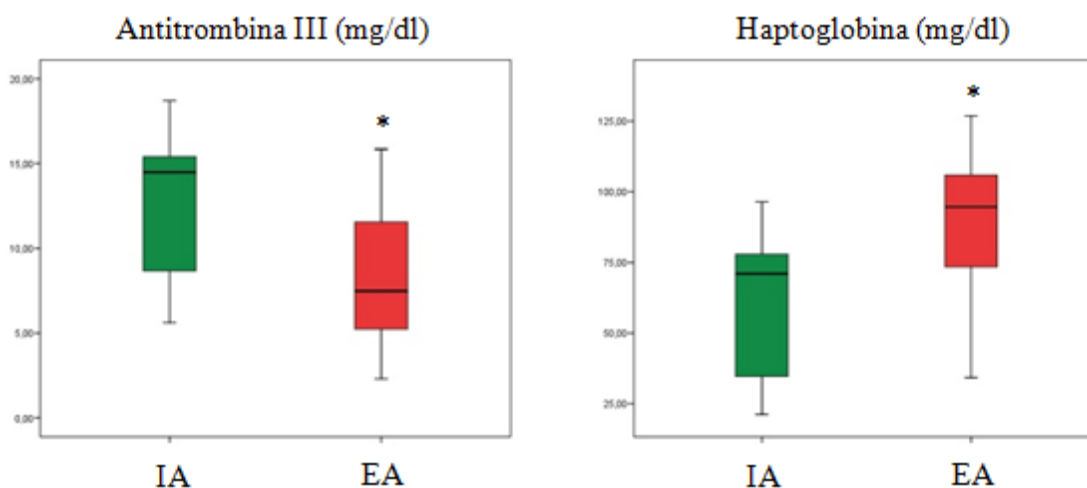


Figura R.9. Validación mediante turbidimetría. Niveles de antitrombina III y haptoglobina encontrados en los dos grupos experimentales. . La significación estadística se calculó mediante *t*-Student en el caso de las variables continuas (edad, antitrombina III y haptoglobina) y mediante el estadístico exacto de Fisher en el resto de casos (variables nominales). *, *p*-valor < 0.05.

Debido a la limitación en el número de análisis, los pacientes con EAD fueron agrupados de 2 en 2 (19 análisis). Los valores de antitrombina III fueron de 12.5±4.5 mg/dl en el grupo control y 8.0±3.9 en el estenótico, siendo el *p*-valor = 0.013. Por su

parte, los niveles de haptoglobina encontrados fueron de 62.5 ± 27.9 mg/dl en el grupo control y 88.3 ± 28.20 en el estenótico, siendo el p -valor = 0.016 (Figura R.9).

2.2.2. ANÁLISIS METABOLÓMICO DEL PLASMA

Para el estudio metabólico mediante GC-MS se emplearon 6 individuos de cada grupo, sin diferencias significativas en los factores de riesgo cardiovascular (Tabla R.5.).

	IA (n=6)	EA (n=6)	P-VALOR
Edad	66.83±8.35	73.5±2.43	0.09
Sexo (%Hombres/Mujer)	83 / 17	83 / 17	1.00
FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR			
% Obesidad	33	17	1
% HTA	50	83	0.545
% Dislipemia	50	50	1.00
% Diabetes	0	17	1.00
% Fumadores	0	0	1.00
% Enfermedad coronaria	50	67	1.00

Tabla R.5. Características clínicas de los individuos utilizados en el análisis metabólico de plasma. La significación estadística se calculó mediante t -Student en el caso de edad (por ser una variable continua) y mediante el estadístico exacto de Fisher en el resto de casos (variables nominales).

El protocolo utilizado se encuentra detallado en el apartado 3 de Material y Métodos. Se identificaron un total de 67 picos entre los que se encontraban el estándar interno (pentadecanoato de metilo), que eluyó a 24.063 min, y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) cuyo pico cromatográfico (35.109 min) no se consideró como un metabolito de interés ya que provenía del agente anticoagulante de los tubos de extracción de sangre empleados (BD Microtainer®). El área del pico del estándar interno se empleó para normalizar los valores del resto de picos cromatográficos. Dado que cada muestra se inyectó por triplicado, se empleó la media de las 3 áreas normalizadas para los análisis posteriores. En algunas ocasiones, durante el proceso de derivatización de la muestra pueden generarse dos o más productos secundarios procedentes de un mismo compuesto. Por este motivo, encontramos 8 metabolitos que dieron lugar, cada uno, a dos picos diferentes en el cromatograma. Estos 8 metabolitos fueron: valina, ácido oxálico, leucina, serina, treonina, ácido 2,3-

dihidroxi-butanoico, ácido aspártico y glucitol. En estos casos, se sumaron las áreas normalizadas de cada pico correspondiente a cada metabolito antes de realizar el resto de análisis con el objetivo de hacer un análisis cuantitativo real. Los metabolitos identificados junto con el tiempo de retención, el número CAS y la clasificación según sus grupos funcionales se encuentran en la tabla R. 6.

	NOMBRE	TIEMPO DE RETENCIÓN	NÚMERO CAS	TIPO
1	Ácido pirúvico	6.196	[127-17-3]	Ác. orgánicos/hidroxicilos
2	Ácido láctico	6.434	[50-21-5] L: [79-33-4] / D: [10326-41-7]	Ác. orgánicos/hidroxicilos
3	Ácido glicólico	6.728	[79-14-1]	Ác. orgánicos/hidroxicilos
4	Valina	6.905 / 10.085	[516-06-3] L: [72-18-4] / D: [640-68-6]	Amino metabolitos
5	Alanina	7.329	[302-72-7] L: [56-41-7] / D: [640-68-6]	Amino metabolitos
6	Ácido 2-hidroxi-butírico	7.933	[565-70-8]	Ác. orgánicos/hidroxicilos
7	Ácido oxálico	8.088 / 8.247	[144-62-7]	Ác. orgánicos/hidroxicilos
8	Leucina	8.498 / 11.529	[61-90-5]	Amino metabolitos
9	Ácido 3-hidroxi-butírico	8.704	[300-85-6]	Ác. orgánicos/hidroxicilos
10	Ácido 2-hidroxi-valérico	8.83	[617-31-2]	Ác. orgánicos/hidroxicilos
11	Isoleucina	8.991	[73-32-5]	Amino metabolitos
12	Ácido 3-metil-2-oxo-valérico	9.743	[1460-34-0]	Ác. orgánicos/hidroxicilos
13	Urea	11.028	[57-13-6]	Amino metabolitos
14	Serina	11.118 / 13.882	[302-84-1]	Amino metabolitos
15	Treonina	12.069 / 14.561	[72-19-5]	Amino metabolitos
16	Glicina	12.33	[56-40-6]	Amino metabolitos
17	Ácido succínico	12.512	[110-15-6]	Ác. orgánicos/hidroxicilos
18	Ácido glicérico	13.154	[473-81-4]	Ác. orgánicos/hidroxicilos
19	Ácido 2,3-dihidroxi-butanoico	13.521 / 13.769	[759-06-8]	Ác. orgánicos/hidroxicilos
20	Ácido tartrónico	14.692	[80-69-3]	Ác. orgánicos/hidroxicilos
21	Ácido aspártico	14.735 / 16.336	[56-84-8]	Amino metabolitos
22	Homocisteína	15.163	[454-29-5]	Amino metabolitos
23	Ácido 2,4-dihidroxi-butanoico		[1518-62-3]	Ác. orgánicos/hidroxicilos
24	Ácido 3,4-dihidroxi-butanoico	15.701	[51267-44-8]	Ác. orgánicos/hidroxicilos
25	Ácido aminomalónico	16.529	[1068-84-4]	Amino metabolitos
26	Ácido málico	17.064	[6915-15-7] L: [97-67-6] / D: [636-61-3]	Ác. orgánicos/hidroxicilos
27	5-oxo-prolina	17.586	[149-87-1]	Amino metabolitos
28	Ácido treónico	18.549	L: [7306-96-9] / D: [151152]	Ác. orgánicos/hidroxicilos
29	Ácido eritrónico	18.976	[13752-84-6]	Ác. orgánicos/hidroxicilos
30	Cistationina	18.978	[535-34-2]	Amino metabolitos
31	Ácido tetrahidroxipentanoico-1,4-lactona	20.029	Ribonolactona: [5336-08-3] Xylono-1,4-lactona: [15384-37-9] 1,4-Arabinolactona: [2782-04-9]	Ác. orgánicos/hidroxicilos

Tabla R.6. Metabolitos identificados.

	NOMBRE	TIEMPO DE RETENCIÓN	NÚMERO CAS	TIPO
32	Ácido trihidroxipentanoico	21.115	[29625-75-0]	Ác. orgánicos/hidroxicilos
33	5-hidroxitriptófano	21.275	[56-69-9]	Amino metabolitos
34	Glicerol-3-fosfato	23.425	[57-03-4]	Ác. orgánicos/hidroxicilos
35	Ácido ribónico	23.528	[710941-59-6]	Ác. orgánicos/hidroxicilos
36	Ácido cítrico	24.497	[77-92-9]	Ác. orgánicos/hidroxicilos
37	Ácido mirístico		[544-63-8]	Ácidos grasos
38	Fructosa	25.795	[57-48-7]	Carbohidratos
39	Glucosa	26.333	L: [921-60-8] / D: [50-99-7]	Carbohidratos
40	Galactosa	26.611	[26566-61-0]	Carbohidratos
41	N-acetilglucosamina	26.763	[7512-17-6]	Carbohidratos
42	Glucitol	26.862 / 27.004	[50-70-4]	Carbohidratos
43	Turanosa	27.255	[547-25-1]	Carbohidratos
44	Beta-D-glucopiranos	27.926	[492-61-5]	Carbohidratos
45	Ácido glucónico	28.197	[526-95-4]	Ác. orgánicos/hidroxicilos
46	Ácido palmítico	28.336	[57-10-3]	Ácidos grasos
47	Inositol	29.714	[6917-35-7]	Carbohidratos
48	Ácido heptadecanoico	30.068	[506-12-7]	Ácidos grasos
49	Ácido 6-hidroxi-1-naftenoacético	30.394	----	Aromáticos/esteroides
50	Ácido linoleico	31.201	[60-33-3]	Ácidos grasos
51	Ácido oleico	31.305	[112-80-1]	Ácidos grasos
52	Ácido cis-vaccénico	31.421	[506-17-2]	Ácidos grasos
53	Ácido esteárico	31.814	[57-11-4]	Ácidos grasos
54	Terbutalina	34.727	[23031-25-6]	Aromáticos/esteroides
55	Ácido araquídico	34.977	[506-30-9]	Ácidos grasos
56	Ribofuranosa		L: [24259-59-4] / D: [50-69-1]	Carbohidratos
57	Colesterol	44.755	[57-88-5]	Ácidos grasos
58	6-octadecanoato- α -D-glucopiranosido	45.396	----	Ácidos grasos
59	Monolinoleína	45.678	[2277-28-3]	Ácidos grasos

Tabla R.6. Continuación. Metabolitos identificados. Se muestra el tiempo de retención, el número CAS correspondiente (cuando existen números diferentes para los isómeros se muestra L o D, según corresponda) y el tipo según el grupo funcional.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando la plataforma online Metaboanalyst. Una vez importados los datos, se realizó una normalización en base a la mediana para reducir la variabilidad procedente de la técnica y los errores estadísticos debidos a la diferencia de concentraciones de los metabolitos. En concreto, la glucosa es mucho más abundante que todas las demás por lo que este paso es fundamental para obtener una distribución Gaussiana de los datos y evitar errores estadísticos en la detección de cambios significativos (168)

A continuación, se realizó el análisis estadístico de los datos mediante *t*-Student. Se encontraron 19 metabolitos con diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$,

average ratio > 2 o < -2) entre los dos grupos, todos ellos aumentados en el grupo con EAD: serina, ácido cítrico, ácido tartrónico, 6-octadecanoato- α -D-glucopiranosido, ácido succínico, 5-hidroxitriptófano, isoleucina, ácido málico, ácido aspártico, ácido aminomalónico, leucina, ácido glucónico, alanina, treonina, monolinoleína, 5-oxoprolina, ácido tetrahidroxipentanoico-1,4-lactona, glicina y glucitol (Tabla R.7)

	NOMBRE	RELACIÓN C/P	P-VALOR	TIPO	FUNCIÓN PRINCIPAL
1	Serina	4.22	0.0001	Amino metabolitos	Metabolismo de aminoácidos/proteínas
2	Ácido cítrico	7.75	0.0002	Ác. orgánicos/hidroxicos	Ciclo del ácido cítrico
3	Ácido tartrónico	3.11	0.0003	Ác. orgánicos/hidroxicos	Ciclo del ácido cítrico
4	6-octadecanoato- α -D-glucopiranosido	4.47	0.0006	Ácidos grasos	Desconocida
5	Ácido succínico	2.75	0.0013	Ác. orgánicos/hidroxicos	Ciclo del ácido cítrico
6	5-hidroxitriptófano	2.21	0.0016	Amino metabolitos	Coagulación
7	Isoleucina	3.39	0.0022	Amino metabolitos	Metabolismo de aminoácidos/proteínas
8	Ácido málico	4.11	0.0024	Ác. orgánicos/hidroxicos	Ciclo del ácido cítrico
9	Ácido aspártico	5.79	0.0027	Ác. orgánicos/hidroxicos	Metabolismo de aminoácidos/proteínas
10	Ácido aminomalónico	4.72	0.0030	Amino metabolitos	Metabolismo de aminoácidos/proteínas
11	Leucina	3.25	0.0042	Amino metabolitos	Metabolismo de aminoácidos/proteínas
12	Ácido glucónico	3.75	0.0047	Ác. orgánicos/hidroxicos	Reacciones oxido-reducción
13	Alanina	8.56	0.0051	Amino metabolitos	Metabolismo de aminoácidos/proteínas
14	Treonina	2.91	0.0061	Amino metabolitos	Metabolismo de aminoácidos/proteínas
15	Monolinoleína	3.37	0.0085	Ácidos grasos	Metabolismo lipídico
16	5-oxoprolina	3.28	0.0126	Amino metabolitos	Reacciones oxido-reducción
17	Ácido tetrahidroxipentanoico-1,4-lactona	3.19	0.0155	Ác. orgánicos/hidroxicos	Desconocida
18	Glicina	4.98	0.0253	Amino metabolitos	Metabolismo de aminoácidos/proteínas
19	Glucitol	2.10	0.0460	Carbohidratos	Reacciones oxido-reducción

Tabla R.7. Metabolitos significativamente alterados. Se muestra la relación entre controles y pacientes (C/P), el valor de significación estadística tras el análisis *t*-Student (*p*-valor), el grupo funcional y la función principal de cada uno.

Los análisis multivariantes realizados, ACP y agrupación jerárquica, demostraron una buena separación de los dos grupos de estudio (Figura R.10).

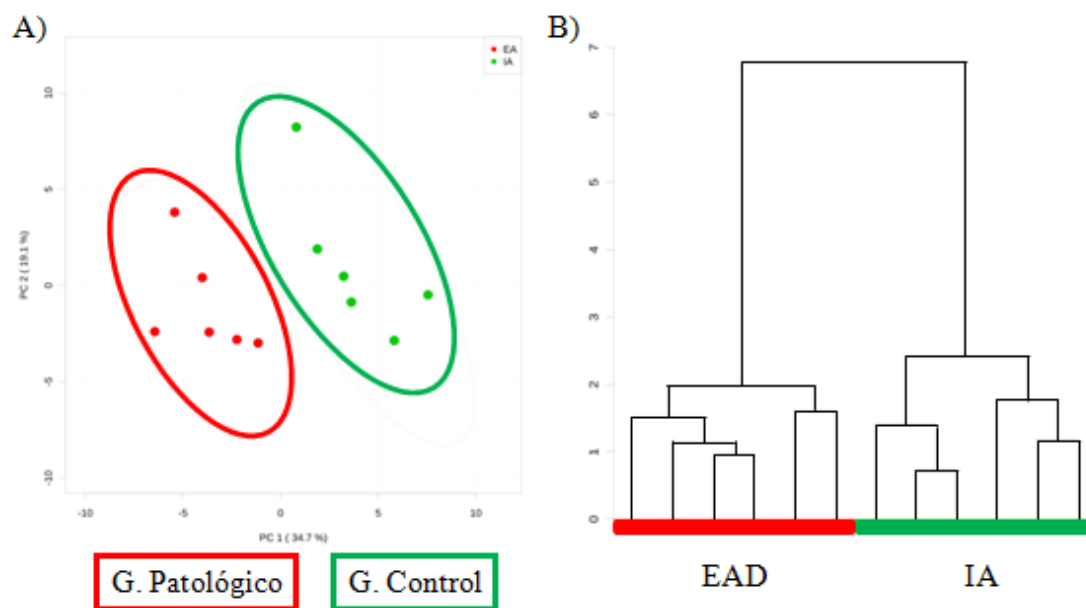


Figura R 10. Resultados del análisis metabolómico de plasma. Los análisis multivariantes de componentes principales (A) y agrupación jerárquica (B) mostraron una buena separación de los grupos experimentales.

2.3. ESTUDIO PROTEÓMICO A PARTIR DE MUESTRAS DE TEJIDO HUMANO

El objetivo de estos estudios es profundizar en los mecanismos moleculares, a nivel local, que están implicados en el desarrollo de la EAD. Para ello, hemos realizado dos tipos de estudios: análisis de histología molecular mediante el uso de MALDI-IMS y análisis proteómico diferencial mediante 2D-DIGE. Además, hemos profundizado en la relación molecular existente entre la aterosclerosis y la EAD mediante el análisis proteómico diferencial de VA clasificadas por la presencia/ausencia de enfermedad arterial coronaria (EAC) subyacente.

2.3.1. ANÁLISIS DE LA VÁLVULA ESTENÓTICA MEDIANTE HISTOLOGÍA MOLECULAR

Para la realización del análisis se estudiaron 3 regiones de una válvula estenótica, cada una de ellas con un grado de afectación diferente. Se utilizaron cortes consecutivos para la realización de las tinciones histológicas (figura R.11) y para la adquisición de las imágenes moleculares mediante MALDI-IMS.

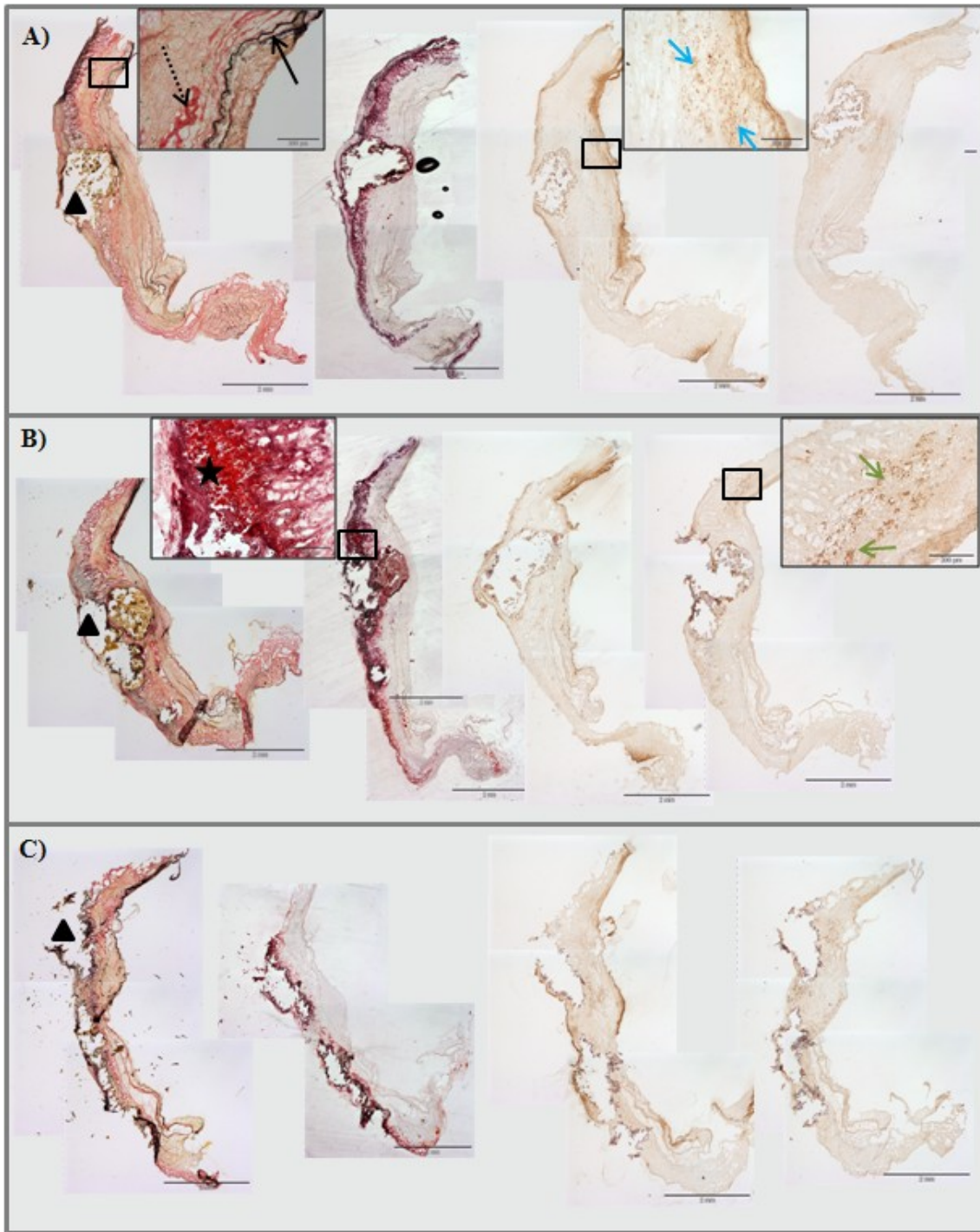


Figura R.11. Imágenes de las tinciones histológicas de las secciones analizadas por MALDI-IMS (A, B y C). De izquierda a derecha: tinción de fibras elásticas, tinción de lípidos e IHQ para α -actina y CD68. Se ha ampliado una zona característica en cada caso, señalando la zona calcificada (triángulo), fibras elásticas y colágeno (flecha negra continua y discontinua, respectivamente), miofibroblastos (flechas azules), acúmulo de lípidos (estrella) y macrófagos (flechas verdes).

Tras la adquisición de los espectros, se realizó una primera inspección manual de la distribución espacial de los picos y se seleccionaron, por su distribución en regiones

características de la lesión, los siguientes: 5059.681, 4300.155, 13984.11 y 14659.25 Da (Figura R.12).

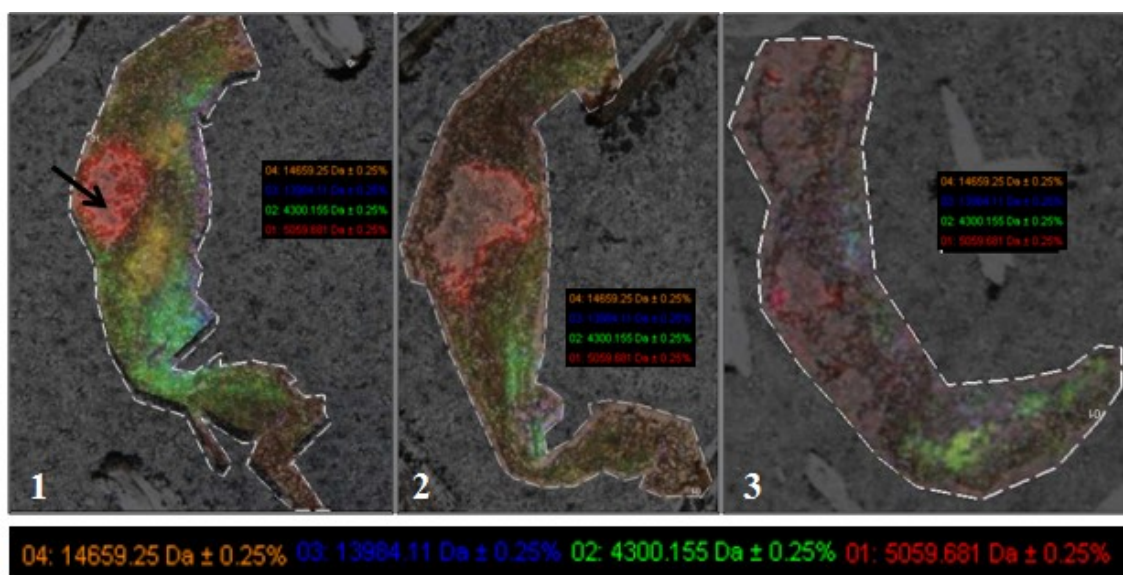


Figura R.12. Distribución espacial de los picos seleccionados manualmente. Destaca la zona calcificada, rica en fragmentos con una masa de 5059 Da.

A continuación, se realizó un análisis multivariante no supervisado para comprobar la existencia de diferentes zonas dentro de cada sección.

Primero se realizó un ACP para agrupar las diferentes zonas de la VA en función de la varianza de los espectros de masas de la superficie del tejido, extrayéndose 8 componentes de cada región (figuras R.13.A, R.14A y R.15A).

Además, el programa informático ClinPro Tools v2.2. permitió realizar, en base a los resultados del ACP, un análisis de agrupación jerárquica en el que se analizaron las relaciones entre las diferentes regiones separadas en el ACP, obteniéndose un dendograma en el que se muestran las distancias (similitudes) entre los diferentes grupos de picos (figuras R.13B, R.14B y R.15B).

Región 1

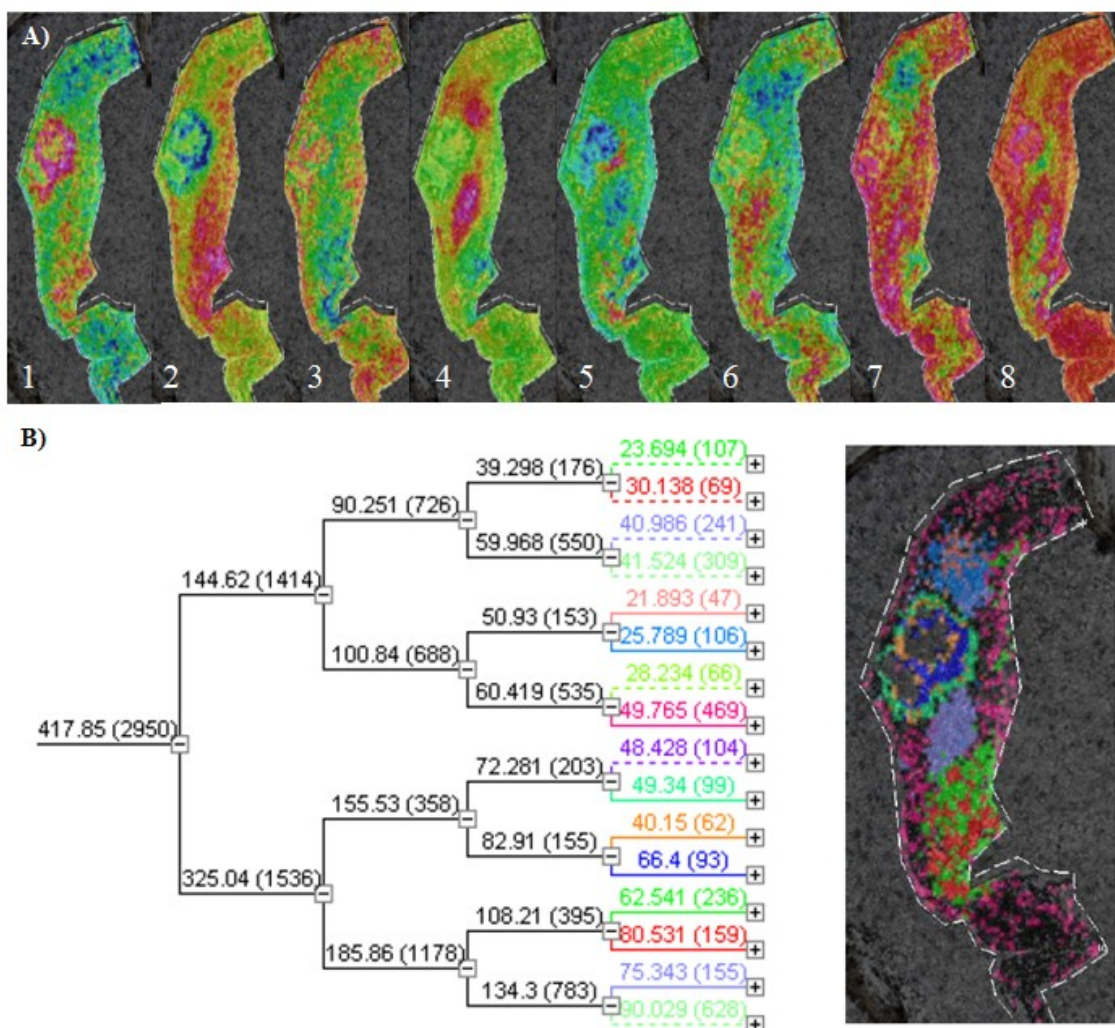


Figura R.13. Resultados del análisis multivariante tras el MALDI-IMS de la sección 1. Se muestran las imágenes con los picos de los 8 componentes extraídos tras el ACP (A). Además, está representado el dendrograma con las distancias entre los grupos y el número de picos que corresponden a cada uno (entre paréntesis) (B). La distribución superficial de cada grupo se encuentra representado en la imagen mediante un código de color.

Región 2

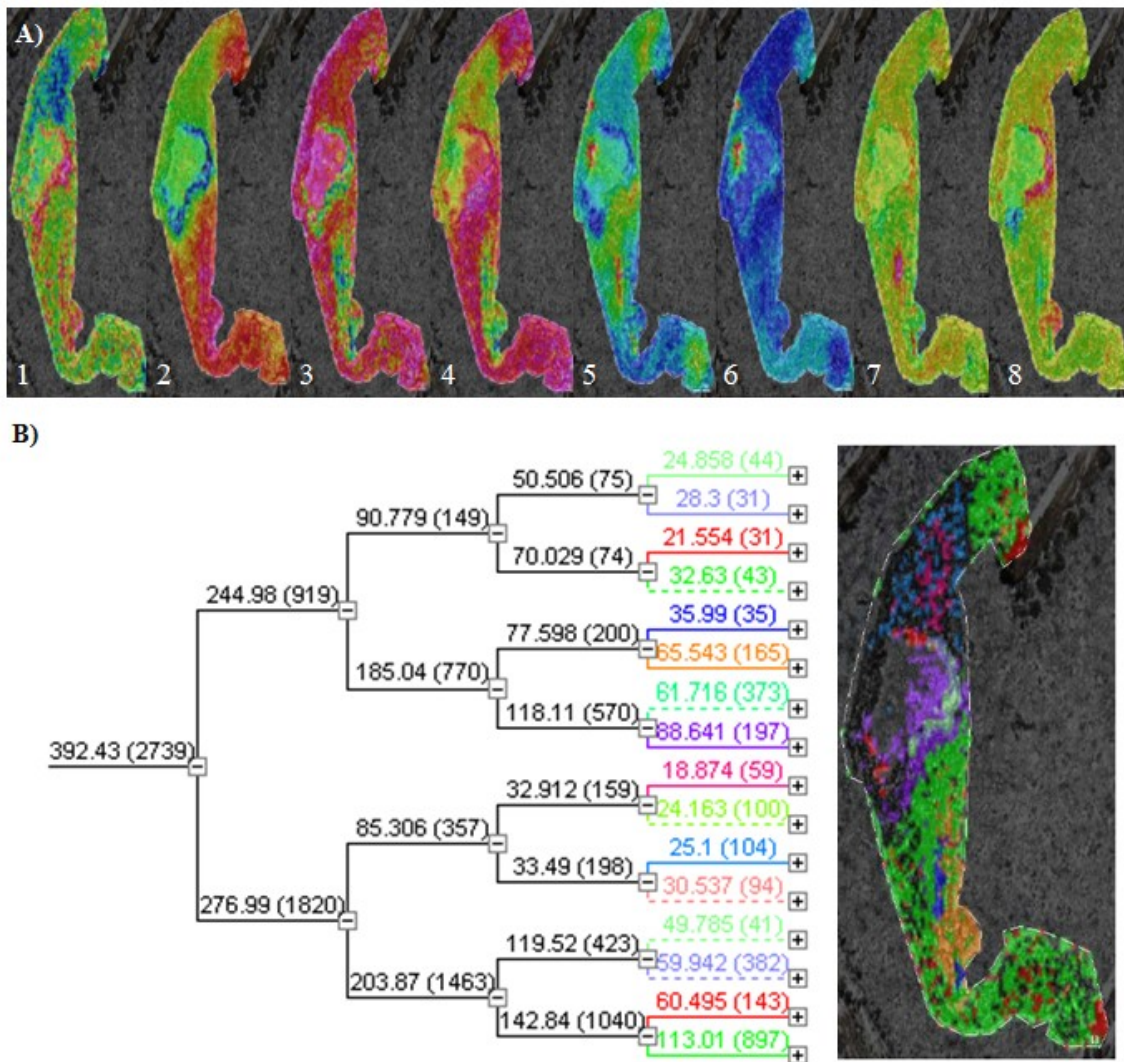


Figura R.14. Resultados del análisis multivariante tras el MALDI-IMS de la sección 2. Se muestran las imágenes con los picos de los 8 componentes extraídos tras el ACP (A). Además, está representado el dendrograma con las distancias entre los grupos y el número de picos que corresponden a cada uno (entre paréntesis) (B). La distribución superficial de cada grupo se encuentra representado en la imagen mediante un código de color.

Región 3

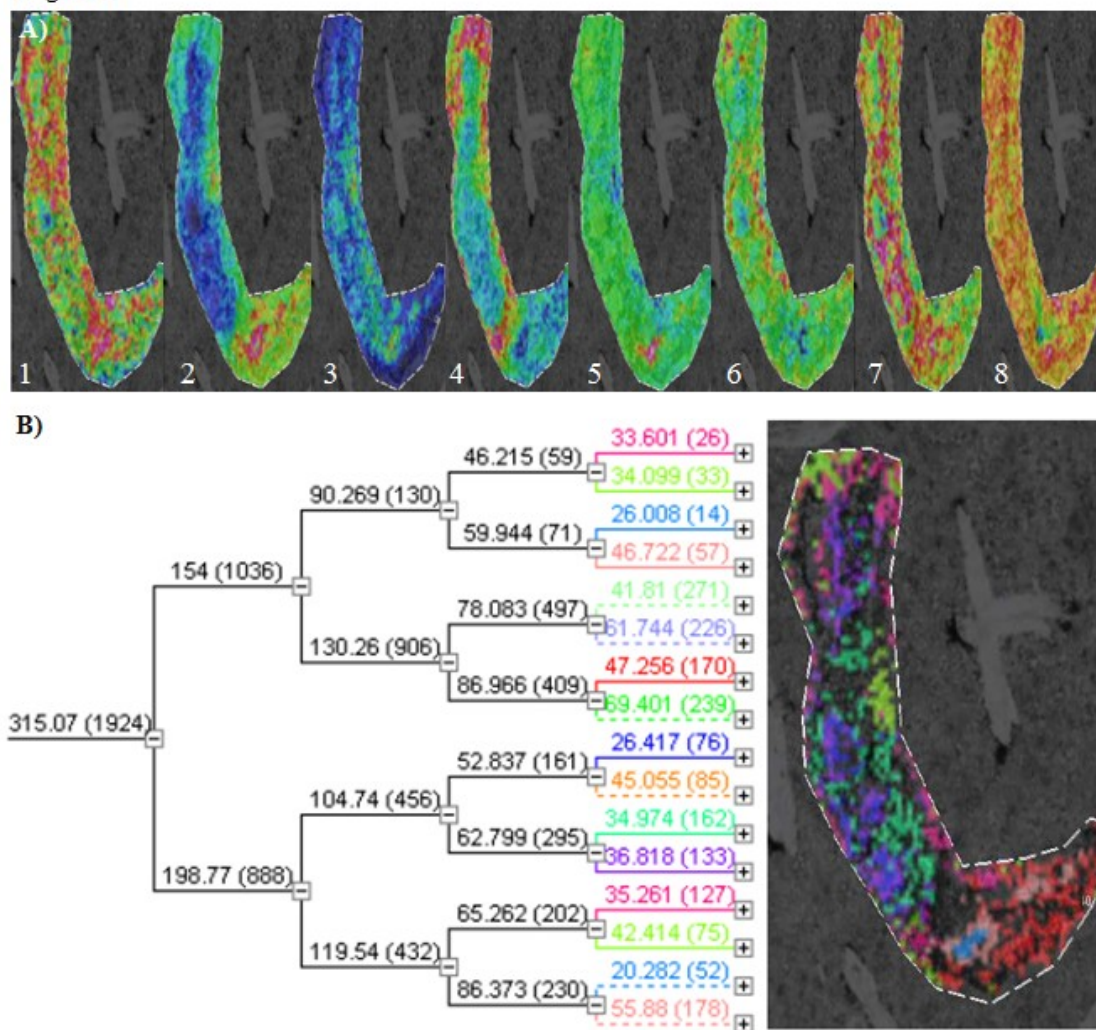


Figura R.15. Resultados del análisis multivariante tras el MALDI-IMS de la sección 3. Se muestran las imágenes con los picos de los 8 componentes extraídos tras el ACP (A). Además, está representado el dendrograma con las distancias entre los grupos y el número de picos que corresponden a cada uno (entre paréntesis) (B). La distribución superficial de cada grupo se encuentra representado en la imagen mediante un código de color.

2.3.2. ESTUDIO DE PROTEÓMICA DIFERENCIAL DE TEJIDO VALVULAR HUMANO MEDIANTE 2D-DIGE

En el estudio de expresión diferencial de tejido valvular mediante 2D-DIGE, utilizamos 4 individuos con IA y 5 con EAD, utilizando las condiciones reflejadas en la tabla MM.1. y según el protocolo detallado en el apartado 2 de Material y Métodos. Los individuos de los grupos de estudio se seleccionaron para evitar diferencias significativas en los factores de riesgo cardiovascular, buscando tener poblaciones lo más homogéneas posibles (Tabla R.8).

	IA (n=4)	EA (n=5)	P-VALOR
Edad	72.25±4.86	75.4±3.21	0.28
Sexo (%Hombres/Mujer)	75 / 25	40 / 60	0.52
FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR			
% Obesidad	25	40	1.00
% HTA	75	80	1.00
% Dislipemia	75	80	1.00
% Diabetes	50	40	1.00
% Fumadores	0	0	1.00
% Enfermedad coronaria	25	40	1.00

Tabla R.8. Características clínicas de los individuos utilizados en el análisis 2D-DIGE de tejido. La significación estadística se calculó mediante *t*-Student en el caso de edad (por ser una variable continua) y mediante el estadístico exacto de Fisher en el resto de casos (variables nominales).

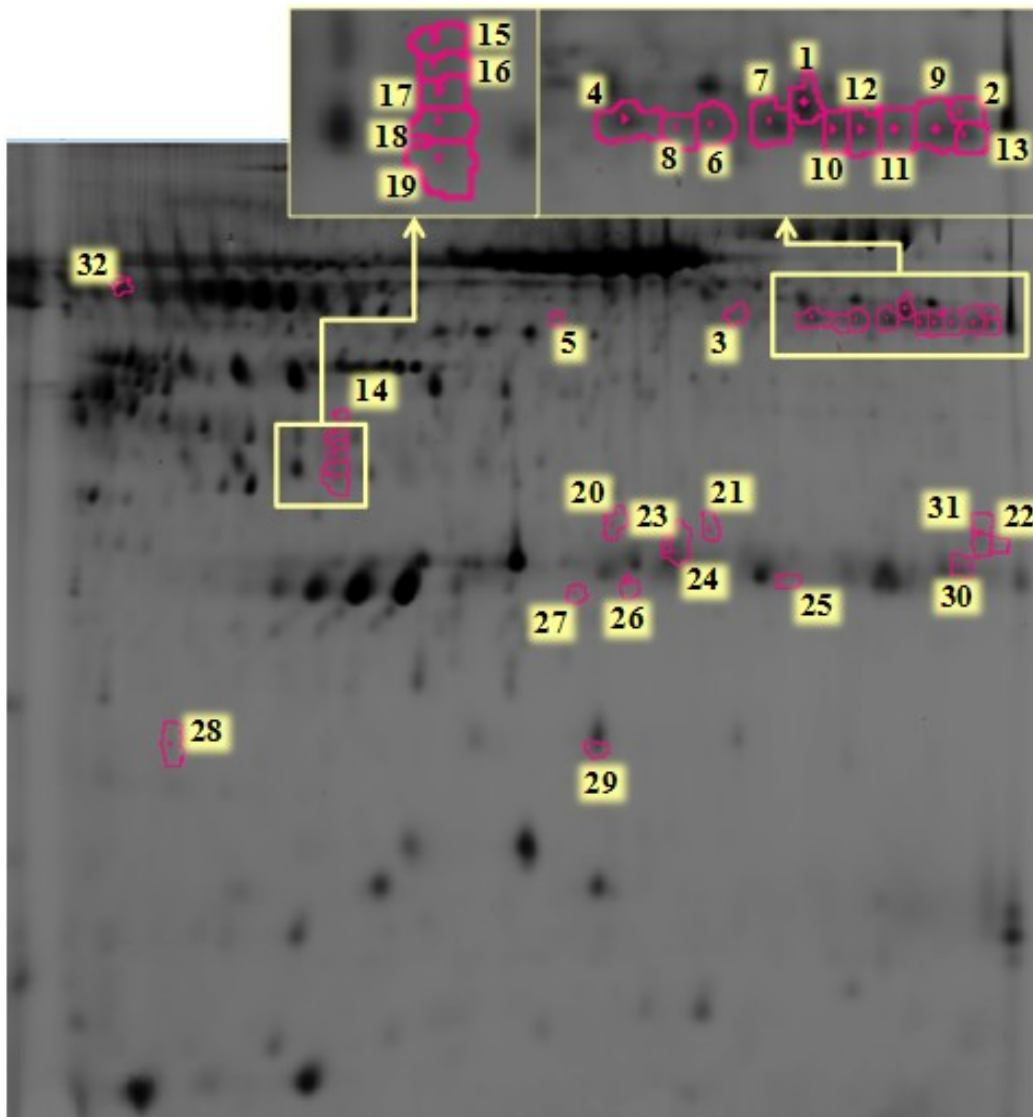


Figura R 16. Gel representativo del análisis 2D-DIGE de tejido en el que se indican las manchas proteicas diferencialmente expresadas.

Utilizando el programa *DeCyder*, se seleccionaron las manchas proteicas que se encontraron presentes en el 90% de los geles, con un cociente de variación mayor a ± 1.5 y estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$, calculado mediante *t*-Student). Tras la aplicación de estos criterios, encontramos 32 manchas proteicas diferencialmente expresadas (Figura R.16), 8 aumentadas y 24 disminuidas en EAD.

Se realizaron análisis multivariantes (ACP y agrupación jerárquica), empleando las manchas proteicas diferencialmente expresadas, para confirmar una buena separación de los grupos de estudio (Figura R.17).

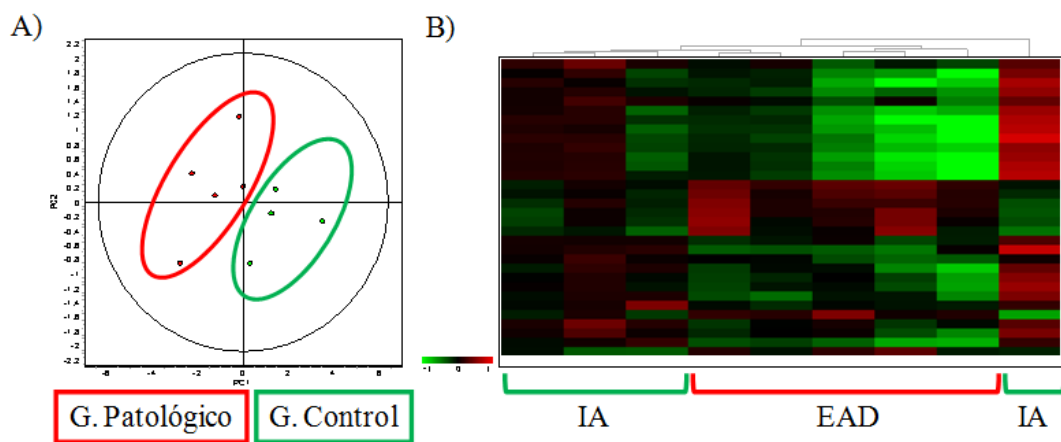


Figura R 17. Resultados del 2D-DIGE de tejido de pacientes. Se muestran los análisis multivariantes de componentes principales (A) y agrupación jerárquica (B)

Las manchas de interés se escindieron de los geles y se analizaron mediante MALDI-TOF/TOF. De las 32 manchas, se identificaron 20 que correspondieron a 11 proteínas únicas (Tabla R.9). Entre ellas, se encontraron aumentadas en EAD la proteína mimecan (u osteoglicina, 4 manchas proteicas) y la dermatopontina. Por el contrario aparecieron disminuidas en EAD la β -2-glicoproteína 1 (o apolipoproteína H), la proteína de unión al selenio 1, la albúmina (2 manchas proteicas), la proteína 1 de unión entre hialuronán y proteoglicano (HAPLN1), la α -enolasa (3 manchas proteicas), la 6-fosfogluconolactonasa, la proteína sérica amiloide A-1 y la región C de las cadenas λ y κ de la inmunoglobulina (2 y 3 manchas proteicas, respectivamente).

	Nº ACCESO (UniProt)	NOMBRE DE LA PROTEÍNA	RELACIÓN C/P	P-VALOR	FUNCIÓN	MM KDa, TEÓRICO	pI, TEÓRICO
1	P02749	β-2-glicoproteína 1	2.38	0.0086	Coagulación	38298	8.34
2	-	No identificada	3.39	0.0460			
3	Q13228	Proteína de unión al selenio 1	4.95	0.0275	Transporte proteínas	52390	5.93
4	-	No identificada	4.00	0.0087			
5	P02768	Albúmina	2.18	0.0320	Antioxidante / Transporte	69367	5.92
6	P10915	Proteína 1 de unión entre hialuronán y proteoglicano (HAPLN1)	4.50	0.0377	Adhesión celular	40166	7.1
7	P06733	α-enolasa	5.87	0.0212	Metabolismo de carbohidratos	47169	7.01
8	-	No identificada	5.80	0.0381			
9	P06733	α-enolasa	7.26	0.0316	Metabolismo de carbohidratos	47169	7.01
10	-	No identificada	4.29	0.0244			
11	P06733	α-enolasa	4.78	0.0424	Metabolismo de carbohidratos	47169	7.01
12	-	No identificada	4.98	0.0484			
13	-	No identificada	5.85	0.0169			
14	-	No identificada	-2.25	0.0014			
15	-	No identificada	-2.30	0.0036			
16	P20774	Mimecan	-2.24	0.0161	Metabolismo de carbohidratos	33922	5.46
17	P20774	Mimecan	-2.90	0.0111	Metabolismo de carbohidratos	33922	5.46
18	P20774	Mimecan	-2.83	0.0301	Metabolismo de carbohidratos	33922	5.46
19	P20774	Mimecan	-3.28	0.0359	Metabolismo de carbohidratos	33922	5.46
20	O95336	6-fosfogluconolactonasa	1.80	0.0141	Metabolismo de carbohidratos	27547	5.7
21	P02768	Albúmina	4.57	0.0125	Coagulación / Transporte	69367	5.92
22	-	No identificada	1.89	0.0238			
23	-	No identificada	2.61	0.0418			
24	P0CF74	Región constante de la cadena λ-6 de la Ig	2.67	0.0417	Respuesta inmune	11277	6.91
25	P01834	Region constante de la cadena κ de la Ig	2.97	0.0464	Respuesta inmune	11609	5.58
26	P01834	Region constante de la cadena κ de la Ig	2.85	0.0184	Respuesta inmune	11609	5.58
27	P0DJ18	Proteína sérica amiloide A-1	2.04	0.0322	Fase aguda	13532	6.28
28	Q07507	Dermatopontina	-2.41	0.0347	Adhesión celular	24005	4.7
29	-	No identificada	2.14	0.0121			
30	P01834	Region constante de la cadena κ de la Ig	2.53	0.0284	Respuesta inmune	11609	5.58
31	P0CG05	Región constanste de la cadena λ-2 de la Ig	3.54	0.0018	Respuesta inmune	11294	6.91
	P0CG06	Región constante de la cadena λ-3 de la Ig			Respuesta inmune	11237	6.91
	P0CF74	Región constante de la cadena λ-6 de la Ig			Respuesta inmune	11277	6.91
32	-	No identificada	-2.17	0.0286			

Tabla R.9. Identificaciones tras el análisis 2D-DIGE de tejido. Se muestra el número de la mancha proteica, el número de acceso, los resultados estadísticos (*p*-valor según el análisis de *t*-Student y cociente de variación control/paciente), función principal, punto isoeléctrico y masa molecular teórica.

2.4. ESTUDIO PROTEÓMICA DIFERENCIAL UTILIZANDO TEJIDO VALVULAR PROCEDENTE DE INDIVIDUOS CON ATEROSCLEROSIS CORONARIA

En el estudio de expresión diferencial de tejido valvular mediante 2D-DIGE, utilizamos 6 grupos experimentales: válvulas controles procedentes de trasplantes (T), de individuos con IA y de individuos con EAD, separados en dos grupos según la presencia/ausencia de EAC. El número de individuos utilizados en cada grupo así como sus características clínicas se encuentran detallados en la tabla R.10.

	CON EAC			SIN EAC		
	T (n=3)	IA (n=3)	EAD (n=6)	T (n=3)	IA (n=3)	EAD (n=6)
Edad	58±5.57	69±11.36	67±10.90	65±2.30	71±4.51	73±9.03
Sexo (%Hombres/Mujer)	67 / 33	33 / 67	33 / 67	100 / 0	67 / 33	50 / 50
FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR						
% Obesidad	67	0	50	33	100	33
% HTA	0	67	67	33	67	67
% Dislipemia	67	100	67	100	67	67
% Diabetes	0	0	17	0	0	17
% Fumadores	0	0	50	67	67	33

Tabla R.10. Características clínicas de los individuos utilizados en el análisis 2D-DIGE de tejido.

Utilizando el programa informático *DeCyder*, se seleccionaron aquellas manchas que se encontraron presentes en el 80% de los geles. Debido a la complejidad del diseño experimental se realizaron diferentes análisis estadísticos:

- 1) Comparación de las muestras en función de su origen, separadas según la presencia de EAC. Se utilizó el estadístico *t*-Student ya que se compararon dos grupos en cada caso.
- 2) Comparación de los tres tipos de muestras con EAC. Se empleó el análisis multivariante ANOVA aplicando la corrección de Tukey.
- 3) Comparación de los tres tipos de muestras sin EAC. Se empleó el análisis multivariante ANOVA aplicando la corrección de Tukey.

En todos los casos, se consideraron manchas proteicas de interés aquellas con un cociente de variación mayor a ± 1.5 y un valor de significación $p \leq 0.05$. Tras la aplicación de estos criterios, encontramos un total de 190 manchas proteicas diferencialmente expresadas (Tabla R.11).

		RELACIÓN PACIENTES SIN EAC/PACIENTES CON EAC			PACIENTES CON EAC RELACIÓN:			PACIENTES SIN EAC RELACIÓN:		
		T	IA	EAD	T/EAD	T/IA	IA/EAD	T/EAD	T/IA	IA/EAD
	Nº de MANCHAS PROTEICAS DIFERENCIALES	9	13	31	6	16	3	99	72	6
	Nº de PROTEÍNAS IDENTIFICADAS	7	8	15				27	25	3
1	Albúmina							-1.86 *		
2	Albúmina							-2.16		
3	Albúmina					-1.89				
4	Albúmina							2.12		
5	Cadena α -1 del colágeno (VI)							1.55		
6	Fibulina 1		-1.71							
7	N.ID.							2.18 *		
8	Subcomponente C1s del complemento		-1.57					2.37 *		
9	N.ID.							2.15 *	-1.61	
10	N.ID.							2.22		
11	N.ID.			2.67						
12	Albúmina							-2.25		
13	N.ID.							2.52		
14	Lumican		-1.97					2.92		
15	Serotransferrina							-1.64		
16	Vimentina							-1.71		
17	Vitronectina							-2.15		
18	N.ID.							-1.75		
19	Albúmina		-2.13							
20	N.ID.			1.55				-1.69	-2.13	
21	Lumican		-1.52							
22	N.ID.							-1.66 **		
23	N.ID.							-2.02 **	-1.56	
24	Albúmina					1.72				
25	N.ID.							-1.77 *	-1.57	
26	N.ID.							-2.04 *	-1.82	
27	N.ID.							-2.14 *		
28	N.ID.							-1.97 *		
29	N.ID.							-1.53		
30	Serotransferrina							-1.56		
31	Lumican								-1.75	
32	Serotransferrina							-1.71		
33	Serotransferrina							-1.73 *		
34	Serotransferrina							-1.89 *		
35	N.ID.								-1.67	
36	Serotransferrina							-1.83		
37	Serotransferrina							-2.01 *		
38	α -1B-glicoproteína							-1.54	-1.99 *	

Tabla R.11.

		RELACIÓN PACIENTES SIN EAC/PACIENTES CON EAC			PACIENTES CON EAC RELACIÓN:			PACIENTES SIN EAC RELACIÓN:		
		T	IA	EAD	T/EAD	T/IA	IA/EAD	T/EAD	T/IA	IA/EAD
39	N.ID.							-1.78		
40	Hemopexina							-1.78		
41	Hemopexina							-2.59		
42	N.ID.							-2		
43	Albúmina	-1.52								
44	Albúmina							-1.98		
45	Albúmina							-2.13		
46	Albúmina							-2.15		
47	Albúmina							-2.06		
48	Complemento C9							-1.95 **	-2.09 **	
49	Lumican							-2.06 *	-2.09 *	
50	Albúmina							-1.88 *	-2.24 *	
51	Albúmina							-1.74 *	-2.18 *	
52	Plastin 2							-2.03		
53	Albúmina							-2.16		
54	Proteína de choque térmico de 71 kDa							-1.92		
55	N.ID.							-1.64 *	-2.76 **	1.69 *
56	N.ID.							-1.59	-1.93 *	
57	Albúmina							-2.86 *		
58	Albúmina							-1.96		
59	Albúmina							-2.87		
60	N.ID.							-1.9 **	-2.1 **	
61	Albúmina							-1.81		
62	Albúmina							-1.8 *	-2.04 *	
63	Albúmina							-1.67	-2.28 *	
64	Complemento C9							-1.89 **	-2.17 **	
65	Albúmina							-1.98		
66	Albúmina							-2.58 *		
67	Albúmina							-2.07		
68	Albúmina							-2.14		
69	Albúmina							-2.2		
70	Albúmina							-2.13		
71	Albúmina							-1.59	-2.24 *	
72	Albúmina					-1.88		-1.97		
73	Albúmina					-1.95		-2.24		
74	Lumican				1.65 *	1.55				
75	Albúmina					-1.92				
76	Albúmina							-1.68	-1.66	
77	Kininógeno 1							-1.88 **	-1.6	
78	Albúmina							-1.99 *		

Tabla R.11. Continuación

		RELACIÓN PACIENTES SIN EAC/PACIENTES CON EAC			PACIENTES CON EAC RELACIÓN:			PACIENTES SIN EAC RELACIÓN:		
		T	IA	EAD	T/EAD	T/IA	IA/EAD	T/EAD	T/IA	IA/EAD
79	N.ID.	-1.56						-2.98		
80	Lumican	1.93								
81	Hemopexina				-1.81			-2.85		
82	Cadena α del componente C8 de complemento							-1.62 * -1.82 *		
83	Albúmina				-2.01			-2.33		
84	N.ID.				-1.85 *					
85	N.ID.							-2.55 * -2.15		
86	Albúmina							-2.21		
87	Antitrombina III				-1.84					
88	N.ID.	-1.61								
89	N.ID.	-2.29						2.74		
90	Antitrombina III							1.93 3.43 *		
91	N.ID.							1.74		
92	Vimentina				1.86					
93	Albúmina				-1.82			-1.94		
94	Aldehído deshidrogenasa, mitocondrial	-1.63 **								
95	Cadena β del fibrinógeno							1.53 -1.63 *		
96	Cadena A/C de la tubulina α	1.64								
97	N.ID.	1.57			-1.66					
98	β -2-glicoproteína 1	-1.58						1.88		
99	Cadena β de la tubulina	2 *								
100	Cadena β del fibrinógeno				-1.71					
101	Lumican	1.73								
102	N.ID.				-1.66					
103	α -1-antitripsina				3.17					
104	Xaa-Pro dipeptidasa	-1.57						1.57 2.01 *		
105	α -1-antitripsina	2.14 *								
106	Kininógeno 1							-1.64 -1.74		
107	N.ID.	-1.56								
108	Región constante de la cadena γ -2 de la Ig	-2.03 *								
109	Lumican							-1.91		
110	Albúmina							-1.97 -3.11 *		
111	Vimentina							3.06 * 3.5 *		
112	Vimentina	1.59								
113	Albúmina							-1.87 -2.08		
114	γ -enolasa	1.56 *								
115	Factor derivado del pigmento epitelial							-1.66 1.71		
116	N.ID.				2.83					
117	N.ID.							2.77		
118	Inhibidor de ribonucleasa							3.66 * 3.66		

Tabla R.11. Continuación

		RELACIÓN PACIENTES SIN EAC/PACIENTES CON EAC			PACIENTES CON EAC RELACIÓN:			PACIENTES SIN EAC RELACIÓN:		
		T	IA	EAD	T/EAD	T/IA	IA/EAD	T/EAD	T/IA	IA/EAD
119	N.ID.							1.64		
120	Vimentina					3.51				
121	Gelsolina	1.53		2.84						
122	Vimentina							2.4		
123	Vimentina					2.8				
124	Vimentina		-1.94					3.02 *	4.28 *	
125	Albúmina					-1.83				
126	Haptoglobina	2.27 **								
127	Vimentina							1.97		
128	Vimentina					-1.62				
129	Vimentina							1.94	2.09	
130	Vimentina							1.96		
131	Vimentina							1.98		
132	Prelamina-A/C			1.75						
133	Vimentina	1.55								
134	Apolipoproteína A-IV							-2.2		
135	Actina citoplásmica I			1.55						
136	Vitronectina			-1.75						
137	Zinc- α -2-glicoproteína							-2.65 *	-2.45	
138	Haptoglobina			-1.84						
139	Haptoglobina			-2.47						
140	Haptoglobina			-1.95						
141	Albúmina							-1.96	-2.5	
142	Haptoglobina			-2.76						
143	Cadena β del fibrinógeno								-4.61	
144	Haptoglobina			-2.04						
145	Haptoglobina			-1.85						
146	Clusterina			-1.92						
147	Clusterina			-1.57						
148	Clusterina			-2.15						
149	Haptoglobina			-1.58						
150	Cadena α -1 de la tropomiosina	-1.54								
151	Mimecan					2.31				
152	Apolipoproteína E							2.09		
153	Clusterina	-1.73 **								
154	Mimecan							3.35 *		
155	Subunidad β de la proteína G							1.65	1.92	
156	N.ID.			-1.93 *				1.96		
157	Apolipoproteína E							2.14		
158	Apolipoproteína E			-1.68 *				2.05	2.21	

Tabla R.11. Continuación

		RELACIÓN PACIENTES SIN EAC/PACIENTES CON EAC			PACIENTES CON EAC RELACIÓN:			PACIENTES SIN EAC RELACIÓN:		
		T	IA	EAD	T/EAD	T/IA	IA/EAD	T/EAD	T/IA	IA/EAD
159	Transtiretina			-1.5 *						
160	Proteína AMBP							-2.73 *		
161	Anexina 4							1.68 *		
162	Anexina 4							2.03 *	2.04 *	
163	N.ID.							-2.41 **		-1.65
164	Region constante de la cadena κ de la Ig								2.12	
165	Componente P del amiloide sérico							1.98		
166	Componente P del amiloide sérico							1.81	2.12	
167	Proteína de choque térmico HSP27									2.29
168	N.ID.									-1.52
169	Apolipoproteína E			1.86						
170	N.ID.			1.5						
171	Cadena pesada de la ferritina							-2.03	-2.85 *	
172	Peroxirredoxina-2								2.12	
173	N.ID.							2.12		
174	N.ID.							1.66 **	1.54 *	
175	N.ID.							2.07		
176	N.ID.							-2.99 *	-3.7 *	
177	Haptoglobina							-2.6	-3.38	
178	N.ID.		2.15							-3.39
179	Vimentina							2.33	2.84	
180	Canal de cloruro CLIC4							-1.66	-1.71	
181	Vimentina			1.54						
182	α -1-antitripsina							-2.46 *		
183	Albúmina							-1.93		
184	Vitronectina			-5.11						
185	Vitronectina	1.84								
186	Albúmina							-2.14		
187	N.ID.							-12.39 *		
188	Serotransferrina							-1.96		
189	Albúmina							-2.06		
190	Albúmina							-2		

Tabla R.11. Continuación. Proteínas diferencialmente expresadas identificadas tras el análisis proteómico diferencial de EAD en presencia/ausencia de EAC. Se muestran los resultados de todas las comparaciones analizadas, mostrando el cociente de variación en aquellos casos donde la diferencia es estadísticamente significativa (p -valor \leq 0.05).*: p -valor \leq 0.01; **: p -valor \leq 0.001

A continuación, se realizó el análisis multivariante (ACP) con las manchas proteicas diferencialmente expresadas en cada caso. Se observó una buena separación de los grupos en función del origen de las muestras (Fig. R.18) así como en base a la presencia de EAC (Fig. R.19)

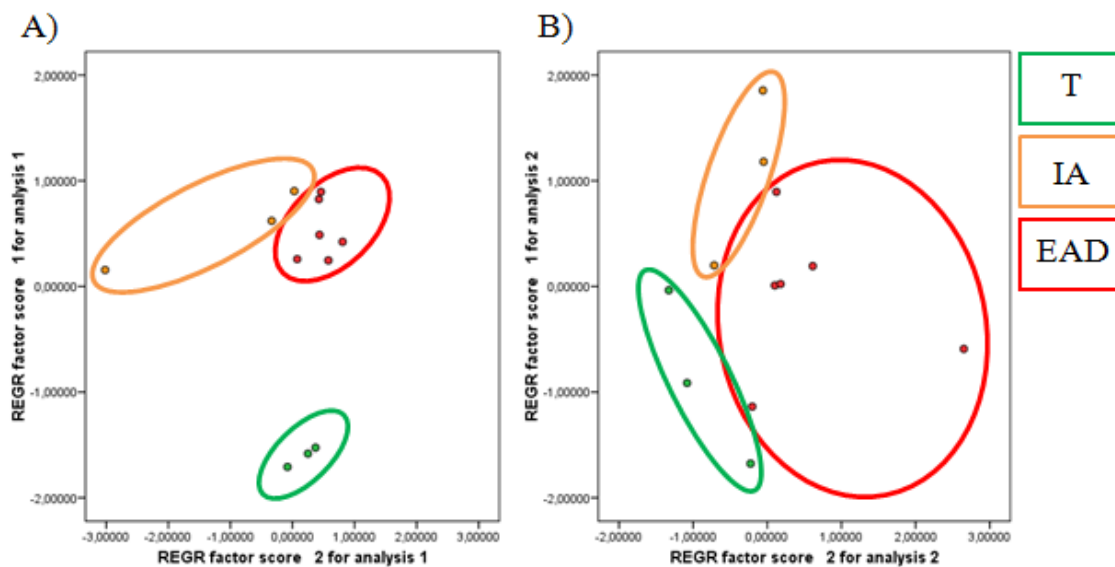


Fig. R.18. Resultados del análisis multivariante. Se muestra la separación de los diferentes tipos de válvulas independientemente de la presencia (A) o ausencia (B) de EAC.

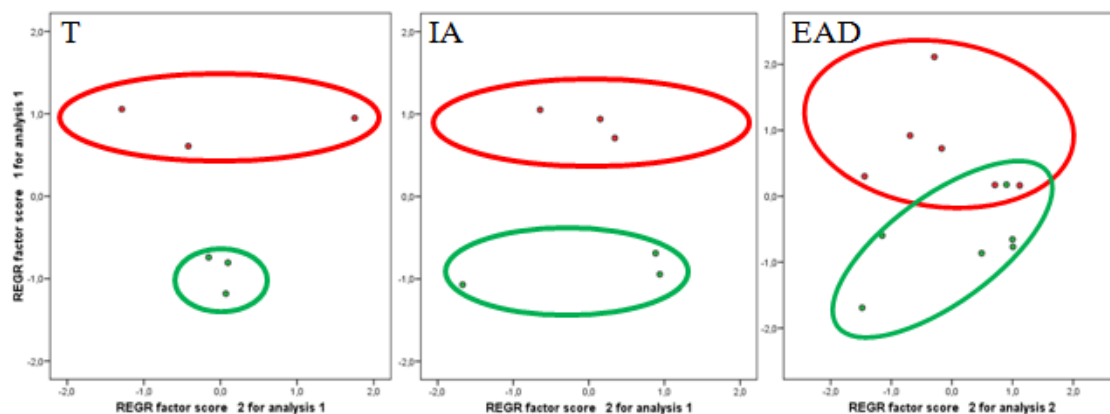


Fig. R.19. Resultados del análisis multivariante. Se muestra la separación de los individuos con y sin EAC (rojo y verde, respectivamente) en los diferentes grupos de muestras (T, IA y EAD).

En total, se identificaron 142 manchas proteicas que correspondieron a 47 proteínas únicas. Se realizó una clasificación de las proteínas encontradas en base a su función utilizando la base de datos Uniprot (Tabla R.12).

N° ACCESO (UniProt)	NOMBRE DE LA PROTEÍNA	FUNCIÓN	N° ACCESO (UniProt)	NOMBRE DE LA PROTEÍNA	FUNCIÓN
P60709	Actina citoplásmica 1	Citoesqueleto	P09104	γ -enolasa	Metabolismo de carbohidratos
P02768	Albúmina	Antioxidante / Transporte	P06396	Gelsolina	Citoesqueleto
P05091	Aldehído deshidrogenasa mitocondrial	Oxidoreductasa	P00738	Haptoglobina	Fase aguda
P01009	α -1-antitripsina	Inhibidor de proteasas	P02790	Hemopexina	Transporte
P04217	α -1B-glicoproteína	Respuesta inmune	P13489	Inhibidor de la ribonucleasa	Inhibidor ribonucleasa / Angiogenesis
P09525	Anexina 4	Apoptosis	P01042	Kininógeno 1	Coagulación / Inflamación
P01008	Antitrombina 3	Coagulación	P51884	Lumican	Matriz extracelular
P06727	Apolipoproteína A-IV	Transporte de lípidos	P20774	Mimecan	Metabolismo de carbohidratos
P02649	Apolipoproteína E	Antioxidante / Transporte de lípidos	P32119	Peroxirredoxina-2	Antioxidante
P02749	β -2-glicoproteína 1	Coagulación	P13796	Plastin 2	Unión actina / Respuesta inmune
Q71U36 / Q9BQE3	Cadena A/C de la tubulina α -1	Citoesqueleto	P02545	Prelamina-A/C	Estructural / Apoptosis
P12109	Cadena α -1 del colágeno VI	Adhesión celular / Matriz extracelular	P02760	Proteína AMBP	Inhibidor de proteasas
P07357	Cadena α del componente C8 del complemento	Activación complemento	P11142	Proteína de choque térmico de 71 kDa	ATPasa / Chaperona
P09493	Cadena α 1 de la tropomiosina	Citoesqueleto / Muscular	P04792	Proteína de choque térmico HSP27	Chaperona / Apoptosis
P02675	Cadena β del fibrinógeno	Coagulación	P01859	Región C de la cadena γ -2 de la Ig	Activación complemento
P07437	Cadena β de la tubulina	Citoesqueleto	P01834	Region C de la cadena κ de la Ig	Activación complemento
P02794	Cadena pesada de la ferritina	Transporte	P02787	Serotransferrina	Coagulación
Q9Y696	Canal de cloruro CLIC4	Angiogénesis / Transporte	P09871	Subcomponente C1s del complemento	Activación complemento
P10909	Clusterina	Chaperona / Apoptosis	P62873	Subunidad β de la proteína G	Señalización
P02748	Complemento C9	Activación complemento	P02766	Transtiretina	Matriz extracelular / Transporte
P02743	Componente P del amiloide sérico	Fase aguda	P08670	Vimentina	Apoptosis
P36955	Factor derivado del pigmento epitelial	Inhibidor de endopeptidasas / Proliferación	P12955	Xaa-Pro dipeptidasa	Amino peptidasa
P23142	Fibulina 1	Matriz extracelular	P25311	Zinc- α -2-glicoproteína	Adhesión celular

Tabla R.12. Proteínas diferencialmente expresadas en el 2D-DIGE de tejido. Se muestra el número de acceso y las funciones principales.

Al comparar las VAs de trasplante con y sin EAC encontramos 9 manchas proteicas diferencialmente expresadas, 5 disminuidas y 4 aumentadas en los trasplantes con EAC. En el caso de las IA, las manchas proteicas diferencialmente expresadas fueron 13: 11 estaban aumentadas en el grupo con EAC y 2 estaban disminuidas. Por último, tras la

comparación entre las muestras de EA, obtuvimos 31 manchas proteicas diferencialmente expresadas, 14 disminuidas y 16 aumentadas en el grupo con EAC. Todas las identificaciones obtenidas en cada caso se encuentran detalladas en la tabla R.13.

GRUPOS	AUMENTADAS	DISMINUIDAS
T con y sin EAC 7 proteínas	Albúmina; Cadena α -1 de la tropomiosina; Clusterina	Gelsolina; Haptoglobina; Vimentina; Vitronectina
IA con y sin EAC 8 proteínas	Lumican	Lumican (2); Albúmina; Aldehído deshidrogenasa mitocondrial; β -2-glicoproteína 1; Subcomponente C1s del complemento; Fibulina 1; Vimentina; Xaa-pro dipeptidasa
EAD con y sin EAC 15 proteínas	Apolipoproteína E; Clusterina (3); Haptoglobina (7); Región constante de la cadena γ -2 de la IgG; Transtiretina; Vitronectina (2)	Apolipoproteína E; Actina citoplasmática 1; α -1-antitripsina; γ -enolasa; Gelsolina; Lumican; Prelamina-A/C; Cadena beta de la tubulina; Vimentina; α -tubulina

Tabla R.13. Identificaciones de las manchas proteicas diferencialmente expresadas en función de la presencia de EAC en los individuos de estudio. Cuando existe más de una isoforma, se indica el número entre paréntesis.

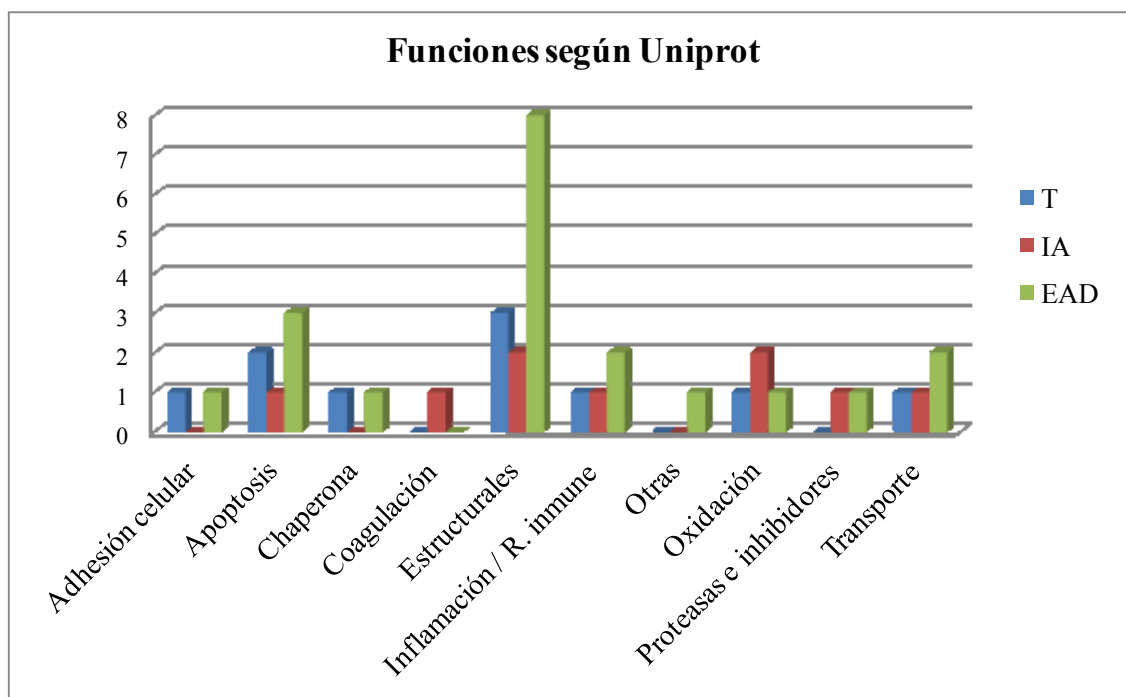


Figura.R20. Clasificación de las proteínas diferencialmente expresadas al comparar las muestras con y sin EAC dentro de cada tipo de válvula (T, IA y EAD).

En la comparación entre las válvulas estenóticas con y sin EAC hemos encontrado disminuido en el grupo con EAC la α -tubulina, aunque debido a la homología de sus cadenas, no sabemos si se trata de la cadena A o la C.

Tras la clasificación de las proteínas alteradas en cada caso, se observó que las mayores diferencias aparecieron, en todos los casos, en proteínas estructurales e implicadas en apoptosis (Figura R.20).

Tras el ANOVA de los tres tipos de muestras sin EAC encontramos 99 manchas proteicas diferencialmente expresadas entre T y EAD (77 aumentadas y 22 disminuidas en EA), 72 entre T e IA (43 aumentadas y 29 disminuidas en IA) y solo 6 entre EAD e IA (3 aumentadas y 3 disminuidas en EAD) (Tabla R.14).

GRUPOS	AUMENTADAS	DISMINUIDAS
T vs EAD 27 proteínas	Vimentina; Albúmina (33); α -1-antitripsina; α -1b-glicoproteína; Apolipoproteína A-IV; Cadena pesada de la ferritina; Canal de cloruro CLIC4; Complemento C9 (2), Cadena α del componente C8 del complemento; Haptoglobina; Proteína de choque térmico de 71 kDa; Hemopexina; Kininógeno 1 (2); Lumican; Plastin 2; Proteína AMBP; Serotransferrina (8); Vitronectina; Zinc- α -2-glicoproteína	Vimentina (7); Anexina IV (2); Antitrombina 3; Apolipoproteína E; Cadena α -1 del colágeno VI; Componente P del amiloide sérico (2); Inhibidor de la ribonucleasa; Subunidad β de la proteína G; Xaa-pro dipeptidasa
T vs IA 25 proteínas	Albúmina (13); Cadena β del fibrinógeno; Lumican (3); α -1B-glicoproteína; Cadena pesada de la ferritina; Canal de cloruro CLIC4; Complemento C9 (2); Cadena alfa del componente C8 del complemento; Haptoglobina; Hemopexina (2); Kininógeno 1 (2); Factor derivado del pigmento epitelial; Zinc-alfa-2-glicoproteína	Albúmina; Cadena β del fibrinógeno; Lumican (2); Anexina IV; Antitrombina 3; Apolipoproteína E (3); β -2-glicoproteína; Subcomponente del complemento C1s; Componente P del amiloide sérico; Mimecan; Región constante de la cadena κ de la Ig; Inhibidor de la ribonucleasa; Subunidad beta de la proteína G; Vimentina (5); Xaa-pro dipeptidasa
IA vs EAD 3 proteínas	Factor derivado del pigmento epitelial; Proteína de choque térmico HSP27	Cadena β del fibrinógeno

Tabla R.14. Identificaciones de las manchas proteicas diferencialmente expresadas al comparar las muestras sin EAC de cada tipo de válvula entre sí. Cuando existe más de una isoforma, se indica el número entre paréntesis.

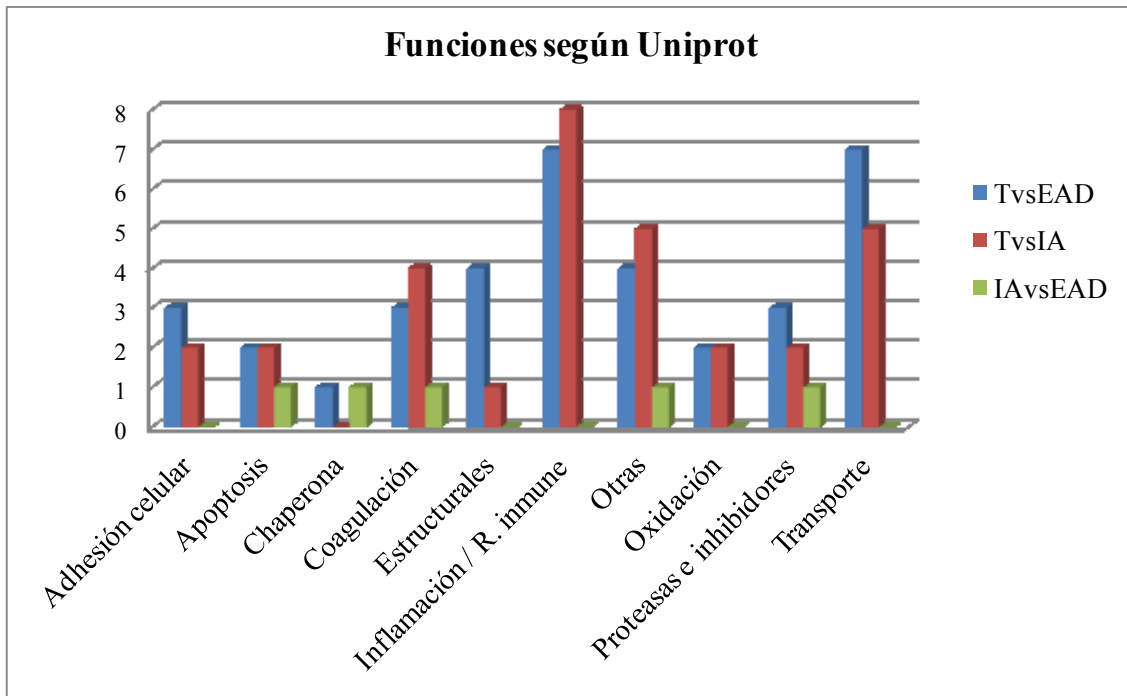


Fig.R.21. Clasificación de las proteínas diferencialmente expresadas al comparar las muestras sin EAC de cada tipo de válvula entre sí.

Tras llevar a cabo la clasificación de las proteínas alteradas en cada caso, se observó que, en todos los grupos funcionales, las mayores diferencias aparecieron al comparar los controles procedentes de trasplantes con los grupos patológicos, independientemente de si presentaban calcificación, a excepción del grupo formado por las proteínas estructurales, que apenas presenta diferencias entre pacientes de T e IA (Figura R.21).

Por último, realizamos un ANOVA de los tres tipos de muestras con EAC. Encontramos 6 manchas proteicas diferencialmente expresadas entre C y EA (3 aumentadas y 3 disminuidas en EA), 16 entre C e IA (11 aumentadas y 5 disminuidas en IA) y 3 entre EA e IA (1 aumentada y 2 disminuidas en EA) (Tabla R.15).

Tras realizar la clasificación funcional de las proteínas alteradas en cada caso, no se observó ninguna proteína implicada en inflamación, respuesta inmune o adhesión celular. (Fig R.22).

GRUPOS	AUMENTADAS	DISMINUIDAS
T vs EAD 5 proteínas	Cadena β del fibrinógeno; Hemopexina	α -1-antitripsina; Lumican; Vimentina
T vs IA 5 proteínas	Vimentina; Albúmina (7); Antitrombina III	Lumican; Mimecan; Vimentina (2)
IA vs EAD 2 proteínas		Albúmina; Peroxirredoxina-2

Tabla R.15. Identificaciones de las manchas proteicas diferencialmente expresadas al comparar las muestras con EAC de cada tipo de válvula entre sí. Cuando existe más de una isoforma, se indica el número entre paréntesis.

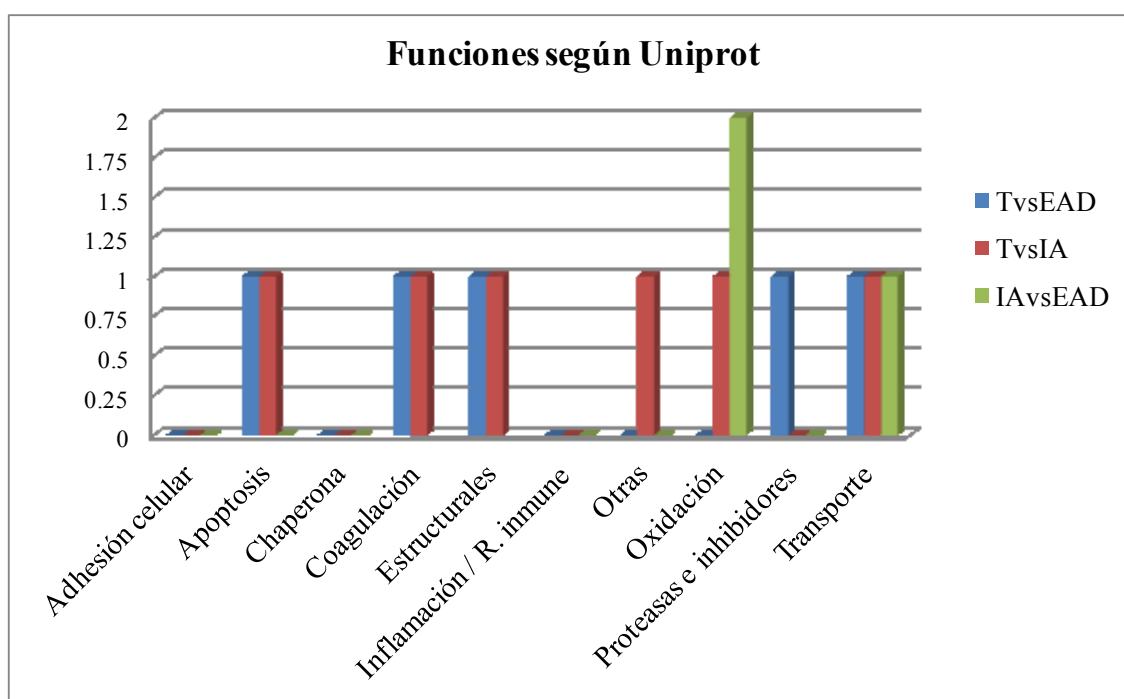


Fig.R.22. Clasificación de las proteínas diferencialmente expresadas al comparar las muestras con EAC de cada tipo de válvula entre sí.

2.5. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS. INTEGRACIÓN DE RESULTADOS

Para finalizar, hemos realizado diferentes análisis bioinformáticos con el objetivo de obtener una visión a nivel global de las diferencias entre los diferentes grupos de estudio. Para ello, las proteínas del estudio de tejido de VA realizado teniendo en cuenta la EAC subyacente se han agrupado para aquellas comparaciones homólogas (T vs IA,

T vs EAD, IA vs EAD) realizadas tanto en VA sin EAC como con EAC, generando 3 listas. Las 2 primeras estarían completas, puesto que no se han realizado más estudios con trasplantes en la Tesis Doctoral. Al listado IA vs EAD se le añadieron, a su vez, las proteínas obtenidas en los análisis realizados en plasma y tejido humano sin tener en cuenta la EAC, puesto que fueron realizados con los mismos grupos de estudio.

Las alteraciones debidas a la presencia de EAC observadas entre los diferentes tipos de muestras (T, IA y EAD) han sido consideradas parte de un mismo grupo de proteínas inducidas por la EAC subyacente. En resumen se analizaron los siguientes listados:

- Listado 1: T vs IA (con y sin EAC)
- Listado 2: T vs EAD (con y sin EAC)
- Listado 3: IA vs EAD (plasma y tejido sin considerar EAC, tejido con y sin EAC)
- Listado 4: Proteínas inducidas por la EAC subyacente

En todos los casos . se analizaron las principales funciones biológicas en las que estaban implicadas las proteínas diferenciales y se realizó un agrupamiento en base a los términos significativos hallados. También se llevó a cabo un análisis de interacciones proteicas utilizando STRING v9.1. A continuación, se irán detallando los resultados obtenidos para cada uno de los listados.

Las funciones más representadas del análisis bioinformático llevado a cabo con el listado de proteínas diferenciales de la comparación de válvulas procedentes de trasplantes y de pacientes con IA (listado 1), junto con su significación estadística, se encuentran resumidos en la tabla R.16. Además, se llevó a cabo un análisis de interacciones proteicas utilizando STRING v9.1. En la figura R.23 se muestran las redes de interacción encontradas por el programa STRING para este listado de proteínas.

ANOTACIÓN FUNCIONAL	Nº DE TÉRMINOS	P-VALOR	PUNTUACIÓN
Coagulación / apoptosis	24	9.47E-06	3.05
Homeostasis de cationes	16	2.66E-05	2.97
Lipoproteínas de alta densidad	3	8.28E-04	2.89
Respuesta inmune / inflamación	30	2.16E-08	2.75
Regulación de la respuesta inflamatoria	6	1.14E-04	2.72
Inhibidor enzimático	4	1.14E-04	2.57
Migración y motilidad celular	6	3.82E-03	1.91
Región extracelular	1	1.25E-11	-
Mantenimiento de la localización	1	2.72E-03	-
Regulación de la angiogénesis	1	4.64E-03	-

Tabla R.16. Funciones más representadas en las comparaciones de válvulas procedentes de trasplantes y de pacientes con IA. Se incluye el número de términos de ontología recogidos dentro de cada anotación funcional, el p-valor del término más significativo y, cuando es posible, la puntuación asociada al enriquecimiento.

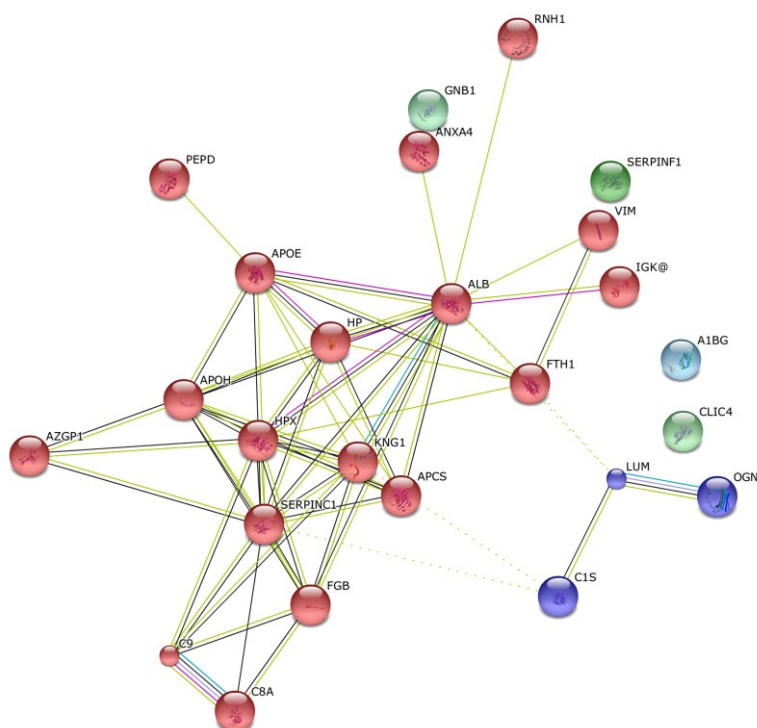


Figura R.23. Análisis de interacciones con las proteínas diferenciales de las comparaciones de válvulas procedentes de trasplantes y de pacientes con IA, con independencia de la presencia de EAC subyacente.

Los resultados del análisis realizado con todas las proteínas encontradas al comparar la VA de pacientes de trasplante y pacientes con EAD (listado 2) se muestran en la Tabla R.17 y la figura R.24).

ANOTACIÓN FUNCIONAL	Nº DE TÉRMINOS	P-VALOR	PUNTUACIÓN
Región extracelular	3	1.96E-11	10.01
Homeostasis de cationes	14	3.63E-06	4.04
Cascada de coagulación / inhibidor de peptidasas	11	1.72E-07	3.85
Inflamación	5	3.43E-05	3.75
Lipoproteínas de alta densidad	3	1.07E-03	2.77
Unión a glucosaminoglicanos	6	8.69E-04	2.45
Regulación de la coagulación	3	1.12E-03	2.3
Matriz celular	3	3.22E-03	2.18
Gránulos secretores / plaquetas	9	2.87E-03	2.17
Respuesta inmune	1	1.65E-03	-

Tabla R.17. Funciones más representadas en las comparaciones de válvulas procedentes de trasplantes y de pacientes con EAD. Se incluye el número de términos de ontología recogidos dentro de cada anotación funcional, el *p*-valor del término más significativo y, cuando es posible, la puntuación asociada al enriquecimiento.

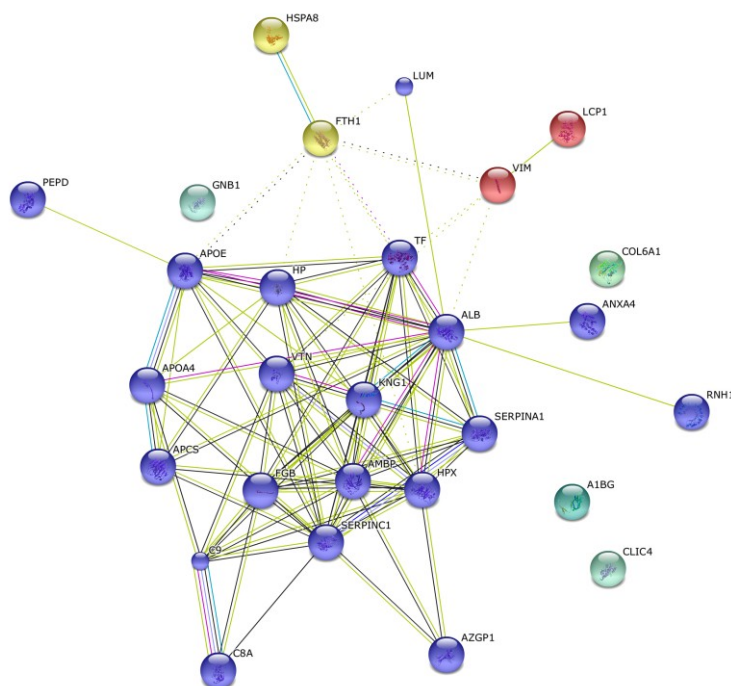


Figura R.24. Análisis de interacciones con las proteínas diferenciales de las comparaciones de válvulas procedentes de trasplantes y de pacientes con EAD.

En el caso del análisis funcional de las proteínas diferenciales entre pacientes con IA y EAD, se tuvieron en cuenta tanto los resultados de plasma como los de los 2 experimentos 2D-DIGE de tejido (listado 3). Los resultados se encuentran en la tabla R.18 y la figura R.24.

ANOTACIÓN FUNCIONAL	Nº DE TÉRMINOS	P-VALOR	PUNTUACIÓN
Región extracelular	3	1.21E-15	13.25
Inflamación / respuesta inmune	26	1.88E-10	4.69
Coagulación / hemostasis	9	4.80E-08	3.96
Inhibidor enzimático	4	4.50E-05	3.68
Lipoproteínas de alta densidad	6	9.93E-06	3.56
Gránulos secretores / plaquetas	10	4.52E-05	2.85
Unión a glucosaminoglicanos	5	1.22E-03	2.45
Regulación de la apoptosis	7	2.75E-03	1.85
Serín peptidasas	3	2.31E-02	1.56
Matriz celular	1	1.68E-02	-

Tabla R.18. Funciones más representadas en las comparaciones de válvulas procedentes de pacientes con IA y de pacientes con EAD. Se incluye el número de términos de ontología recogidos dentro de cada anotación funcional, el p-valor del término más significativo y, cuando es posible, la puntuación asociada al enriquecimiento.

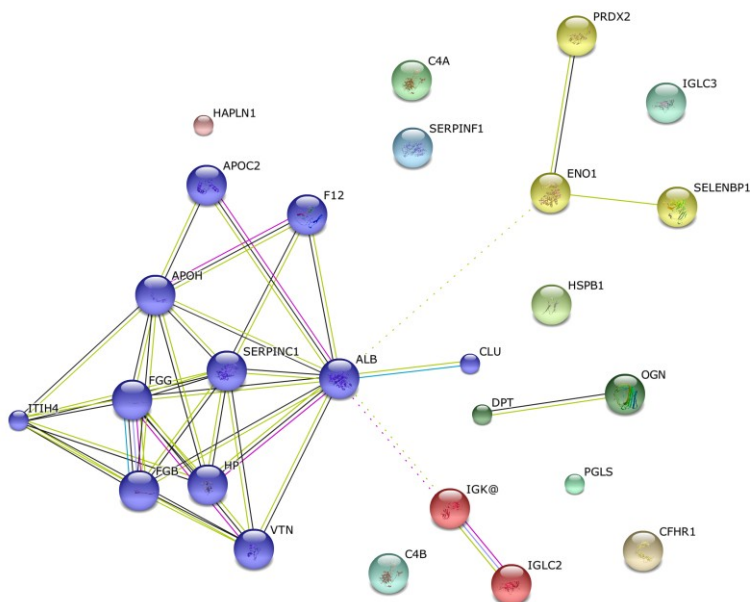


Figura R.25. Análisis de interacciones con las proteínas diferenciales de las comparaciones de válvulas procedentes de pacientes con IA y de pacientes con EAD.

Por último, hemos analizado todas las proteínas diferenciales halladas al comparar todos los tipos de válvula en función de la presencia/ausencia de EAC, incluyendo las que aparecieron al comparar válvulas de trasplante, de pacientes con IA y de pacientes con EAD (listado 4, Tabla R.19 y figura R.25)

ANOTACIÓN FUNCIONAL	Nº DE TÉRMINOS	P-VALOR	PUNTUACIÓN
Región extracelular	3	5.68E-07	5.7
Lipoproteínas y regulación de apoptosis	11	8.59E-06	2.52
Citoesqueleto / ensamblaje proteico	15	3.57E-06	2.36
Citoesqueleto / motilidad celular	4	2.20E-04	2.27
Maduración de proteínas	4	8.61E-04	2.25
Gránulos secretores / plaquetas	6	2.03E-03	2.21
Migración y motilidad celular	6	3.16E-03	1.99
Respuesta inmune	6	4.72E-03	1.96
Respuesta a sustancias orgánicas	3	3.37E-03	1.94
Unión a glucosaminoglicanos	4	1.19E-02	1.7

Tabla R.19. Funciones más representadas en el listado de proteínas inducidas sobre la VA por la EAC. Se incluye el número de términos de ontología recogidos dentro de cada anotación funcional, el p-valor del término más significativo y, cuando es posible, la puntuación asociada al enriquecimiento.

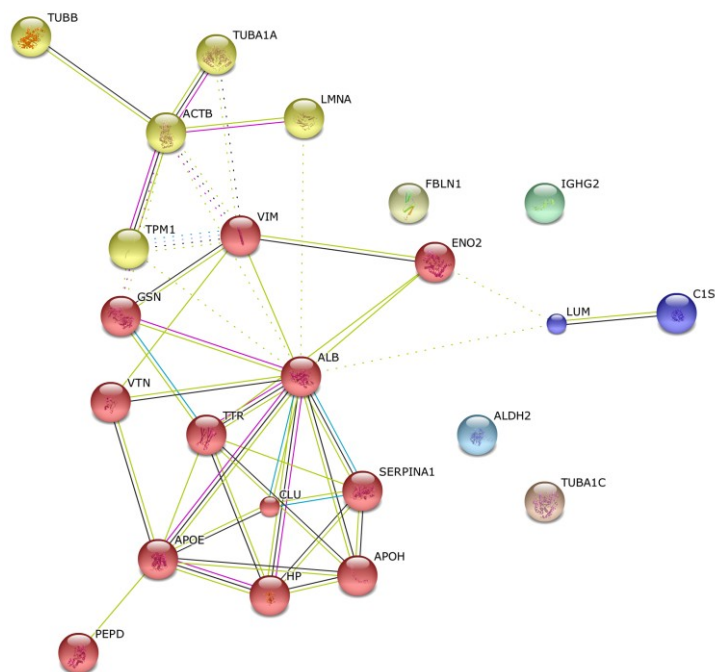


Figura R.26. Análisis de interacciones con las proteínas diferenciales de las comparaciones de válvulas procedentes de pacientes con y sin EAC.

Haciendo una recopilación de todos los estudios realizados en esta Tesis Doctoral, hemos encontrado numerosas proteínas implicadas en coagulación, inflamación y metabolismo lipídico. Queremos destacar la aparición de un grupo de proteínas que solo aparecen al comparar muestras procedentes de pacientes de IA y de EAD, la α -enolasa, la peroxirredoxina-2 y la proteína de unión a selenio, ya que pensamos que podrían ser potenciales candidatos a biomarcador. Además, la tropomiosina 1 y las miosinas, encontradas alteradas en el modelo animal, tienen el valor añadido de ser proteínas que se encuentran generalmente en el tejido cardíaco.

Sin embargo, todas las proteínas encontradas en estos estudios, así como las enzimas implicadas en las rutas metabólicas que hemos encontrado alteradas, serán estudiadas en un futuro en una cohorte más amplia de individuos para comprobar si pueden ser marcadores de enfermedad y si presentan utilidad clínica.

DISCUSIÓN

A pesar de que la prevalencia de las valvulopatías es menor que la de otras cardiopatías como la insuficiencia cardíaca, la cardiopatía isquémica o la hipertensión, constituyen un importante consumo de recursos sanitarios ya que la inexistencia de un tratamiento eficaz conlleva la necesidad de cirugía en la mayoría de los casos (170, 171). En el pasado, la fiebre reumática era la principal causa de valvulopatías. Sin embargo, debido a los cambios demográficos y sociales acaecidos en los países desarrollados, se han producido modificaciones en la etiología de estas enfermedades: la incidencia de la valvulopatía reumática ha disminuido gracias a una mejora de los antibióticos y los sistemas de salud, mientras que la incidencia de las valvulopatías degenerativas ha aumentado debido al incremento de la esperanza de vida (172). De hecho, en la actualidad, la valvulopatía más frecuente en el mundo occidental es la estenosis aórtica degenerativa (EAD) (13), objeto de estudio de esta Tesis Doctoral.

En trabajos previos en nuestro laboratorio, se han realizado estudios comparativos entre individuos con EAD frente a controles sanos, utilizando muestras de plasma (148) y de tejido (147). También se ha llevado a cabo un estudio del secretoma mediante el cultivo de explantes valvulares en presencia de medio con aminoácidos marcados (150). En estos estudios se encontraron alteraciones en procesos patológicos clave para el desarrollo de la EAD como la inflamación, la coagulación y la proteólisis asociada al remodelado de la matriz.

Sin embargo, en estos estudios no fue posible aislar las causas y/o efectos del proceso fisiopatológico de la EAD de los de los daños cardíacos y circulatorios que puedan ocasionarse debido a la alteración funcional de la válvula. Por ello, para el desarrollo de esta Tesis Doctoral hemos optado por utilizar como controles pacientes con IA debida a dilatación del arco aórtico, ya que no presentan alteraciones de la válvula aórtica pero sí desarrollan una hipertrofia ventricular, como sucede en el caso de la EAD (173, 174), llegando a desarrollar una insuficiencia cardíaca. Por otro lado, se realizó un modelo animal de EAD con el objetivo de controlar las diferencias entre los grupos

experimentales debidas a factores externos (ambiente, dieta, medicación, etc.), habituales en los estudios previos del grupo con muestras humanas. De esta forma, esperamos que los resultados obtenidos en este trabajo proporcionen una valiosa información acerca de los mecanismos que desencadenan el desarrollo de esta enfermedad, así como los procesos fisiopatológicos implicados.

1. ESTUDIO DE PROTEÓMICA DIFERENCIAL UTILIZANDO UN MODELO ANIMAL DE ESTENOSIS AÓRTICA DEGENERATIVA

Como hemos comentado anteriormente, hemos realizado un modelo animal de EAD para poder controlar las diferencias entre los grupos experimentales debidas a factores externos. Por otro lado, se pretendía implementar el modelo animal en el laboratorio para futuros estudios funcionales *in vivo* que se puedan derivar de los estudios -ómicos realizados en esta Tesis Doctoral. Decidimos utilizar un modelo conjunto de aterosclerosis y EAD basado en una alimentación rica en colesterol y suplementada con vitamina D₂ (61). El aumento del gradiente transvalvular, valorado mediante ecocardiografía, confirmó el desarrollo de EAD en los conejos. Además, los análisis bioquímicos mostraron un incremento significativo en los niveles de calcio, fósforo, colesterol (total, LDL y no-HDL) y triglicéridos, características observadas en los pacientes con EAD (175, 176).

Tras el análisis proteómico, 8 proteínas diferenciales fueron identificadas. La albúmina sérica, la cadena α -1 de la tropomiosina, la cadena B de la L-lactato deshidrogenasa, la cadena ligera de la miosina 3 y la cadena ligera reguladora de la miosina 2 (isoforma de músculo cardiaco/ventricular) estaban aumentadas en controles mientras que la calreticulina, la tran glutaminasa 2 y la ATPasa del retículo endoplasmático transicional (también llamada VCP, *valosin-containing protein*) estaban aumentadas en el grupo patológico.

Las miosinas (formadas por cadenas como la **cadena ligera de la miosina 3** y la **cadena ligera reguladora de la miosina 2**) y la **cadena α -1 de la tropomiosina** forman parte, junto con la actina, del músculo cardíaco, por lo que en el ámbito de la cardiología han sido estudiadas principalmente a nivel de miocardio y es la primera vez en la que se demuestra su expresión en la VA humana y su implicación en la EAD. Están implicadas en la contracción del ventrículo, y se han relacionado en estudios

previos con la hipertrofia ventricular (177, 178). Estas proteínas también forman parte del citoesqueleto contráctil de otras células, como fibroblastos y endoteliales, y son imprescindibles en el mantenimiento de la función de la barrera endotelial (179). Por un lado, se ha visto que la sobre-expresión de TPM-1 estabiliza la estructura de los filamentos de actina, ayudando a preservar la función de la barrera endotelial bajo condiciones de estrés oxidativo (180). Además, su disminución se ha relacionado con una menor contracción de los filamentos de actina en arterias con arteriosclerosis (181). Por otro lado, la disminución de los niveles de proteínas de citoesqueleto en arterias coronarias ateroscleróticas se ha relacionado con una pérdida del fenotipo contráctil de las VSMC (182). La disminución encontrada en proteínas de citoesqueleto puede estar relacionada con la pérdida de flexibilidad de la válvula aórtica así como, de forma paralela a lo descrito en aterosclerosis, ser un indicativo de la diferenciación de las células intersticiales de la válvula a osteoblastos, que no tienen capacidad contráctil (183, 184). Además, la ausencia de miosina también provoca alteraciones en la adhesión celular y la organización tisular debido a defectos en la localización y formación de los complejos proteicos necesarios para las uniones célula-célula (185), lo que puede provocar un aumento de la permeabilidad del endotelio. La disminución observada en estas miosinas y en la tropomiosina-1 en los conejos del grupo patológico parece ser un reflejo de la diferenciación celular previa a la calcificación. Además, también podría ser indicativo de una alteración en la regulación del citoesqueleto de las células endoteliales, lo que podría implicar una disfunción endotelial.

Por otro lado, se ha relacionado la diferenciación de VSMCs a células osteogénicas (186), así como la infiltración de monocitos en aterosclerosis (187), con la proteína **transglutaminasa 2**, aumentada en el grupo patológico. Esta proteína desempeña un papel importante en la apoptosis, diferenciación celular y la estabilización de la matriz extracelular (188). El aumento de transglutaminasa 2 en la EAD puede estar implicado en los mismos procesos que en la aterosclerosis, ya que son muy similares en ambas patologías.

En el caso de la válvula estenótica, se produce una disminución de aporte de oxígeno a las células debido a un aumento en el grosor del tejido. En estas condiciones, se produce una situación de hipoxia que favorece la síntesis de lactato desde el piruvato mediante la cadena A de la L-lactato deshidrogenasa, una de las isoformas más importante de la

enzima lactato deshidrogenasa (189). En el corazón, sin embargo, existe una isoforma denominada **cadena B de la L-lactato deshidrogenasa**, que lleva a cabo esa misma reacción en condiciones aerobias (189) y que se regula a la baja en condiciones de escasez de oxígeno (190, 191), como muestran nuestros resultados.

Recientemente, se ha relacionado la calcificación valvular con aumento del estrés del retículo endoplasmático (ERS, *endoplasmic reticulum stress*) (192). Los autores de este estudio demostraron que el oxLDL promueve la diferenciación osteoblástica y la inflamación a través de la activación de la vía de ERS. En nuestro trabajo, hemos encontrado niveles aumentados de **calreticulina** y **ATPasa VCP** en los animales del grupo patológico, ambas relacionadas con la acumulación en el retículo de proteínas plegadas incorrectamente, lo que provoca alteraciones en las funciones del orgánulo y, por tanto, ERS. La calreticulina es una chaperona implicada en el plegamiento de glicoproteínas y en el mantenimiento de unos niveles de calcio adecuados para el organismo, inducida en condiciones de estrés del RE (193, 194). Esta chaperona actúa como control de calidad, seleccionando las proteínas mal plegadas para su degradación (195). Las proteínas seleccionadas son transportadas al citosol a través de la ATPasa VCP y degradadas por el sistema ubiquitina-proteosoma (196). El aumento de calreticulina y ATPasa VCP encontrado en los animales del grupo patológico apoya la implicación de la vía de ERS en el desarrollo de la EAD y parece apuntar de nuevo al fenómeno de diferenciación de VICs a osteoblastos, que ha sido relacionado directamente con la activación de esta vía (192).

También hemos encontrado una disminución de albúmina, seguramente debida a la inflamación ya que se trata de una proteína de fase aguda negativa (197). Sin embargo, las proteínas de fase aguda no son específicas y se encuentran alteradas en numerosas patologías (197, 198).

En resumen, podemos decir que el modelo animal de EAD nos ha permitido identificar 8 proteínas diferencialmente expresadas entre el grupo patológico y el sano. Hay que destacar que 3 podrían estar implicadas en la diferenciación celular de las VICs a un fenotipo osteogénico y en el mantenimiento de la integridad celular. También se ha observado la importancia de una correcta síntesis proteica y la implicación del estrés del retículo endoplasmático en la enfermedad. Este hecho refuerza además el papel de la

diferenciación osteoblástica en el desarrollo de la EAD, debido a que se ha descrito una implicación directa de ésta con la vía de ERS.

2. ESTUDIO DE PROTEÓMICA Y METABOLÓMICA DE LA ESTENOSIS AÓRTICA DEGENERATIVA CON MUESTRAS HUMANAS

2.1. ESTUDIO DE PROTEÓMICA Y METABOLÓMICA DIFERENCIAL EN PLASMA

Nuestro interés se centra en profundizar en los procesos fisiopatológicos que subyacen tras la EAD a través del análisis del plasma mediante dos aproximaciones complementarias: Proteómica y Metabolómica. Como es bien sabido, el plasma es una muestra de fácil obtención mediante técnicas poco invasivas y de bajo coste. Además, se caracteriza por que en él aparecen moléculas secretadas por los distintos órganos y tejidos, por lo que contiene información sobre el estado fisiológico de las diferentes partes del organismo. De hecho, se ha comprobado que la VA puede secretar proteínas indicativas de su estado fisiológico (150). Hemos completado el estudio con un análisis metabolómico mediante GC-MS, tratando de dar un paso más en la comprensión de esta enfermedad y con el valor añadido de la búsqueda de potenciales biomarcadores pronósticos, diagnósticos y/o terapéuticos que ayuden a reducir el impacto económico y social que causa actualmente esta patología.

2.1.1. ESTUDIO PROTEÓMICO DE PLASMA HUMANO MEDIANTE 2D-DIGE

En los estudios proteómicos en plasma la realización de un paso previo de fraccionamiento de la muestra permite aumentar drásticamente el número de proteínas analizadas. Esto es debido a que el 99% de la concentración proteica del plasma está compuesta por sólo 22 proteínas, siendo su rango dinámico de concentración de 10^9 (199).

En un estudio realizado anteriormente en nuestro grupo, se compararon muestras de plasma de pacientes con EAD frente a controles sanos utilizando diferentes protocolos para tratar la muestra. Para ello se analizaron plasmas completos, plasmas deplecionados y plasmas ecualizados mediante 2D-DIGE (148) observándose que el protocolo más apropiado para este tipo de análisis era el realizado con plasmas deplecionados. Es por eso que hemos procedido a la depleción de las 14 proteínas

mayoritarias del plasma (albúmina, IgG, antitripsina, IgA, transferrina, haptoglobina, fibrinógeno, α -2-macroglobulina, α -1-glicoproteína ácida, IgM, apolipoproteína AI, apolipoproteína AII, complemento C3 y transtiretina) antes del análisis proteómico, lo que nos ha permitido estudiar las proteínas menos abundantes de la muestra.

Sin embargo, en este estudio previo realizado con controles sanos no fue posible aislar las causas y/o efectos del proceso fisiopatológico de la EAD, de los daños cardíacos y circulatorios que puedan ocasionarse debido a la alteración funcional de la válvula. Por ello, para el desarrollo de esta Tesis Doctoral hemos optado por utilizar pacientes con IA debida a dilatación del arco aórtico como controles, ya que no presentan alteraciones de la válvula aórtica pero sí desarrollan una hipertrofia ventricular, como sucede en el caso de la EAD (173, 174). Utilizando individuos con IA como control, esperamos restringir el estudio a las alteraciones debidas a la calcificación de la válvula, eliminando aquellas diferencias debidas a las alteraciones cardíacas que se ocasionan por el sobreesfuerzo realizado por el corazón y, por lo tanto, asociar a ésta las variaciones observadas.

Tras la identificación de las manchas proteicas de interés, se encontraron 12 proteínas alteradas. Estaban aumentadas en EAD las cadenas β y γ del fibrinógeno, la proteína 1 relacionada con el factor H del complemento (CFHR), la haptoglobina, la vitronectina, la apolipoproteína CII y la cadena pesada H4 del inhibidor de la inter- α -tripsina (ITI4). Por otro lado, estaban disminuidas en EAD el factor de coagulación XII, la antitrombina III y el complemento 4 (A o B). En el caso de la mancha proteica 24, se obtuvo una mezcla de dos proteínas en la identificación: la cadena pesada H4 del inhibidor de la inter- α -tripsina y la clusterina. Esto imposibilita asignar a una de las dos candidatas como responsable del cambio significativo que se observa.

De las 12 proteínas que aparecen alteradas, 3 no presentaban diferencias significativas en el estudio previo que se realizó en nuestro laboratorio comparando pacientes con EAD y sanos (148)(haptoglobina, apolipoproteína C-II y factor de coagulación XII) mientras que 9 sí presentaban alteraciones. De estas 9, sin embargo, solo 4 presentan alguna isoforma coincidente en MM y pI entre los dos estudios (cadenas β y γ del fibrinógeno, proteína 1 relacionada con el factor H del complemento y antitrombina III). Las cadenas del fibrinógeno y la antitrombina III se encuentran aumentadas y disminuidas, respectivamente, en los pacientes con EAD, al igual que en nuestro

estudio. La proteína 1 relacionada con el factor H del complemento, sin embargo, se encontró disminuida en los pacientes, al revés que en nuestro estudio. Esto sugiere que, aunque las válvulas no estén calcificadas, existen diferencias entre individuos sanos y pacientes con IA, lo que confirma nuestra hipótesis inicial.

Como podemos ver, se han encontrado diferentes isoformas en el caso de los fibrinógenos, la proteína 1 relacionada con el factor H del complemento y el complemento 4. La aparición de cadenas de proteínas que presentan la misma MM pero diferente pI son características de isoformas debidas a modificaciones post-traduccionales como la glicosilación (200, 201) y la fosforilación (202). Sin embargo, en este caso las variaciones de las diferentes isoformas se producen en el mismo sentido, apuntando a una alteración a nivel de proteína total, por lo que probablemente las alteraciones se estén produciendo a nivel de la síntesis y/o la liberación a la sangre de las proteínas, y no por mediación de modificaciones post-traduccionales. En cualquier caso, sería preciso hacer un estudio detallado de las modificaciones post-traduccionales de estas isoformas para poder confirmarlo.

Uno de los grupos predominantes tras la realización de la clasificación funcional fue el de coagulación. De hecho, estudios previos han relacionado un estado de hipercoagulación con diversas enfermedades cardiovasculares como angina de pecho (203), accidente cerebrovascular (204) o aterosclerosis (205). Concretamente en el caso de la EAD, se ha sugerido que las turbulencias que aparecen en el flujo sanguíneo con motivo de la incorrecta apertura de la válvula pueden ocasionar una mayor formación de trombina y activación de plaquetas (29) o una disminución de la fibrinólisis (206). Como vemos en la figura D.1., el **factor de coagulación XII**, disminuido en pacientes con EAD es clave para desencadenar estas cascadas (207). Este factor es un zimógeno que se activa mediante proteólisis, habiéndose relacionado su disminución como un factor de riesgo de infarto de miocardio y enfermedad coronaria (208, 209). Su activación inicia la vía intrínseca de coagulación, en la que participan el **fibrinógeno**, la **antitrombina III** y la **vitronectina**. El fibrinógeno es una glicoproteína soluble que es procesada por la serín proteasa trombina para formar filamentos insolubles de fibrina, componente principal de los coágulos/trombos. La trombina está regulada negativamente por la antitrombina III, que inhibe la formación de coágulos. De forma inversa, la vitronectina se une a la heparina y protege a la trombina de la inactivación

mediada por la antitrombina, por lo que su aumento en los pacientes de EAD indicaría un estado pro-trombótico (210). Tanto la disminución de los niveles de factor XII y antitrombina III como el aumento de vitronectina y fibrinógeno en el grupo con EAD sugieren que estos pacientes son más propensos a sufrir un evento trombótico.

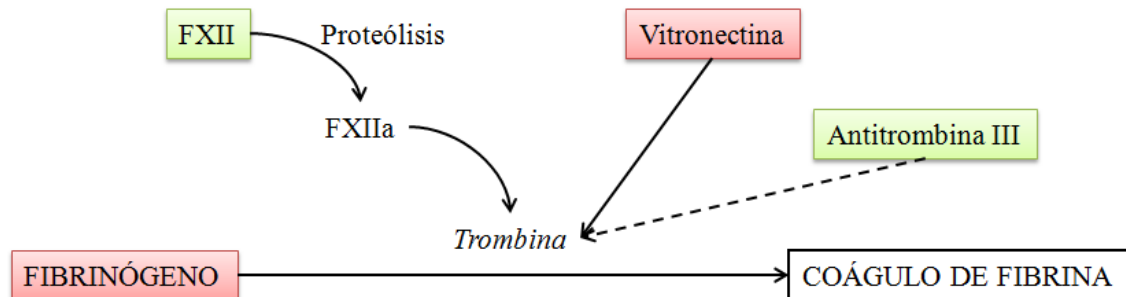


Figura D.1. Esquema de las proteínas alteradas implicadas en coagulación. Se muestran en rojo y en verde las proteínas aumentadas y disminuidas en EAD, respectivamente. Abreviatura: FXII=Factor de coagulación XII. → Activación; - - → Inhibición.

Es importante no ver la coagulación y la inflamación como fenómenos aislados ya que muchas proteínas están implicadas en ambos procesos (211, 212). Dentro de las proteínas relacionadas con el complemento, hemos encontrado en pacientes con EAD niveles disminuidos del **complemento C4** y aumentados de la **proteína 1 relacionada con el factor H del complemento**. Por un lado, niveles bajos del complemento C4 están relacionados con la activación de la vía clásica del complemento debido a que éste se procesa mediante proteólisis (213). Por otro lado, la proteína 1 relacionada con el factor H del complemento está asociada con la vía alternativa del complemento, favoreciendo la activación de C3 y la amplificación de C3b mediante la inhibición del factor H del complemento (214). Estos resultados indican una activación de la respuesta inmune e inflamatoria a través de la cascada del complemento, tanto a nivel de la vía clásica como de la alternativa.

Como hemos visto en la introducción, uno de los factores de riesgo para el desarrollo de la EAD es la hipercolesterolemia. Un correcto transporte y metabolismo de los lípidos es imprescindible para evitar su acumulación en los tejidos periféricos y en este proceso las apolipoproteínas juegan un papel fundamental. Concretamente, la **apolipoproteína C-II** está relacionada con el metabolismo de lípidos de procedencia exógena, es decir, ingeridos en la dieta. Esta proteína forma parte de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, *Very low density proteins*) y puede activar a la lipoproteína lipasa, la

enzima que hidroliza los triglicéridos a ácidos grasos. Sin embargo, también se ha visto que un aumento de apolipoproteína C-II en plasma inhibe a la lipoproteína lipasa, favoreciendo la hipertrigliceridemia (215-217). Su aumento también se ha relacionado con una alteración de la ruta de transporte reverso del colesterol (218), necesaria para evitar la acumulación de colesterol en tejidos periféricos mediante su captación y transporte al hígado y tejidos esteroideogénicos. Actualmente, niveles elevados de ApoCII se considera un factor de riesgo cardiovascular. También implicada en el transporte de lípidos, concretamente asociada a lipoproteínas de alta densidad (HDL, *High density lipoproteins*), encontramos la **clusterina** o apolipoproteína J (219). Esta glicoproteína, además de participar en el transporte de lípidos durante la diferenciación celular y la apoptosis (220), induce la salida de colesterol de las células espumosas (221). En nuestro caso, la clusterina podría estar disminuida en pacientes con EAD, lo que además concuerda con estudios previos del grupo realizados en secretoma (150). Hay que tener en cuenta que en la misma mancha proteica se ha identificado también la proteína ITIH4, por lo que no podemos estar seguros de que proteína es la causante de la alteración. Sin embargo, teniendo en cuenta que se han encontrado niveles aumentados de otra isoforma de la ITIH4 y que la clusterina ha sido descrita previamente en la EAD, hemos considerado interesante incluirla en la discusión.

La aparición de la disfunción y la activación endoteliales es clave para el inicio de la EAD y da lugar a una alteración de las funciones normales del endotelio vascular, que son la regulación de la coagulación, inflamación y el tono vasomotor (222). Esto conlleva la producción de moléculas de adhesión y citoquinas pro-inflamatorias como el activador tisular del plasminógeno, el inhibidor del activador del plasminógeno-1, la interleuquina-6 (IL6) o la proteína C reactiva (223). La IL6 regula la síntesis de proteínas de fase aguda positivas como la **haptoglobina** (224) y la **ITIH4** (225) (226), que se han encontrado aumentadas en pacientes con EAD en este estudio. Estas proteínas se han relacionado con diferentes enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis (227). Sin embargo, la inflamación es un mecanismo inespecífico y está relacionada con enfermedades muy diferentes como las hepáticas (198), renales (228) o tumorales (197), por lo que el potencial valor diagnóstico de estas proteínas podría ser menor que el de proteínas de procesos específicos de la EAD.

2.1.2. ESTUDIO METABOLÓMICO DE PLASMA HUMANO

Para el análisis metabolómico mediante GC-MS no fue necesario realizar la depleción de las proteínas mayoritarias ya que todo el componente proteico del plasma es eliminado antes del análisis.

Los resultados del estudio comparativo mostraron 19 metabolitos con diferencias estadísticamente significativas, todos ellos aumentados en el grupo de pacientes con EAD: ácido málico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido tartrónico, alanina, ácido aspártico, leucina, isoleucina, glicina, serina, treonina, 5-hidroxitriptófano (5-HTP), ácido aminomalónico, 5-oxoprolina, monolinoleína, glucitol, ácido glucónico, 6-octadecanoato- α -D-glucopiranosido y ácido tetrahidroxipentanoico-1,4-lactona. Hay que tener en cuenta que cuando los ácidos pierden protones se utiliza el sufijo *-ato*, por lo que hablaremos de malato, citrato, succinato, etc. Los análisis multivariantes posteriores confirmaron una buena separación de los grupos de estudio, tanto en el ACP como en el análisis jerárquico, lo que confirma una buena selección de los grupos. Algunos de los metabolitos significativamente aumentados en este estudio pertenecen o están directamente relacionados con el ciclo del ácido cítrico y, como iremos viendo a continuación, su aumento favorece la producción de energía a nivel de la cadena respiratoria. El ciclo del ácido cítrico es la vía central del metabolismo, mediante la cual se catabolizan todos los combustibles metabólicos (hidratos de carbono, lípidos y proteínas) en los organismos y tejidos aerobios (figura D.2). En este proceso, el piruvato obtenido a partir de la glucosa mediante un proceso de glucólisis anaerobia se oxida, generándose equivalentes reductores (NADH y FADH₂) que posteriormente entran en la cadena respiratoria, donde son generadas grandes cantidades de ATP en el proceso de fosforilación oxidativa (figura D.2).

En condiciones normales, en cada ciclo del ácido cítrico se generan, además de una molécula de ATP, 3 de NADH y una de FADH₂ (figura D.3) que, tras la fosforilación oxidativa, darán lugar a 9 moléculas de ATP (2 por cada NADH y 3 por cada FADH₂).

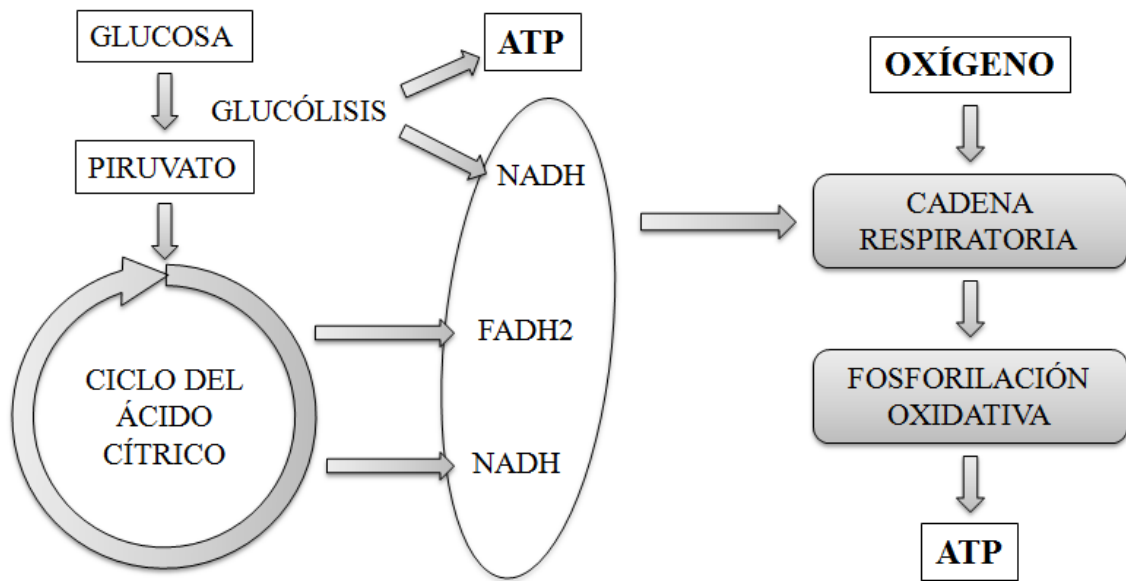


Figura D.2. Esquema del metabolismo energético en las células animales.

Sin embargo, este proceso es aerobio y requiere oxígeno como oxidante final de los equivalentes reductores. Por eso, el déficit de oxígeno causa la inhibición total o parcial del ciclo.

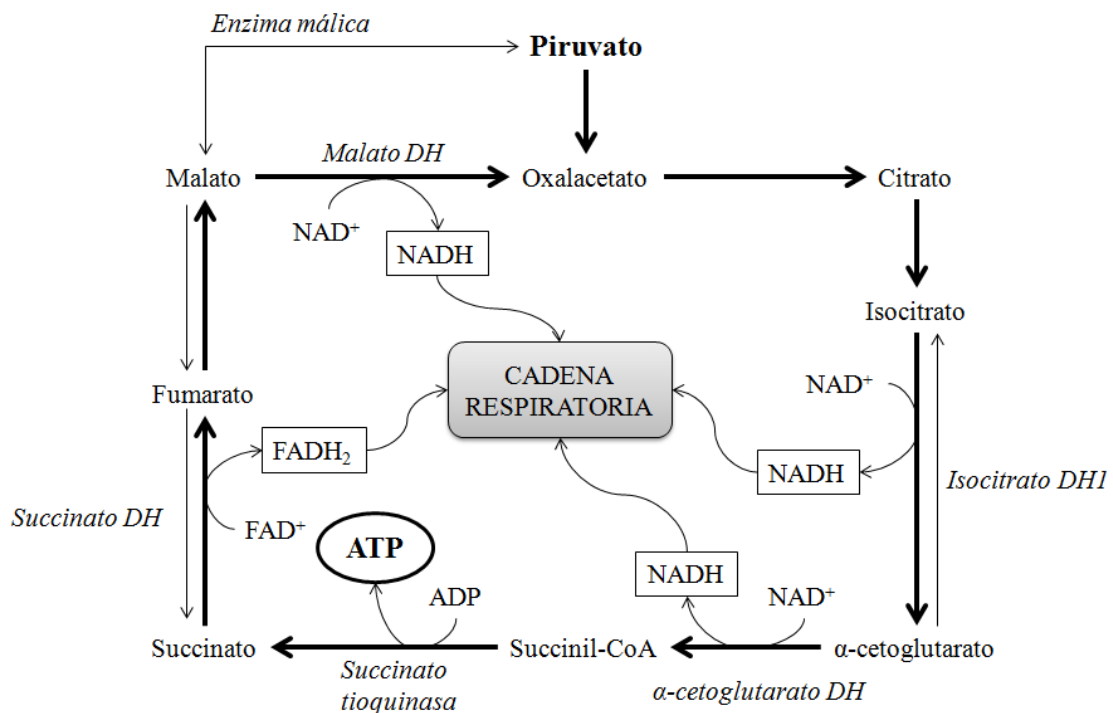


Figura D.3. Esquema del ciclo del ácido cítrico en condiciones normales. DH=Deshidrogenasa.

En las valvulopatías, el aporte de sangre a los tejidos periféricos se encuentra disminuido, lo que implicaría que la cadena de transporte electrónico se ralentice y el aporte de energía pueda resultar insuficiente. En estos casos, se produce una modificación del ciclo del ácido cítrico habitual, disminuyendo los equivalentes reductores generados para producir más ATP a nivel de la enzima succinato tioquinasa, por lo que la oxidación del piruvato pasa a un segundo plano, tomando más importancia el metabolismo del α -cetoglutarato (figura D.4).

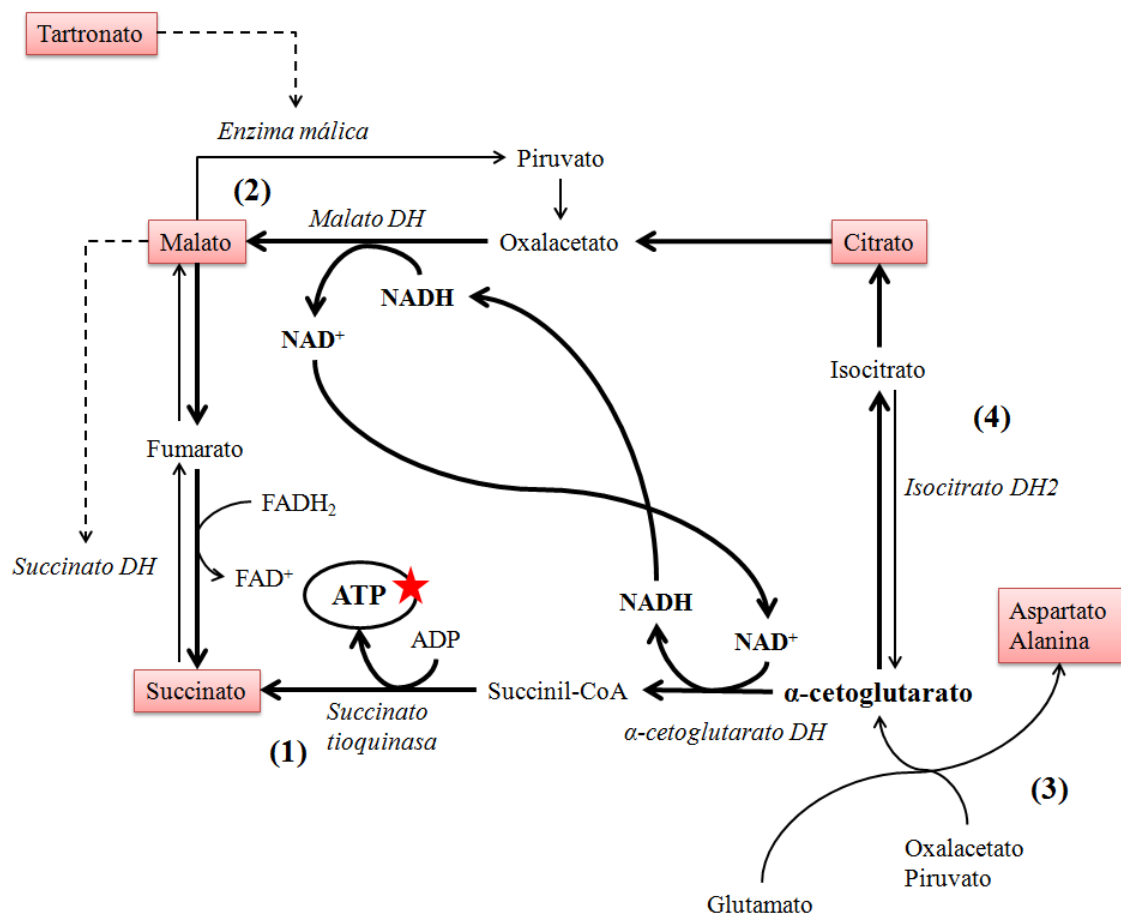


Figura D.4. Esquema del ciclo del ácido cítrico en el que se destacan las modificaciones sufridas debido a la hipoxia. Para el mantenimiento de la producción del ATP en condiciones de hipoxia debe favorecerse la síntesis de succinato a partir de α -cetoglutarato (1). Para ello, se aumenta la síntesis de malato mediante la malato DH (2), generando el NAD^+ necesario para el metabolismo del α -cetoglutarato. La síntesis de α -cetoglutarato se produce por transaminación del oxalacetato y del piruvato, liberándose aspartato y alanina (3). También se produce un aumento en la síntesis de isocitrato a partir de α -cetoglutarato debido a la activación de la isocitrato DH2 (4). Se muestran en rojo los metabolitos aumentados en EAD.

Para que se produzca la formación de ATP a nivel de la succinato tioquinasa, la disponibilidad de succinil-CoA ha de ser suficiente. Para ello, la α -cetoglutarato deshidrogenasa necesita α -cetoglutarato como sustrato de la reacción. La síntesis de α -cetoglutarato ocurre mediante las reacciones de transaminación, en las que el piruvato y el oxalacetato se combinan con el glutamato para producir α -cetoglutarato, liberando **alanina** y **aspartato**, respectivamente (figura D.5). Mediante estas reacciones se produce un aumento de alanina y aspartato, aminoácidos que hemos encontrado aumentados en EAD en nuestro estudio.

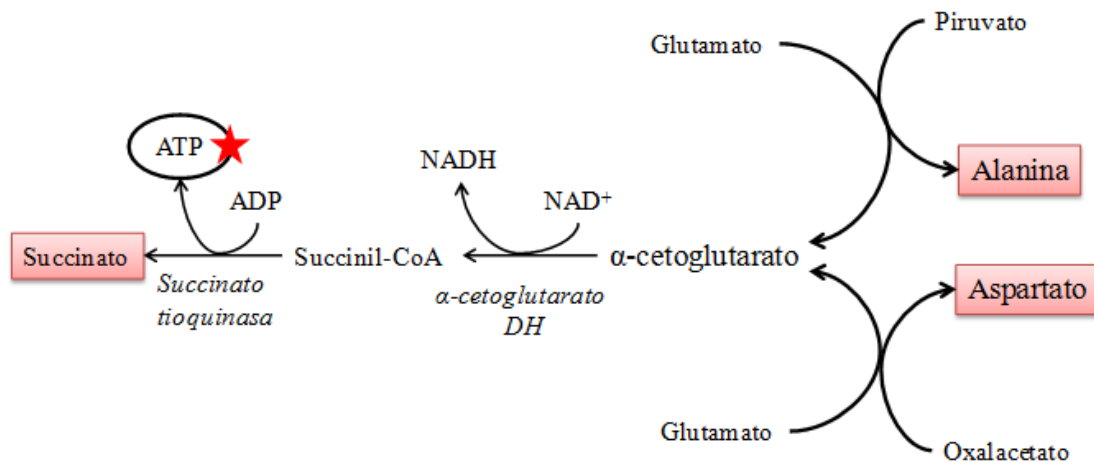


Figura D.5. Reacciones de transaminación en las que se genera α -cetoglutarato con la liberación de alanina y aspartato.

También es imprescindible para la reacción la existencia de NAD^+ , que se genera gracias a la acción de la enzima malato deshidrogenasa (figura D.4). Esta enzima sintetiza **malato** a partir del oxalacetato mediante la oxidación de NADH , generando el NAD^+ necesario para el funcionamiento de la α -cetoglutarato deshidrogenasa de forma anaeróbica. Esta reacción produce un aumento en los niveles de malato que actúa a nivel de la succinato deshidrogenasa, inhibiendo el paso de **succinato** a fumarato (229) y provocando la acumulación de este metabolito, como hemos observado en los pacientes con EAD. A su vez, en este estudio hemos encontrado niveles elevados de **tartronato**, análogo del malato, que inhibe a la enzima málica impidiendo que el malato generado sea convertido a piruvato (230, 231). Acorde a nuestros resultados, estudios previos han relacionado con la isquemia el aumento de los niveles de malato, una mayor

conversión de α -cetoglutarato a succinato y la salida de éste desde el órgano isquémico (232-235).

El α -cetoglutarato no se metaboliza únicamente mediante la α -cetoglutarato deshidrogenasa. En condiciones de hipoxia continuada se produce la estabilización del factor inducido por hipoxia-1 (HIF-1) (236, 237) que activa a su vez a la enzima isocitrato deshidrogenasa 2, promoviéndose la carboxilación del α -cetoglutarato hasta el **citrato**, también encontrado elevado en pacientes con EAD en nuestro estudio (figura D.4) (238). Nuestros resultados sugieren que existe una relación entre los intermediarios del ciclo del ácido cítrico y la protección frente a hipoxia, lo que concuerda con lo descrito previamente (239).

Como hemos visto, la entrada de piruvato en el ciclo del ácido cítrico se encuentra disminuida en condiciones de hipoxia. En parte, esto se debe a la acción del HIF-1, que actúa sobre la lactato deshidrogenasa A y la piruvato deshidrogenasa 1, disminuyendo la conversión de piruvato a acetil CoA y favoreciendo el paso de piruvato a lactato (figura D.6) (240, 241).

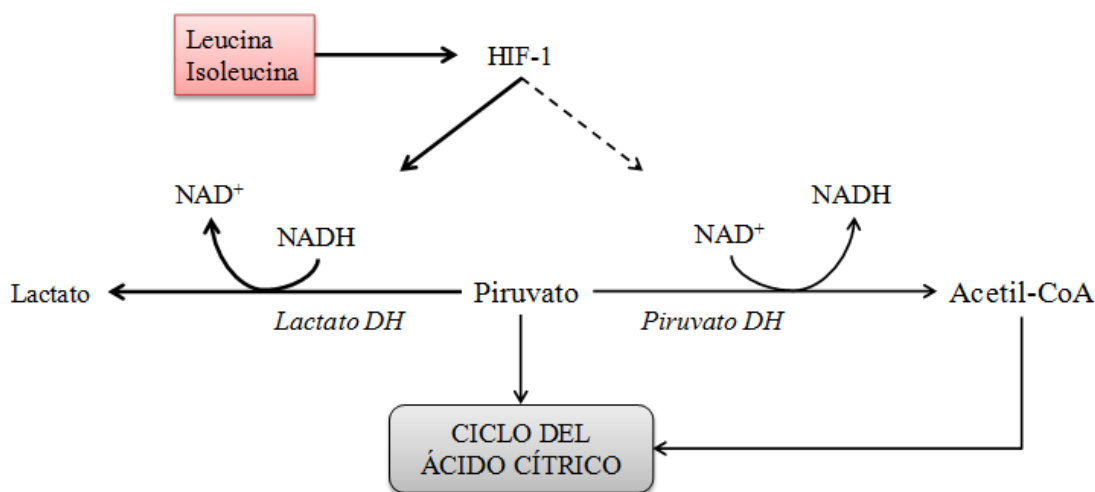


Figura D.6. Esquema del efecto del factor inducido por hipoxia-1 (HIF-1) en el metabolismo del piruvato. DH=deshidrogenasa.

En el análisis metabólico diferencial hemos encontrado niveles elevados de **leucina** e **isoleucina** en los pacientes con EAD. En relación a la hipoxia, también se ha visto que niveles elevados de aminoácidos de cadena ramificada (valina, **leucina** e **isoleucina**)

aumentan la expresión de HIF-1, seguramente debido a que activan las vías mTOR (242, 243). HIF-1 es uno de los mayores activadores transcripcionales del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*), una proteína señalizadora implicada en la angiogénesis (244). Además, tanto HIF-1 como mTOR, están relacionados con la osteogénesis a partir de células mesenquimales mediante un aumento de la proteína morfogénica ósea 2 (BMP-2, *Bone Morphogenetic Protein 2*). Diversos estudios previos han demostrado la importancia de las proteínas VEGF (28, 245) y BMP-2 (246) (247) en el desarrollo de la EAD, lo que podría estar relacionado con los altos niveles de leucina e isoleucina encontrados en este estudio. La isoleucina es, a su vez, un inhibidor de la enzima treonina desaminasa (248, 249), responsable del catabolismo de la **treonina** (250). Esto explicaría los niveles elevados de treonina que hemos encontrado en los pacientes de EAD ya que, como la treonina es un aminoácido esencial, su acumulación ha de deberse a una disminución de su catabolismo o, en todo caso, de su ingesta, la cual no debería ser diferente entre los dos grupos de estudio.

Hemos encontrado alteraciones metabólicas en el plasma que podrían reflejar la degradación de la matriz extracelular que está ocurriendo a nivel tisular. En los pacientes con EAD, hemos encontrado niveles aumentados de **glicina**, el aminoácido mayoritario del colágeno. Un aumento en los niveles de este aminoácido puede deberse al proceso de degradación que sufre el colágeno de la VA. Un mecanismo similar se ha descrito en la osteoartritis, una enfermedad inflamatoria con una importante degradación del tejido cartilaginoso (251). También se ha visto que la glicina mejora la microcirculación (252), inhibe la inflamación (253, 254) y disminuye la agregación plaquetaria bloqueando el flujo de calcio a su interior (255), por lo que su aumento, a costa de la degradación de colágeno, podría ser un mecanismo para ralentizar el desarrollo de la patología. La glicina puede ser convertida en **serina**, también aumentada en pacientes con EAD, a través de una reacción reversible, por lo que los niveles entre ellas están estrechamente relacionados.

Al igual que en el estudio proteómico, los resultados de este estudio muestran alteraciones en los procesos de coagulación. Entre ellas, destaca la del **5-hidroxitriptófano**, un derivado del triptófano y precursor de la serotonina que ha sido previamente relacionado con el infarto de miocardio (165). La serotonina está implicada

en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares como EAC (256) e infarto de miocardio (257). Ésta se almacena principalmente en los α -gránulos de las plaquetas (258) hasta que se produce la activación plaquetaria, generándose un estado pro-trombótico (259, 260). Sin embargo, el papel de la serotonina en la activación y agregación de plaquetas ha sido poco estudiado hasta el momento por lo que se conoce su efecto pero no el mecanismo por el que se produce (258). A nivel de la VA, se han encontrado receptores de serotonina en las células intersticiales que, como respuesta a ese estímulo, inducen la producción de glucosaminoglicanos (261) y aumentan la división celular (262). Por ello, pensamos que los elevados niveles de 5-hidroxitriptófano encontrados supondrán un aumento de serotonina, que podría estar actuando sobre las VICs, contribuyendo a la fibrosis y el engrosamiento del tejido.

Como ya hemos comentado, el estrés oxidativo juega un papel importante en el desarrollo de la EAD. El glutatión es el principal antioxidante endógeno y es imprescindible en el mantenimiento de una respuesta inmune adecuada. En aterosclerosis, se ha demostrado que el glutatión disminuye la oxidación de las LDL (263) y, además, protege a los macrófagos (264), relacionándose el aumento de glutatión con una reducción de la extensión y la gravedad de la enfermedad. La **5-oxoprolina** es un intermediario que sólo se sintetiza y acumula cuando disminuye la síntesis de glutatión, por lo que su elevación en nuestro estudio se relaciona con bajos niveles de glutatión y éstos con un mayor desarrollo de EAD.

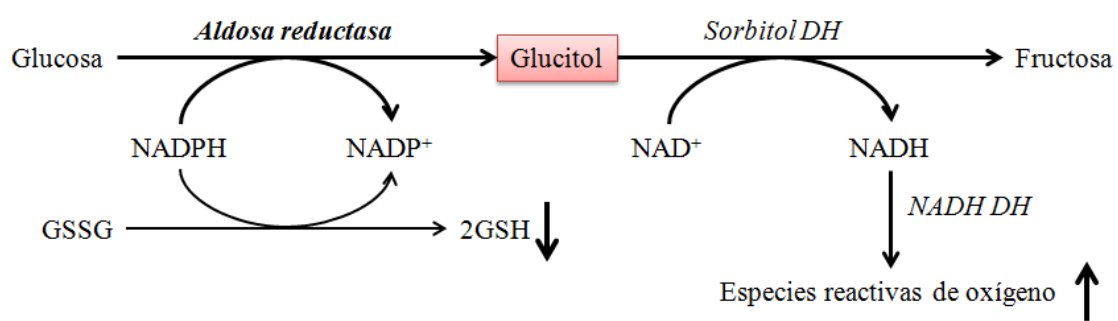


Figura D.7. Esquema de la relación entre la aldosa reductasa y el glutatión. La enzima consume el NADPH necesario para convertir el glutatión oxidado (GSSG) en glutatión reducido (GSH).

Otro indicio de que el glutatión puede estar implicado en la EAD son los altos niveles encontrados de **glucitol**, también llamado sorbitol. La reducción de la glucosa mediante la enzima aldosa reductasa para producir glucitol consume NADPH, disminuyendo los

niveles de glutatión reducido y contribuyendo al estrés oxidativo (figura D.7) (265, 266). La presencia de la aldosa reductasa en plaquetas ha sido demostrada, y ésta favorece su agregación (267), así como la inflamación (268) y el desarrollo de aterosclerosis (269) (270).

Por otro lado, hemos encontrado alterado el **gluconato**, también derivado de la glucosa. Este compuesto es producto de la oxidación de la glucosa a través de un intermediario denominado d-glucono- δ -lactona, con el que se encuentra en equilibrio (271). Estos derivados de la glucosa tienen muchas aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica. Sin embargo, su actividad biológica no se conoce bien aunque se cree que actúan como antioxidantes, protegiendo a proteínas y lípidos plasmáticos (272). Además, recientemente, se ha publicado un estudio que destaca el uso del ácido glucónico, en combinación con ácido láctico, para desmineralizar muestras calcificadas embebidas en formalina, concretamente válvulas cardíacas y arterias coronarias (273). Este resultado podría tener una importante relevancia en el desarrollo de la EAD, ya que su aumento en estos pacientes podría ser un mecanismo de defensa ante la calcificación, aunque son necesarios más estudios para confirmarlo.

En consonancia con los estudios anteriores, hemos encontrado alteraciones a nivel del metabolismo lipídico, como sugiere el aumento de **monolinoleína**. Aunque no hay muchos estudios sobre este monoacilglicerol, se ha visto que su presencia retrasa la captación hepática de los quilomicrones remanentes (274). Esto se asocia a un aumento de colesterol circulante en la sangre y, a su vez, a procesos aterogénicos (275, 276). Este metabolito podría estar relacionado con el aumento lipídico observado en las válvulas estenóticas.

También relacionado con la aterosclerosis hemos hallado cambios en los niveles de **aminomalonato**, metabolito que, a pesar de haberse localizado muy pronto en la placa aterosclerótica (277), se ha estudiado muy poco. Se sabe que su captación por la placa es alta, posiblemente a través de los monocitos circulantes (278) y se cree que el aumento de este aminoácido en la composición de las proteínas está relacionado con la inhibición de las metaloproteinasas (279). Debido a las similitudes en el papel de los monocitos entre aterosclerosis y EAD, podría estar relacionado con los mismos procesos, sin embargo, son necesarios más estudios acerca de este metabolito para esclarecer su función.

2.1.3. INDICIOS A NIVEL PLASMÁTICO DE LA CALCIFICACIÓN DE LA VÁLVULA AÓRTICA

Como ya hemos venido comentando a lo largo de esta tesis, el estado del plasma es un reflejo de todos los procesos fisiopatológicos que están teniendo lugar en el organismo. En este caso, los resultados de los análisis proteómicos y metabolómicos realizados a nivel de plasma han mostrado indicios de las alteraciones que se están dando a nivel valvular.

Destacan las alteraciones encontradas en los mecanismos de coagulación y activación plaquetaria, con varias proteínas y metabolitos implicados, así como las adaptaciones que se producen a nivel energético. Además, las alteraciones encontradas a nivel de metabolismo lipídico indican una alteración a nivel de la captación hepática de colesterol, lo que produciría una mayor acumulación de lípidos en los tejidos periféricos. Estos resultados muestran además que el estrés oxidativo y los mecanismos de inmunidad e inflamación juegan un papel fundamental en el desarrollo de la EAD.

2.2. ESTUDIO PROTEÓMICO A PARTIR DE MUESTRAS DE TEJIDO HUMANO

El objetivo de estos estudios, utilizando tejido valvular aórtico, fue el de detectar las alteraciones que se producen a nivel local. A diferencia del plasma, el tejido no es una muestra accesible. Sin embargo, nos permite profundizar en los mecanismos moleculares que están ocurriendo en el propio tejido dañado, es decir, aquellos que están directamente implicados en el desarrollo de la EAD.

2.2.1. ANÁLISIS DE LA VÁLVULA ESTENÓTICA MEDIANTE HISTOLOGÍA MOLECULAR

El análisis mediante MALDI-IMAGING nos permitió estudiar la distribución superficial de los péptidos endógenos del tejido, utilizando la potencia analítica de la MS.

Se analizaron 3 secciones de una misma válvula con creciente grado de afectación, con el objetivo de localizar diferencias a nivel molecular en los distintos niveles de la lesión. Además, se realizaron tinciones histológicas de fibras elásticas y lípidos, así como

inmunohistoquímicas para la detección de macrófagos y miofibroblastos. Al ir avanzando en el estudio de la lesión, observamos una mayor degradación del tejido debido a la extensión de la región calcificada, lo que afectó a la integridad del tejido (Figura D.8). Por ello, la resolución de las imágenes moleculares y la calidad de las histologías de la tercera sección, que es la más afectada, es menor que en las dos primeras, en las que se pudo alcanzar una resolución espacial muy buena ($75\ \mu\text{m}$).

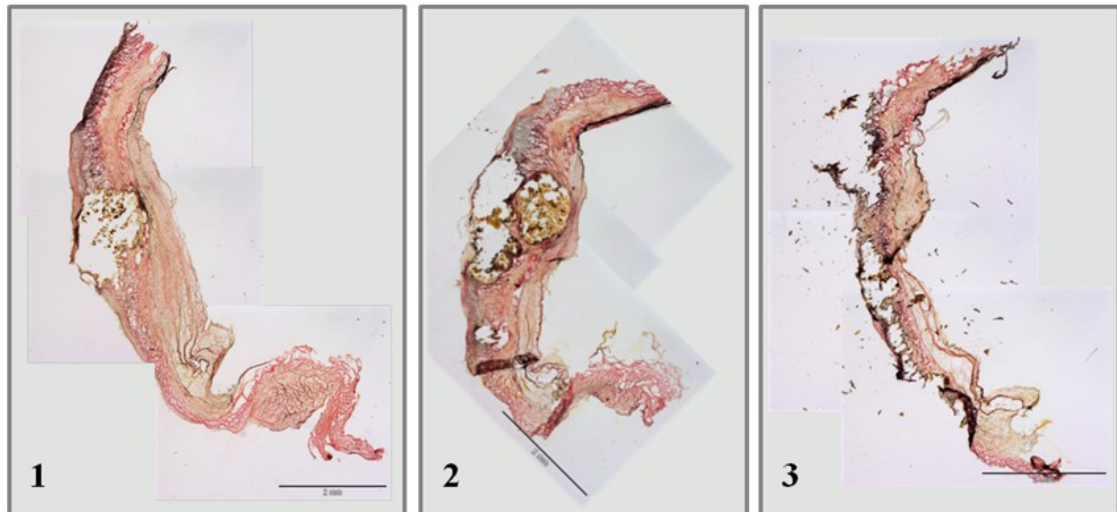


Figura D.8. Tinción de fibras elásticas. Se muestran las tinciones de las 3 secciones de estudio, donde se aprecia la degradación tisular.

En base a las regiones observadas mediante técnicas histológicas, se realizó una inspección manual de los picos del espectro para corroborar la existencia de una correspondencia entre las imágenes obtenidas por histología y las moleculares (figura D.9). La zona de la calcificación presentaba mayor señal y se correspondía con una masa $5059\ \text{Da}$, mientras que la masa 4300 parecía situarse en zonas ricas en colágeno y la 13984 en regiones ricas en fibras elásticas. Por otro lado, encontramos una región perfectamente definida y rica en fragmentos con una masa de $14659\ \text{Da}$ que no se correspondía directamente con ninguna de las regiones observadas en la histología. Este hecho implica que existen regiones que presentan un patrón de picos m/z característico que no somos capaces de observar mediante técnicas histológicas de rutina.

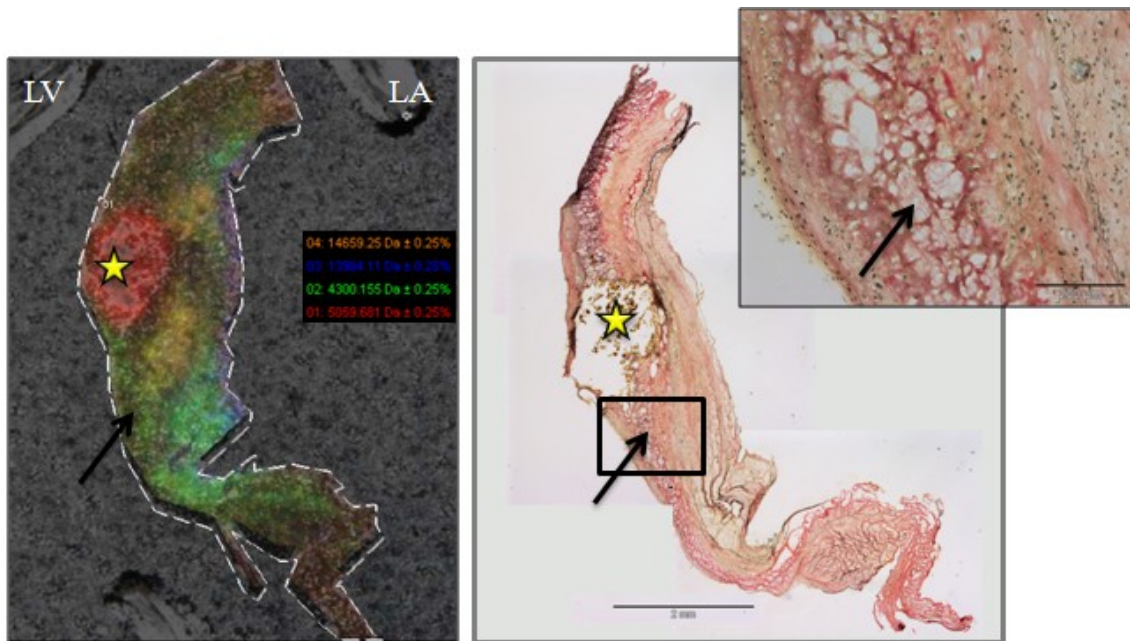


Figura D.9. Imagen donde se muestran las masas seleccionadas y su correspondencia con las regiones observadas en la tinción de fibras elásticas. En la tinción de fibras elásticas, las zonas rosas corresponden a colágeno y las negras a elastina. Se señalan la calcificación (estrella) y una zona rica en colágeno (flecha). Se indican el lado ventricular (LV) y el aórtico (LA). La parte superior corresponde a la inserción con la aorta.

Tras la realización de los análisis multivariantes no supervisados, encontramos que, según avanza la calcificación, existen menos diferencias interzonales y, además, peor definidas, lo cual es lógico puesto que el tejido está más dañado. En la primera preparación (figura D.10A) se observa que la zonas coincidentes con la capa ventricular y el subendotelio presentan un patrón molecular similar (región de color rosa), totalmente diferente de la región central de la valva, donde no se diferencian las estructuras correspondientes a las capas fibrosa y esponjosa. Además, la zona calcificada se separa perfectamente del resto y presenta dos regiones adyacentes claramente definidas (color azul oscuro y verde oscuro) que pueden estar relacionados con el avance de la lesión, ya que en cortes posteriores aparecen en forma de nódulos de calcio. En la segunda preparación (figura D.10B), se mantiene la diferenciación de la zona calcificada (región morada) del resto del tejido mientras la estructura en capas observada en la primera preparación parece haberse perdido. En la tercera región (figura D.10C) se observan estructuras dispersas a nivel molecular. Estas observaciones concuerdan con el proceso degenerativo de la EAD, ya que el tejido sufre una severa desestructuración según avanza la lesión (280).

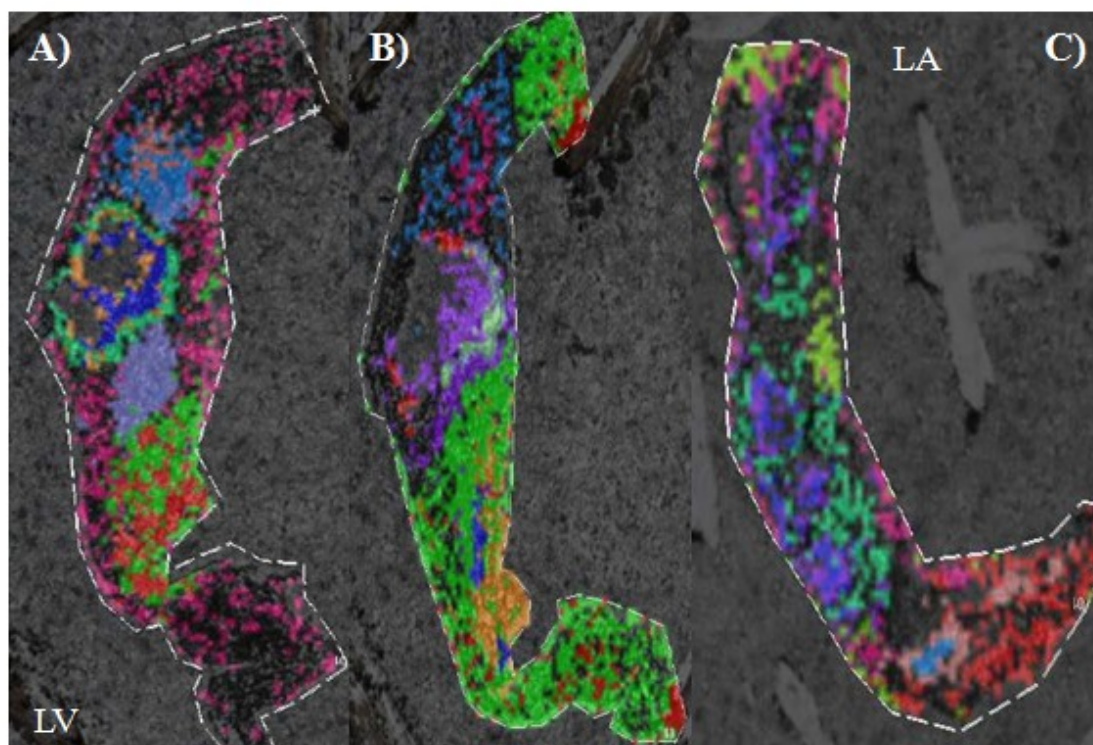


Figura D.10. Regiones diferenciales encontradas tras el análisis de agrupación jerárquica. Se muestran las secciones 1 (A), 2 (B) y 3 (C). Se indica el lado ventricular (LV) y el aórtico (LA), correspondiendo la parte superior a la inserción en la aorta.

Por un lado, el análisis mediante MALDI-IMS nos permitió confirmar la desestructuración de las capas valvulares asociada al desarrollo de la EAD. Además, debido a que presenta mayor resolución que las técnicas histológicas habituales, permite una mejor definición de las regiones que pueden estar implicadas en la alteración funcional de la válvula. Las masas que en este análisis han sido asociadas con regiones concretas de la lesión constituyen una alternativa al análisis anatomopatológico por histología tradicional y permitirán en el futuro caracterizar tejidos de VA con diferentes grados de lesión estenótica a nivel molecular, con gran resolución. Por otro lado, el uso de métodos estadísticos no dirigidos, sin sesgo, permite definir nuevas regiones de interés que no hayan sido localizadas mediante técnicas habituales y encaminar los estudios posteriores a esas zonas.

2.2.2. ESTUDIO DE PROTEÓMICA DIFERENCIAL DE TEJIDO VALVULAR

Las manchas proteicas de interés se escindieron de los geles y se analizaron mediante MALDI-TOF/TOF. De las 32, se identificaron 20 que correspondieron a 11 proteínas

únicas. Se encontraron aumentadas en EAD el mimecan y la dermatopontina. Estaban disminuidas en EAD la β -2-glicoproteína 1 (o apolipoproteína H), la proteína de unión al selenio 1, la albúmina, la proteína 1 de unión entre hialuronán y proteoglicano, la α -enolasa, la 6-fosfogluconolactonasa, la proteína sérica amiloide A-1 y la región constante de las cadenas ligeras λ y κ de la inmunoglobulina.

En este estudio, hemos encontrado alteraciones en varias proteínas relacionadas con la calcificación y el engrosamiento de la válvula aórtica, características que no aparecen en válvulas de pacientes con IA. Los resultados muestran que en las válvulas estenóticas aparecen niveles elevados de **mimecan** y **dermatopontina** y niveles disminuidos de la **proteína de unión al selenio 1** (SBP1, *Selenium binding protein 1*). El mimecan (también llamado osteoglicina) es un proteoglicano pequeño rico en leucina descrito por primera vez en hueso bovino como inductor de matriz (281). Estudios más recientes han confirmado su elevación durante la diferenciación y mineralización osteoblástica (282, 283), por lo que en EAD podría estar implicado en la formación de los nódulos de calcio por parte de los osteoblastos. La dermatopontina es una proteína de matriz extracelular que se expresa en diferentes tejidos, y que está implicada en adhesión celular (284) y ensamblaje de la matriz (285). A nivel cardíaco, se ha visto que aumenta en condiciones de hipoxia, promoviendo la adhesión y migración de los fibroblastos (286). Como hemos comentado anteriormente, en el tejido valvular calcificado se produce un engrosamiento que dificulta la llegada de oxígeno a todas las células del mismo, lo que podría explicar los elevados niveles de esta proteína en válvulas estenóticas. Por otro lado, hemos encontrado en el grupo con EAD niveles disminuidos de la proteína de unión al selenio 1 (SBP1), que participa en el tráfico y transporte de proteínas (287). A nivel de células musculares lisas vasculares se ha descrito que el TGF- β disminuye los niveles de SBP1 (288). Además, en este estudio, los niveles de SBP1 eran inversamente proporcionales a la proliferación celular. Nuestros resultados sugieren que en el contexto de incremento de la proliferación celular asociado al engrosamiento valvular en la EAD (289, 290) podría estarse produciendo la reducción de SBP1 a consecuencia de unos elevados niveles de TGF- β (291).

Sorprendentemente, hemos encontrado disminuidas en EAD proteínas relacionadas con el remodelado de la matriz extracelular: la **proteína 1 de unión entre hialuronán y proteoglicano (HAPLN1)** y la **α -enolasa**. Sin embargo, en ambos casos, se ha descrito

una relación inversa entre los niveles de proteína y de metaloproteinasas (MMPs). La proteína HAPLN1, también llamada proteína de unión a cartilago, interacciona con el ácido hialurónico y proteoglicanos, como el agregcano o el versican, dando estabilidad a la matriz extracelular (292). Estudios previos con condrocitos han demostrado que el TNF- α disminuye la expresión de HAPLN1 mientras que aumenta la de metaloproteinasas como MMP9 (293), por lo que la disminución de HAPLN1 en pacientes con EAD podría estar relacionada con el remodelado de la matriz extracelular descrito en la enfermedad (294) y apuntaría a una desestabilización de ésta, en línea con la pérdida de la estructura de capas típica de la VA observada en los experimentos de histología molecular por MALDI-IMS. La α -enolasa es una proteína multifuncional relacionada con el metabolismo glucolítico que se encuentra aumentada en condiciones de hipoxia (295, 296). Sin embargo, gracias a un codón de parada alternativo, el ARNm de la α -enolasa puede traducirse en una isoforma más pequeña de 37 kDa denominada proteína de unión al promotor de *c-myc* (MBP-1, *c-myc promoter-binding protein 1*) (297) que coincide en MM con las manchas proteicas encontradas en el análisis proteómico. Además, todos los péptidos encontrados en la identificación mediante MS se corresponden con esa isoforma. Al contrario que la α -enolasa, la MBP-1 tiene un papel antitumoral y se encuentra inhibida en condiciones de hipoxia (298). Además, es inhibida por la expresión de colágeno y MMP2 (299). Esto sugiere que la disminución encontrada en el grupo de individuos con EAD podría deberse a la isoforma MBP-1 de la α -enolasa, cuya disminución sería favorecida por el aumento de colágeno y MMP2 característico de la EAD (300, 301), por lo que su alteración también estaría implicada en el remodelado de la matriz.

Nuestros resultados sugieren que los individuos con EAD podrían presentar una menor protección frente a la oxidación que los individuos con IA. Como se ha comentado previamente, el glutatión es el principal antioxidante endógeno, protegiendo a las células del estrés oxidativo, y, además, ejerce un papel protector contra el desarrollo de aterosclerosis (263, 264). Para el mantenimiento de este sistema, es necesario que parte de la glucosa se desvíe a la ruta de las pentosas fosfato y así generar el NADPH necesario para convertir el glutatión oxidado en glutatión reducido (Figura D.11) (302). Por lo tanto, la disminución de la **6-fosfogluconolactonasa**, una enzima de la ruta de las pentosas fosfato, encontrada en los pacientes con EAD, supondría una menor protección frente al estrés oxidativo en la VA, en relación a los pacientes con IA, ya que supondría

la acumulación de 6-fosfogluconolactona y la inhibición de la reacción catalizada por la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, fundamental para la oxidación del glutatión(303). Por su parte, la **β -2-glicoproteína 1**, también llamada apolipoproteína H (ApoH), previene la activación de la cascada intrínseca de coagulación uniéndose a los fosfolípidos de la superficie de células dañadas (304). Además, utilizando cultivos de macrófagos, se ha visto que inhibe la oxidación de las LDL y la acumulación de lípidos, promoviendo la salida de colesterol de los macrófagos (305). La menor abundancia de esta proteína en individuos con EAD frente a IA también indicaría una menor actividad anti-oxidante en el tejido valvular estenótico, así como un mayor entorno pro-coagulante.

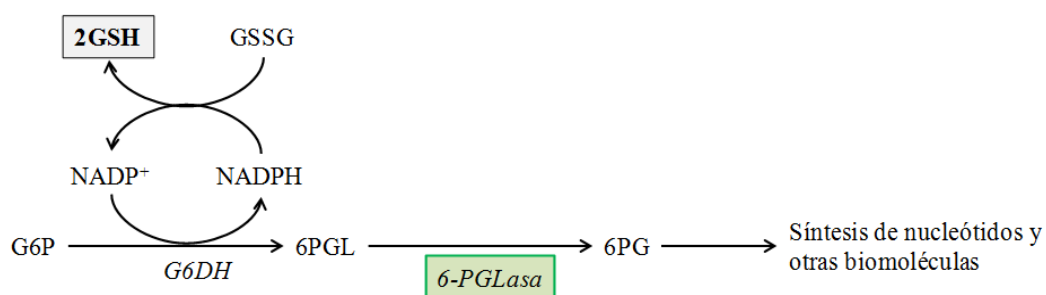


Figura D.11. Esquema que muestra la relación entre el mantenimiento del glutatión reducido y la 6-fosfogluconolactonasa, mostrando en verde la enzima significativamente disminuida en el grupo control. G6P=glucosa 6-fosfato; G6DH=glucosa 6-fosfato deshidrogenasa; 6PGL=6-fosfogluconolactona; 6PGLasa=6-fosfogluconolactonasa; 6PG=6-fosfogluconato; GSH=glutatión reducido; GSSG=glutatión oxidado.

También hemos encontrado indicios de que la respuesta inmune juega un papel muy importante en la EAD. Se han encontrado alteradas diferentes isoformas de las **cadena ligeras λ y κ de las inmunoglobulinas**. Existen 5 isotipos de inmuglobulinas con diferentes propiedades biológicas, localizaciones funcionales y capacidad para reconocer diferentes tipos de antígenos. Sin embargo, son las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas y no las ligeras las que definen estos isotipos por lo que, en este caso, no podemos asociar los cambios a un tipo concreto ni conocer su función específica (306). No obstante, se ha visto que el tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica tiene efectos anti-inflamatorios (307), además de modular la producción de citoquinas e inactivar el complemento (308), por lo que la disminución de estas cadenas en la VA con EAD puede estar teniendo un efecto promotor de la inflamación. Sin embargo, hemos encontrado una disminución en proteínas de fase aguda, tanto de regulación positiva (**proteína sérica amiloide A-1**)

como negativa (**albúmina**), lo que implica una reacción inflamatoria (197). Estos marcadores, sin embargo, no son específicos y se encuentran alterados en numerosas patologías (197, 198)

En general, estos resultados sugieren que la VA de los pacientes con IA podría estar más protegida frente a los daños generados por el estrés oxidativo. Además, una incorrecta regulación entre la respuesta inmune y la inflamación en las válvulas con EAD podría modular los niveles de diferentes citoquinas inflamatorias, promoviendo el engrosamiento, calcificación y remodelado de la matriz en las válvulas sometidas a diferentes tipos de estrés.

2.2.3. ESTUDIO PROTEÓMICO DIFERENCIAL UTILIZANDO TEJIDO VALVULAR PROCEDENTE DE INDIVIDUOS CON/SIN ATEROSCLEROSIS CORONARIA

Muchos de los resultados obtenidos en los experimentos previos ponen de manifiesto similitudes a nivel molecular entre los procesos de estenosis aórtica y aterosclerosis, destacando la infiltración de monocitos, la diferenciación de VSMCs/VICs a células osteogénicas, el remodelado de matriz extracelular o la implicación del estrés oxidativo. Además, el análisis de agrupación jerárquica del estudio de proteómica diferencial de tejido en individuos con IA frente a individuos con EA nos mostró un individuo con IA que no se agrupaba correctamente con los otros 3 pacientes, quedando aislado del resto (Figura. R.16. Los resultados detallados de este experimento se encuentran en el apartado “2.4. Estudio proteómica diferencial utilizando tejido valvular procedente de individuos con aterosclerosis coronaria“).

Tras la revisión de la historia clínica de este paciente, resultó ser el único individuo con EAC, pero sin calcificación de la válvula aórtica, que empleamos en el estudio. Para comprobar si este resultado era significativo, planteamos un nuevo experimento partiendo de la hipótesis de que la afectación coronaria podría estar modificando el perfil molecular de la VA, actuando de forma sinérgica con la EAD, dado que comparten los mismos mecanismos implicados en el desarrollo de ambas patologías. Por ello, este estudio de expresión diferencial de tejido valvular mediante 2D-DIGE constó de 6 grupos experimentales (T, IA y EAD, con y sin EAC) y de varios análisis independientes (tabla D.1).

GRUPOS	Manchas diferenciales	Manchas identificadas	Proteínas identificadas
T con y sin EAC	9	7	7
IA con y sin EAC	13	10	8
EAD con y sin EAC	31	26	15
TvsIA sin EAC	72	51	25
TvsEAD sin EAC	99	77	27
IAsvsEAD sin EAC	6	3	3
TvsIA con EAC	16	13	5
TvsEAD con EAC	6	5	5
IAsvsEAD con EAC	3	2	2

Tabla D.1. Resumen de los resultados obtenidos en el estudio de proteómica diferencial de tejido valvular procedente de individuos con y sin EAC.

Para ver si había diferencias a nivel de tejido valvular debidas a la enfermedad coronaria, se compararon las muestras de los diferentes tipos de válvulas agrupadas por presencia/ausencia de EAC. Encontramos 7 proteínas diferencialmente expresadas entre los trasplantes con y sin EAC, 8 proteínas entre las IA con y sin EAC y 15 proteínas en el caso de las EAD. En todos los casos predominan las diferencias en proteínas estructurales destacando las de matriz extracelular y citoesqueleto. Varias de estas proteínas se han descrito previamente en aterosclerosis, como es el caso de la **vitronectina** (309), la **gelsolina** (310) o la **tropomiosina** (311). Desde nuestro punto de vista, resulta aún más llamativa la existencia de 15 proteínas diferenciales en el caso de las válvulas estenóticas. En este caso, el número de proteínas estructurales alteradas es aún mayor, a pesar de que se trata de un tejido que sufre una desestructuración de la matriz y calcificación severas, independiente de la presencia o no de EAC. También en este caso encontramos proteínas que juegan un papel importante en aterosclerosis, destacando la **vitronectina** (309), que ya se ve alterada en las comparaciones con VAs sin afectación, y el **lumican** (312). También hemos encontrado alteraciones en la regulación de la apoptosis que han sido previamente relacionadas con la aterosclerosis, como la disminución de **vimentina** (310), **gelsolina** (310, 313) o **prelamina-A/C** (313). La existencia de estos perfiles diferentes entre válvulas de individuos con y sin EAC nos indica que los mecanismos ateroscleróticos que se desarrollan en las arterias podrían estar afectando de algún modo, a nivel molecular, a la válvula aórtica,

independientemente de su estado patológico. El hecho de que aparezcan alteraciones asociadas a la aterosclerosis en VA con EAD en pacientes con EAC subyacente, que no se observan en cambio en los individuos sin EAC, podría indicar que los mecanismos moleculares promovidos por la aterosclerosis a nivel arterial estarían siendo activados a nivel distal sobre la VA, presumiblemente a través de citoquinas y leucocitos transportados por el torrente circulatorio. De hecho, algunas de estas alteraciones proteicas son observadas a nivel de VAs sin afectación (T e IA), como es el caso de la **vitronectina, haptoglobina, vimentina, gelsolina y lumican**.

Una vez que comprobamos la existencia de diferencias entre válvulas con y sin EAC, realizamos el ANOVA de los tres tipos de muestras sin EAC. Se identificaron un total de 27 proteínas diferenciales entre T y EAD, 25 entre T e IA y 3 entre EAD e IA. En este análisis destaca que, a pesar de las diferencias evidentes entre las válvulas de pacientes con IA y las de pacientes con EAD a nivel macroscópico, ambas presentan diferencias muy similares con los trasplantes, ya que hemos encontrado 16 proteínas en común diferencialmente expresadas entre los T y los dos grupos patológicos, todas ellas siguiendo la misma tendencia en IA y EAD. Estos resultados sugieren una respuesta similar del tejido ante las alteraciones circulatorias producidas, como por ejemplo, la existencia de turbulencias en el flujo sanguíneo, que provocarían un elevado estrés por cizallamiento sobre la VA, debido a la regurgitación de la IA o el bloqueo provocado por la EAD. Esas proteínas responden en su mayoría a mecanismos de inflamación, coagulación y transporte, que podrían activarse por esas alteraciones. Esto corrobora la hipótesis inicial de este trabajo en la que se propuso la utilización de los pacientes IA como controles para el análisis de las alteraciones debidas exclusivamente a la calcificación degenerativa de la válvula. Hay que destacar el gran número de isoformas correspondientes a la **albúmina** aumentadas en pacientes (tanto con IA como con EA) que se han encontrado. Estudios previos han descrito niveles aumentados de esta proteína en tejido valvular estenótico (147) debido, posiblemente, a la formación de nuevos vasos sanguíneos en respuesta a la necesidad de un mayor aporte de oxígeno a la válvula (28, 314). Además, se ha sugerido que existe una relación entre el daño endotelial y la angiogénesis (315), lo que podría explicar el aumento de albúmina encontrado en los pacientes con IA. Sin embargo, se trata de una proteína multifuncional y con numerosas isoformas que también está implicada en el transporte de numerosas moléculas en sangre (316), en procesos oxidativos (317) y en inflamación

(197), por lo que los cambios observados pueden deberse a múltiples funciones. Por otro lado, en el modelo animal se observó una mancha proteica identificada como albúmina que aparecía disminuida en los animales con EAD. Al tratarse de una isoforma concreta y dado el cuantioso número de isoformas de albúmina existentes que se pueden resolver por 2-DE, parece que es más factible asociar un aumento de proteína total con la EAD, como se ha observado en el estudio humano y en estudios previos de nuestro grupo (147).

Considerando solamente las proteínas diferenciales entre trasplantes y pacientes de EAD, encontramos un aumento de proteínas de matriz extracelular y de proteínas implicadas en transporte de lípidos y coagulación, en concordancia con los resultados del resto de estudios de esta Tesis Doctoral. Por un lado, se observó el aumento de proteínas relacionadas con la fibrosis y el remodelado de la matriz: la **α -1-antitripsina** y el **lumican** han sido descritas por nuestro grupo previamente en la EAD (147), mientras que la **plastin-2** juega un papel importante en la degradación de la matriz (318). Por otro lado, hemos encontrado alteraciones a nivel del transporte lipídico, como el aumento de la **apolipoproteína A-IV** (319) y proteínas relacionadas con la coagulación como la **vitronectina**, que favorece un estado pro-trombótico (210) (ver apartado 2.1.1. de esta discusión).

Entre las diferencias encontradas al comparar T e IA, queremos destacar la disminución encontrada en los pacientes con IA en los niveles de la **β -2-glicoproteína** y la **región C de la cadena ligera κ de la Ig**. Estas proteínas se encontraron disminuidas en EAD en el estudio previo de proteómica diferencial, al comparar pacientes con IA y EAD (ver apartado 2.2.2. de esta discusión). Estas proteínas ejercen un papel protector, mediante acciones anti-oxidantes (305) y anti-inflamatorias (307), por lo que su disminución podría agravar el desarrollo de la enfermedad. Su disminución parece que sería progresiva con la mayor afectación de la VA (T > IA > EAD). Además, hemos encontrado niveles elevados del **factor derivado del pigmento epitelial**, un inhibidor de la angiogénesis (320), y, sorprendentemente, niveles disminuidos de **mimecan**, implicado en la diferenciación y mineralización osteoblástica (282, 283). Estas diferencias podrían disminuir la probabilidad de desarrollar una calcificación bajo situaciones de estrés por cizallamiento debido al flujo turbulento o a los factores de

riesgo cardiovasculares, lo que explicaría que en estos pacientes la enfermedad valvular no haya derivado hacia la EAD.

Hemos encontrado muy pocas diferencias entre las muestras de pacientes con IA y con EAD. Sin embargo, van en la misma línea que en el estudio anterior. La **cadena β del fibrinógeno** aparece aumentada en EAD, lo que indica un estado pro-trombótico en estos pacientes (ver apartado 2.1.1. de esta discusión). Por otro lado, hemos encontrado disminuidas en EAD la **proteína de choque térmico HSP27**, previamente descrita en EAD (147) y aterosclerosis (321), y de nuevo el **factor derivado del pigmento epitelial**, cuya disminución en EAD podría favorecer la formación de nuevos vasos.

Por último, realizamos un ANOVA de los tres tipos de muestras con EAC. En este caso, las diferencias entre los grupos fueron mucho menores. Concretamente, se identificaron 5 proteínas diferenciales entre T y EAD, 5 entre T e IA y tan solo 2 entre IA y EAD. Esto parece indicar que la EAC subyacente activa mecanismos moleculares similares sobre las VAs, independientemente de su grado de afectación, minimizando las diferencias entre válvulas aparentemente sanas y las afectadas.

En el primer caso, vuelven a dominar las alteraciones estructurales y de coagulación. Estaban aumentadas en EAD la **cadena β del fibrinógeno** (ver apartado 2.1.1. de esta discusión) y la **hemopexina**, una proteína de fase aguda (322). Por el contrario, estaban disminuidas la **α -1-antitripsina**, el lumican y la **vimentina**, todas ellas encontradas aumentadas en EAD en estudios previos (147). Sin embargo, se ha descrito que la α -1-antitripsina protege a la elastina de la acción de la elastasa (323), por lo que su disminución en el grupo de EAD concuerda con los fenómenos de remodelado de la matriz y de pérdida de la estructura en capas, propios de la patología. La vimentina, sin embargo, se ha visto disminuida en aterosclerosis (182, 310), contribuyendo a las alteraciones del citoesqueleto y de la regulación de la apoptosis (324). El que hayan aparecido cambios asociados a la aterosclerosis que no han sido encontrados en los estudios previos del grupo con EAD sin agrupamiento por EAC subyacente, parece reforzar la hipótesis de que se estaría produciendo la activación de ciertos mecanismos típicos de la aterosclerosis en la VA por mediación de factores circulantes.

Entre los grupos T e IA se identificaron 5 proteínas. Se encontraron aumentadas en IA la **albúmina** y la **antitrombina III**. La albúmina es un potente anti-oxidante (317)

mientras que la antitrombina III inhibe la formación de coágulos (210), corroborando una vez más la posible resistencia de los individuos con IA ante procesos clave que ocurren durante la calcificación valvular. Sin embargo, como ya hemos comentado, hay que tener en cuenta que la albúmina presenta numerosas funciones, por lo que es difícil asociar una isoforma a una función concreta. Estaban disminuidas en IA el **lumican**, relacionado con la matriz extracelular (312), y el **mimecan**, implicado en la calcificación (282, 283). También se encontraron 3 manchas proteicas correspondientes a la **vimentina**, una aumentada y 2 disminuidas en IA. La aparición de diferentes isoformas de esta proteína sugiere una posible alteración en la regulación de la apoptosis en las enfermedades valvulares (324).

Entre los grupos IA y EAD se identificaron 2 proteínas disminuidas en EAD: la **albúmina** y la **peroxirredoxina-2**, ambas con propiedades antioxidantes (317, 325) lo que pueden estar implicando una disminución en la protección de las válvulas EAD debida a la calcificación.

Los resultados obtenidos en este estudio, apoyan la existencia de una relación entre la EAD y la EAC, sugiriendo que, además de existir un proceso similar durante el desarrollo de la enfermedad, se produce una afectación a nivel valvular (incluso en válvulas aparentemente sanas) como consecuencia de la EAC. El bajo número de proteínas diferenciales (tan solo 5) entre T y EAD, en pacientes con EAC subyacente, han correspondido fundamentalmente a proteínas estructurales, no habiendo encontrado ninguna diferencia a nivel de proteínas inflamatorias o de respuesta inmune. Pensamos que esto es debido a que las válvulas de individuos con aterosclerosis, aunque presentan una morfología y funcionalidad normal, podrían estar sufriendo algún proceso inflamatorio relacionado con la EAC.

3. INTEGRACIÓN DE RESULTADOS

Para finalizar, hemos realizado diferentes análisis bioinformáticos con el objetivo de obtener una visión a nivel global de las diferencias observadas entre los distintos grupos de estudio.

Con el propósito de esclarecer las diferencias a nivel molecular entre los tipos de válvulas no calcificadas utilizadas en esta Tesis Doctoral (trasplantes e IA) se realizó un

análisis funcional con todas las proteínas diferencialmente expresadas entre estos dos grupos. A nivel funcional, la mayor parte de las diferencias se deben a alteraciones relacionadas con la coagulación y la apoptosis, así como a la regulación de la homeostasis, la inflamación y la respuesta inmune. Esto nos lleva a pensar que las alteraciones a nivel circulatorio debidas a la dilatación del arco aórtico que sufren estos pacientes ejercen un efecto negativo sobre el tejido valvular. La presencia de turbulencias en el flujo sanguíneo debidas a la alteración en la apertura de la VA ha de generar un estrés sobre el propio tejido valvular que podría estar provocando, a su vez, la activación de una serie de mecanismos de respuesta a nivel molecular. En base a los grupos funcionales significativamente representados en el análisis, podemos indicar la activación de procesos inflamatorios y de respuesta inmune en la válvula a consecuencia de la IA, así como un mayor entorno pro-apoptótico y pro-trombótico.

Al realizar el análisis de interacciones proteicas, encontramos que la mayoría de las proteínas eran agrupadas en un grupo único, formando un red de interacción molecular que estaría siendo activada a nivel valvular en la IA.

Las diferencias en homeostasis, coagulación e inflamación, también aparecen al realizar el análisis bioinformático con todas las proteínas diferenciales encontradas entre trasplantes y pacientes con EAD, pero de forma más acusada. Este resultado nos indica que algunos de los procesos activados en la VA con la EAD estaría teniendo lugar en la IA, lo que refuerza nuestra hipótesis inicial que consideraba la VA con IA como un control adecuado para el análisis multi-ómico del proceso de calcificación de la EAD, permitiendo aislar los procesos activados a nivel molecular por la alteración funcional de la válvula. Por otro lado, también es significativa la representación de proteínas de matriz extracelular, lo que implica un remodelado importante de la matriz asociado a la EAD que no ocurre en la IA.

El análisis funcional de las proteínas diferenciales entre pacientes con IA y EAD se realizó con la finalidad de aislar las alteraciones debidas al desarrollo de la EAD de aquellas producidas por el funcionamiento incorrecto de la válvula. Este análisis corroboró la existencia de una elevada representación de proteínas implicadas en respuesta inmune, inflamación y coagulación. Además, también apareció una elevada representación de peptidasas e inhibidores de peptidasas, que están implicadas en el remodelado de la matriz extracelular. Tanto este resultado, como el obtenido al analizar

los diferencias entre IA y EAD que no aparecían en la comparación de T e IA, han mostrado un papel fundamental del remodelado de matriz en la calcificación de la VA durante el desarrollo de la EAD. Este proceso no se ha visto activado en las válvulas con IA, lo que parece indicar que es el paso de los miofibroblastos valvulares a osteoblastos el que estaría conllevando el cambio de las proteínas de matriz extracelular típico de la EAD, y serían estas células las responsables de la secreción de las proteínas de matriz que aparecen en la VA calcificada. Tras el análisis de interacciones, encontramos una pequeña red de interacción formado sólo por 3 proteínas: la proteína de unión al selenio 1 y la α -enolasa, implicadas en el engrosamiento de la matriz, y la peroxirredoxina-2, con propiedades antioxidantes. Estas proteínas no han aparecido en el resto de comparaciones, lo que indicaría que su alteración está directamente relacionada con el desarrollo de la calcificación de la VA con la EAD. Por lo tanto, este sub-grupo de proteínas nos parece un punto de partida interesante para futuros estudios con el objetivo de definir su potencial validez como biomarcadores de la patología o posibles dianas terapéuticas.

Tanto en la EAD como en la IA se encuentran activos un gran número de mecanismos inflamatorios y de respuesta inmune. A nivel de la EAD, hemos observado mayor severidad en estos mecanismos, lo que seguramente se deba al mayor estrés que se genera debido a la progresión de la calcificación, que actuará de manera sinérgica en la activación de estos procesos con la alteración funcional de la VA, presente en ambas patologías valvulares. Por otro lado, en las válvulas con IA hemos encontrado indicios de un mayor número de mecanismos de defensa ante el estrés oxidativo y la inflamación generados en el tejido. Es decir, a pesar de activarse determinados procesos inflamatorios con motivo de la alteración funcional de la VA, en la IA ésta es capaz de contrarrestar los efectos deletéreos de un entorno pro-inflamatorio mediante la activación de mecanismos de respuesta anti-oxidantes y anti-inflamatorios. Una alteración en estos mecanismos, junto con una mayor respuesta inflamatoria, podría estar marcando la diferencia entre que se desarrolle o no el proceso de calcificación de la válvula, dando lugar a una EAD.

Por último, hemos analizado todas las proteínas diferenciales entre válvulas de pacientes con y sin EAC para adentrarnos en el efecto que la aterosclerosis está ocasionando a nivel del tejido valvular. En este caso, destacan las diferencias encontradas a nivel de

metabolismo lipídico, regulación del citoesqueleto y movilidad celular. Esto también se observa en el análisis de interacciones, donde se observa una red de interacción formada por proteínas de citoesqueleto. También aparecen alteraciones a nivel plaquetario y de respuesta inmune. Estas diferencias coinciden con alteraciones descritas en la aterosclerosis por lo que pensamos que la EAC podría estar induciendo procesos homólogos en la VA, independientemente de su grado de afectación. Esto se podría estar viendo favorecido por la liberación de mediadores moleculares o celulares de la placa de ateroma al torrente sanguíneo, que estarían provocando alteraciones a nivel de la VA. En las válvulas menos afectadas esto podría favorecer en desarrollo de EAD a largo plazo.

Mediante la realización de diversos estudios a nivel de plasma y tejido, empleando la IA como control de la EAD, hemos encontrado un gran número de proteínas y metabolitos implicados en el desarrollo de la calcificación, ya que hemos podido aislar la alteración funcional que sufre la VA del proceso degenerativo tisular. Además, los resultados del modelo animal de EAD desarrollado han mostrado proteínas relacionadas con el citoesqueleto, situaciones de hipoxia y estrés del retículo endoplasmático. Queremos destacar las cadenas ligeras de la miosina, ya que no habían sido relacionadas antes con la EAD, y la ATPasa del retículo endoplasmático, que confirma la implicación del retículo endoplasmático y del control en la síntesis de proteínas en esta enfermedad. Todas estas proteínas deberán ser analizadas para confirmar su traslación a estudios humanos.

También hemos encontrado procesos en común entre el análisis metabolómico y los análisis proteómicos. Concretamente, hemos encontrado metabolitos implicados en coagulación, remodelado de la matriz, estrés oxidativo, coagulación e hipoxia. La mayoría de las alteraciones encontradas pertenecen a este último grupo y forman parte de las vías de metabolismo energético. Por eso pensamos que sería muy interesante analizar en el futuro las enzimas implicadas en esas vías, realizando así una integración completa de los estudios proteómicos y metabolómicos y teniendo una visión global de los mecanismos implicados en la enfermedad.

CONCLUSIONES

- 1) El modelo animal de conejo utilizado ha permitido el estudio de la EAD en esta especie controlando las diferencias entre los grupos experimentales debidas a factores externos y evitando la heterogeneidad de las poblaciones empleadas en estudios humanos.
- 2) El análisis de proteómica diferencial mediante 2D-DIGE de válvulas aórticas de conejos con EAD ha mostrado 8 proteínas diferencialmente expresadas respecto a los conejos sanos, relacionadas con el citoesqueleto, situaciones de hipoxia y estrés del reticulo endoplasmático.
- 3) El análisis de metabolómica diferencial mediante GC-MS de plasma completo en pacientes con EAD ha mostrado 19 metabolitos aumentados con respecto a pacientes con IA, relacionados con el metabolismo energético, hipoxia, coagulación, estrés oxidativo y metabolismo lipídico.
- 4) El análisis mediante MALDI-IMAGING de secciones de tejido valvular estenótico nos ha permitido estudiar la distribución superficial de los péptidos endógenos del tejido con una resolución espacial de 75 μm y ofrece una alternativa al análisis anatomopatológico por histología tradicional, permitiendo en el futuro caracterizar a nivel molecular tejidos de válvula aórtica con diferentes grados de lesión estenótica, con gran resolución.
- 5) Los resultados del análisis de proteómica diferencial mediante 2D-DIGE de válvulas aórticas de pacientes con EAD y pacientes con IA han mostrado indicios de un perfil característico de la válvula aórtica con EAD y EAC subyacente, y han promovido la realización de un nuevo experimento bajo la hipótesis de que la afectación coronaria podría estar modificando el perfil molecular de la válvula aórtica.
- 6) Las diferencias a nivel molecular halladas en el análisis proteómico realizado empleando válvulas aórticas de trasplante como control mostraron la activación de procesos inflamatorios, de respuesta inmune y un mayor entorno pro-trombótico en la válvula a consecuencia de la IA, y de manera más acusada en la

EAD, lo que implicaría que las alteraciones a nivel circulatorio debidas a la dilatación del arco aórtico que sufren los pacientes con IA ejercen un efecto negativo sobre el tejido valvular.

- 7) Los resultados obtenidos en los análisis proteómicos diferenciales sobre tejido y plasma entre IA y EAD han mostrado un papel fundamental del remodelado de matriz en la calcificación de la válvula aórtica durante el desarrollo de la EAD. La activación de este proceso no se produce con el desarrollo de la IA, ya que no se ha observado una representación significativa de proteínas implicadas en este proceso en la comparación de trasplantes e IA.
- 8) Los análisis -ómicos de plasma y tejido han mostrado que, tanto en la EAD como en la IA, se encuentran activos un gran número de mecanismos inflamatorios y de respuesta inmune, siendo más acusados en la EAD. En las válvulas con IA hemos encontrado indicios de un mayor número de mecanismos de defensa ante el estrés oxidativo y la inflamación generados en el tejido.
- 9) El elevado número de proteínas diferencialmente expresadas entre válvulas del mismo tipo comparadas atendiendo a la presencia o ausencia de EAC sugiere que la EAC podría inducir procesos homólogos en la válvula aórtica, independientemente del grado de afectación de la misma. En las válvulas menos afectadas (trasplantes e IA), esto podría favorecer el desarrollo de EAD a largo plazo.
- 10) Mediante la realización de un análisis multi-ómico a nivel de plasma y tejido humanos, empleando la IA como control de la EAD, se ha podido definir un gran número de proteínas y metabolitos implicados en el desarrollo de la calcificación valvular aórtica, ya que se ha podido aislar la alteración funcional que sufre la válvula del proceso degenerativo tisular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Anderson RH. Clinical anatomy of the aortic root. *Heart*. 2000 December 1, 2000;84(6):670-3.
2. Misfeld M, Sievers H-H. Heart valve macro- and microstructure. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2007 August 29, 2007;362(1484):1421-36.
3. Kasel AM, Cassese S, Bleiziffer S, Amaki M, Hahn RT, Kastrati A, et al. Standardized imaging for aortic annular sizing: Implications for transcatheter valve selection. *J Am Coll Cardiol Img*. 2013;6:249-62.
4. Piazza N, de Jaegere P, Schultz C, Becker AE, Serruys PW, Anderson RH. Anatomy of the aortic valvar complex and its implications for transcatheter implantation of the aortic valve. *Circulation: Cardiovascular Interventions*. 2008 August 1, 2008;1(1):74-81.
5. Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD, et al. Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation*. 2011 October 18, 2011;124(16):1783-91.
6. Leopold JA. Cellular mechanisms of aortic valve calcification. *Circ Cardiovasc Interv*. 2012;5(4):605-14.
7. Schoen FJ. Aortic valve structure-function correlations: role of elastic fibers no longer a stretch of the imagination. *J Heart Valve Dis*. 1997;6:1-6.
8. Bäck M, Gasser TC, Michel J-B, Caligiuri G. Biomechanical factors in the biology of aortic wall and aortic valve diseases. *Cardiovasc Res*. 2013;99:232-41.
9. Boudoulas KD, Borer JS, Boudoulas H. Etiology of Valvular Heart Disease in the 21st Century. *Cardiology*. 2013;126:139-52.
10. Dujardin KS, Enriquez-Sarano M, Schaff HV, Bailey KR, Seward JB, Tajik AJ. Mortality and morbidity of aortic regurgitation in clinical practice: a long-term follow-up study. *Circulation*. 1999 April 13, 1999;99(14):1851-7.
11. Lorell BH, Carabello BA. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation*. 2000 July 25, 2000;102(4):470-9.
12. Carabello BA, Paulus WJ. Aortic stenosis. *The Lancet*. 2009;373(9667):956-66.

13. Jung B, Vahanian A. Epidemiology of valvular heart disease in the adult. *Nat Rev Cardiol.* 2011;8(3):162-72.
14. Grimard B, Larson J. Aortic stenosis: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician.* 2008;78:717-24.
15. Bursi F, Weston SA, Redfield MM. Systolic and diastolic heart failure in the community. *JAMA.* 2006;296(18):2209-16.
16. Martínez-Sellés M, Robles JAG, Prieto L, Muñoz MD, Frades E, Díaz-Castro O, et al. Systolic dysfunction is a predictor of long term mortality in men but not in women with heart failure. *Eur Heart J.* 2003 November 1, 2003;24(22):2046-53.
17. Norton G, Woodiwiss A, Gaasch W, Mela T, Chung E, Aurigemma G, et al. Heart failure in pressure overload hypertrophy. The relative roles of ventricular remodeling and myocardial dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:664-71.
18. Liebe V, Brueckmann M, Borggrefe M, Kaden JJ. Statin therapy of calcific aortic stenosis: hype or hope? *Eur Heart J.* 2006 April 2006;27(7):773-8.
19. Kullo IJ, Cooper LT. Early identification of cardiovascular risk using genomics and proteomics. *Nat Rev Cardiol.* 2010;7(6):309-17.
20. Bonow RO, Carabello BA, Chatterjee K, de Leon Jr AC, Faxon DP, Freed MD, et al. ACC/AHA 2006 Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 1998 Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease) Developed in Collaboration With the Society of Cardiovascular Anesthesiologists Endorsed by the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions and the Society of Thoracic Surgeons. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(3):e1-e148.
21. Goldberg SH, Elmariah S, Miller MA, Fuster V. Insights Into Degenerative Aortic Valve Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50(13):1205-13.
22. Helske S, Kupari M, Lindstedt KA, Kovanen PT. Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process. *Curr Opin Lipidol.* 2007;18(5):483-91
10.1097/MOL.0b013e3282a66099.
23. Freeman RV, Otto CM. Spectrum of calcific aortic valve disease: Pathogenesis , disease progression, and treatment strategies. *Circulation.* 2005 June 21, 2005;111(24):3316-26.
24. Butcher JT, Mahler GJ, Hockaday LA. Aortic valve disease and treatment: The need for naturally engineered solutions. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63:242-68.
25. Mohler ER. Mechanisms of aortic valve calcification. *Am J Cardiol.* 2004;94(11):1396-402.

26. Soini Y, Salo T, Satta J. Angiogenesis is involved in the pathogenesis of nonrheumatic aortic valve stenosis. *Hum Pathol.* 2003 2014/07/06;34(8):756-63.
27. Chalajour F, Treede H, Ebrahimnejad A, Lauke H, Reichenspurner H, Ergun S. Angiogenic activation of valvular endothelial cells in aortic valve stenosis. *Exp Cell Res.* 2004;298(2):455-64.
28. Chalajour F, Treede H, Gehling UM, Ebrahimnejad A, Boehm DH, Riemer RK, et al. Identification and characterization of cells with high angiogenic potential and transitional phenotype in calcific aortic valve. *Exp Cell Res.* 2007;313(11):2326-35.
29. Ross R. Atherosclerosis - An Inflammatory Disease. *N Engl J Med.* 1999;340(2):115-26.
30. Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, Gown AM, O'Brien KD. Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation.* 1994 August 1, 1994;90(2):844-53.
31. O'Brien KD, Reichenbach DD, Marcovina SM, Kuusisto J, Alpers CE, Otto CM. Apolipoproteins B, (a), and E accumulate in the morphologically early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996 April 1, 1996;16(4):523-32.
32. O'Brien KD, Kuusisto J, Reichenbach DD, Ferguson M, Giachelli C, Alpers CE, et al. Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions. *Circulation.* 1995 October 15, 1995;92(8):2163-8.
33. Breyne J, Juthier F, Corseaux D, Marechaux S, Zawadzki C, Jeanpierre E, et al. Atherosclerotic-like process in aortic stenosis: Activation of the tissue factor-thrombin pathway and potential role through osteopontin alteration. *Atherosclerosis.* 2010 2014/07/13;213(2):369-76.
34. Tousoulis D, Siasos G, Maniatis K, Oikonomou E, Kioufis S, Zaromitidou M, et al. Serum osteoprotegerin and osteopontin levels are associated with arterial stiffness and the presence and severity of coronary artery disease. *Int J Cardiol.* 2013 2014/07/13;167(5):1924-8.
35. Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE, et al. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol.* 1997;29(3):630-4.
36. Boon A, Cheriex E, Lodder J, Kessels F. Cardiac valve calcification: characteristics of patients with calcification of the mitral annulus or aortic valve. *Heart.* 1997 November 1, 1997;78(5):472-4.
37. Novaro G, Griffin B. Calcific aortic stenosis: another face of atherosclerosis? *Cleve Clin J Med.* 2003;70:1-7.

38. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*. 1994 January 1, 1994;89(1):36-44.
39. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: part I. *Circulation*. 2003 October 7, 2003;108(14):1664-72.
40. Otsuka F, Finn AV, Virmani R. Do vulnerable and ruptured plaques hide in heavily calcified arteries? *Atherosclerosis*. 2013;229(1):34-7.
41. Nicholls SJ, Tuzcu EM, Wolski K, Sipahi I, Schoenhagen P, Crowe T, et al. Coronary artery calcification and changes in atheroma burden in response to established medical therapies. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49(2):263-70.
42. Maldonado N, Kelly-Arnold A, Vengrenyuk Y, Laudier D, Fallon JT, Virmani R, et al. A mechanistic analysis of the role of microcalcifications in atherosclerotic plaque stability: potential implications for plaque rupture. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;303:H619-H28.
43. Rossebø AB, Pedersen TR, Boman K, Brudi P, Chambers JB, Egstrup K, et al. Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in Aortic Stenosis. *N Engl J Med*. 2008;359(13):1343-56.
44. Arsenault BJ, Boekholdt SM, Mora S, DeMicco DA, Bao W, Tardif J-C, et al. Impact of high-dose atorvastatin therapy and clinical risk factors on incident Aortic Valve Stenosis in patients with Cardiovascular Disease (from TNT, IDEAL, and SPARCL). *Am J Cardiol*. 2014;113(8):1378-82.
45. Otto CM, O'Brien KD. Why is there discordance between calcific aortic stenosis and coronary artery disease? *Heart*. 2001 June 1, 2001;85(6):601-2.
46. Jørgensen TN, Gubbels MR, Kotzin BL. New insights into disease pathogenesis from mouse lupus genetics. *Curr Opin Immunol*. 2004;16(6):787-93.
47. Marquina R, Diez MA, Lopez-Hoyos M, Buelta L, Kuroki A, Kikuchi S, et al. Inhibition of B cell death causes the development of an IgA nephropathy in (New Zealand white x C57BL/6)F1-bcl-2 transgenic mice. *J Immunol*. 2004 June 1, 2004;172(11):7177-85.
48. Hinton RB, Alfieri CM, Witt SA, Glascock BJ, Khoury PR, Benson DW, et al. Mouse heart valve structure and function: echocardiographic and morphometric analyses from the fetus through the aged adult. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294(6):H2480-H8.
49. Matsumoto Y, Adams V, Jacob S, Mangner N, Schuler G, Linke A. Regular exercise training prevents aortic valve disease in low-density lipoprotein-receptor-deficient mice. *Circulation*. 2010;121(6):759-67.

50. Weiss RM, Lund DD, Chu Y, Brooks RM, Zimmerman KA, Accaoui RE, et al. Osteoprotegerin inhibits aortic valve calcification and preserves valve function in hypercholesterolemic mice. *PLoS One*. 2013;8(6):e65201.
51. Fujisaka T, Hoshiga M, Hotchi J, Takeda Y, Jin D, Takai S, et al. Angiotensin II promotes aortic valve thickening independent of elevated blood pressure in apolipoprotein-E deficient mice. *Atherosclerosis*. 2013;226(1):82-7.
52. Vilahur G, Padro T, Badimon L. Atherosclerosis and thrombosis: insights from large animal models. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:12.
53. Balaoing LR, Post AD, Liu H, Minn KT, Grande-Allen KJ. Age-related changes in aortic valve hemostatic protein regulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(1):72-80.
54. Guerraty MA, Grant GR, Karanian JW, Chiesa OA, Pritchard WF, Davies PF. Hypercholesterolemia induces side-specific phenotypic changes and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma pathway activation in swine aortic valve endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(2):225-31.
55. Cimini M, Boughner D, Ronald J, Aldington L, Rogers K. Development of aortic valve sclerosis in a rabbit model of atherosclerosis: an immunohistochemical and histological study. *J Heart Valve Dis*. 2005;14(3):365-75.
56. Brousseau ME, Hoeg JM. Transgenic rabbits as models for atherosclerosis research. *J Lipid Res*. 1999;40(3):365-75.
57. Moghadasian M, Frohlich J, McManus B. Advances in experimental dyslipidemia and atherosclerosis. *Lab Invest*. 2001;81(9):1173-83.
58. Turk J, Laughlin M. Physical activity and atherosclerosis: which animal model? *Can J Appl Physiol*. 2004;29(5):657-83.
59. Rajamannan NM, Sangiorgi G, Springett M, Arnold K, Mohacsi T, Spagnoli L, et al. Experimental hypercholesterolemia induces apoptosis in the aortic valve. *J Heart Valve Dis*. 2001;10(3):371-4.
60. Drolet M, Couet J, Arsenault M. Development of aortic valve sclerosis or stenosis in rabbits: role of cholesterol and calcium. *J Heart Valve Dis*. 2008;17(4):381-7.
61. Drolet M-C, Arsenault M, Couet J. Experimental aortic valve stenosis in rabbits. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41(7):1211-7.
62. Marechaux S, Corseaux D, Vincentelli A, Richardson M, Ung A, Susen S, et al. Identification of tissue factor in experimental aortic valve sclerosis. *Cardiovasc Pathol*. 2009;18(2):67-76.
63. Watanabe Y. Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit). *Atherosclerosis*. 1980;36(2):261-8.

64. Wilkins M, Pasquali C, Appel R, Ou K, Golaz O, Sanchez J, et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)*. 1996;10:61-5.
65. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 2000;405(6788):837-46.
66. Marshall T, Williams KM. Proteomics and its impact upon biomedical science. *British journal of biomedical science*. 2002;59(1):47-64.
67. Bai F, Liu S, Witzmann FA. A “de-streaking” method for two-dimensional electrophoresis using the reducing agent tris(2-carboxyethyl)-phosphine hydrochloride and alkylating agent vinylpyridine. *Proteomics*. 2005;5(8):2043-7.
68. Herbert B, Galvani M, Hamdan M, Olivieri E, MacCarthy J, Pedersen S, et al. Reduction and alkylation of proteins in preparation of two-dimensional map analysis: Why, when, and how? *Electrophoresis*. 2001;22(10):2046-57.
69. Righetti PG. Real and imaginary artefacts in proteome analysis via two-dimensional maps. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2006;841(1-2):14-22.
70. Sebastiano R, Citterio A, Lapadula M, Righetti PG. A new deuterated alkylating agent for quantitative proteomics. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2003;17(21):2380-6.
71. Pasquali C, Fialka I, LA H. Subcellular fractionation, electromigration analysis and mapping of organelles. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1999;722(1-2):89-102.
72. Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2003;60(5):523-33.
73. Steel LF, Trotter MG, Nakajima PB, Mattu TS, Gonye G, Block T. Efficient and specific removal of albumin from human serum samples. *Mol Cell Proteomics*. 2003 April 1, 2003;2(4):262-70.
74. Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 2000;21(6):1037-53.
75. Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 August 15, 2000;97(17):9390-5.
76. Ek K, Bjellqvist B, PG. R. Preparative isoelectric focusing in immobilized pH gradients. I. General principles and methodology. *J Biochem Biophys Methods*. 1983;8(2):135-55.
77. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;August 15; 227(5259):680-5.

78. Weiss W, Weiland F, Görg A. Protein detection and quantitation technologies for gel-based proteome analysis. *Proteomics: Humana Press*; 2009. p. 59-82.
79. Wang X, Wang D, Wang D, Wang H, Chang L, Yi X, et al. Systematic comparison of technical details in CBB methods and development of a sensitive GAP stain for comparative proteomic analysis. *Electrophoresis*. 2012;33(2):296-306.
80. Chevalier F, Rofidal V, Rossignol M. Visible and fluorescent staining of two-dimensional gels. *Methods Mol Biol*. 2007;355:145-56.
81. Berth M, Moser F, Kolbe M, Bernhardt J. The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007;76(6):1223-43.
82. Dowsey AW, Dunn MJ, Yang G-Z. The role of bioinformatics in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*. 2003;3(8):1567-96.
83. Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 2004;4(12):3665-85.
84. Marouga R, David S, Hawkins E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem*. 2005;382(3):669-78.
85. Alban A, David SO, Bjorkesten L, Andersson C, Sloge E, Lewis S, et al. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: Two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics*. 2003;3(1):36-44.
86. Palagi PM, Hernandez P, Walther D, Appel RD. Proteome informatics I: Bioinformatics tools for processing experimental data. *Proteomics*. 2006;6(20):5435-44.
87. Patton WF. A thousand points of light: The application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *Electrophoresis*. 2000;21(6):1123-44.
88. Medzihradszky K, Leffler H, Baldwin M, Burlingame A. Protein identification by in-gel digestion, high-performance liquid chromatography, and mass spectrometry: Peptide analysis by complementary ionization techniques. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2001;12(2):215-21.
89. Pieper R, Gatlin C, Makusky A, Russo P, Schatz C, Miller S, et al. The human serum proteome: display of nearly 3700 chromatographically separated protein spots on two-dimensional electrophoresis gels and identification of 325 distinct proteins. *Proteomics*. 2003;Jul;3(7):1345-64.
90. Badock V, Steinhusen U, Bommert K, Otto A. Prefractionation of protein samples for proteome analysis using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Electrophoresis*. 2001;Aug;22(14):2856-64.

91. Righetti PG, Castagna A, Antonioli P, Boschetti E. Prefractionation techniques in proteome analysis: The mining tools of the third millennium. *Electrophoresis*. 2005;26(2):297-319.
92. Ardrey RE. *Liquid Chromatography. Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction*: John Wiley & Sons, Ltd; 2003. p. 7-31.
93. Fenn J, Mann M, Menq C, Wong S, Whitehouse C. Electrospray for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 1989;246(4926):64-71.
94. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem*. 1988;60(20):2299-301.
95. Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem*. 2001;70(1):437-73.
96. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003;422(6928):198-207.
97. Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science*. 2006;312(5771):212-7.
98. Omenn GS, Baker MS, Aebersold R. Recent Workshops of the HUPO Human Plasma Proteome Project (HPPP): A bridge with the HUPO CardioVascular Initiative and the emergence of SRM targeted proteomics. *Proteomics*. 2011;11(17):3439-43.
99. Selevsek N, Matondo M, Carbayo MS, Aebersold R, Domon B. Systematic quantification of peptides/proteins in urine using selected reaction monitoring. *Proteomics*. 2011;11(6):1135-47.
100. Chaurand P, Stoeckli M, Caprioli RM. Direct Profiling of Proteins in Biological Tissue Sections by MALDI Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 1999 2012/09/05;71(23):5263-70.
101. McDonnell LA, Heeren RMA. Imaging mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*. 2007;26(4):606-43.
102. Caldwell RL, Caprioli RM. Tissue Profiling by Mass Spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2005 April 1, 2005;4(4):394-401.
103. Altelaar AFM, van Minnen J, Jiménez CR, Heeren RMA, Piersma SR. Direct Molecular Imaging of *Lymnaea stagnalis* Nervous Tissue at Subcellular Spatial Resolution by Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 2004 2012/10/08;77(3):735-41.
104. Kruse R, Sweedler J. Spatial profiling invertebrate ganglia using MALDI MS. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2003;14(7):752-9.
105. Schwartz SA, Reyzer ML, Caprioli RM. Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation. *J Mass Spectrom*. 2003;38(7):699-708.

106. Chaurand P, Schwartz SA, Billheimer D, Xu BJ, Crecelius A, Caprioli RM. Integrating Histology and Imaging Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2004 2012/09/05;76(4):1145-55.
107. Pasikanti KK, Ho PC, Chan ECY. Gas chromatography/mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids. *J Chromatogr B*. 2008;871(2):202-11.
108. Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol*. 1998 2014/08/15;16(9):373-8.
109. Nordström A, O'Maille G, Qin C, Siuzdak G. Nonlinear data alignment for UPLC-MS and HPLC-MS based metabolomics: Quantitative analysis of endogenous and exogenous metabolites in human serum. *Anal Chem*. 2006 2014/08/15;78(10):3289-95.
110. Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, et al. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res*. 2007 January 1, 2007;35(suppl 1):D521-D6.
111. Slupsky CM, Rankin KN, Wagner J, Fu H, Chang D, Weljie AM, et al. Investigations of the effects of gender, diurnal variation, and age in human urinary metabolomic profiles. *Anal Chem*. 2007;79(18):6995-7004.
112. Griffin JL, Kauppinen RA. A metabolomics perspective of human brain tumours. *FEBS J*. 2007;274(5):1132-9.
113. Musiek E, Yin H, Milne G, Morrow J. Recent advances in the biochemistry and clinical relevance of the isoprostane pathway. *Lipids*. 2005;40(10):987-94.
114. Cho H-J, Kim JD, Lee W-Y, Chung BC, Choi MH. Quantitative metabolic profiling of 21 endogenous corticosteroids in urine by liquid chromatography-triple quadrupole-mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2009;632(1):101-8.
115. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev*. 2007;26(1):51-78.
116. Want EJ, Nordström A, Morita H, Siuzdak G. From exogenous to endogenous: the inevitable imprint of mass spectrometry in metabolomics. *J Proteome Res*. 2006;6(2):459-68.
117. Fan TW-M, Lane AN, Higashi RM, Fan T-M. Considerations of sample preparation for metabolomics investigation. *The Handbook of Metabolomics*: Humana Press; 2012. p. 7-27.
118. Yappert MC, Rujoi M, Borchman D, Vorobyov I, Estrada R. Glycero- versus sphingo-phospholipids: correlations with human and non-human mammalian lens growth. *Exp Eye Res*. 2003;76(6):725-34.
119. Dunn WB, Bailey NJC, Johnson HE. Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst*. 2005;130(5):606-25.

120. Issaq HJ, Abbott E, Veenstra TD. Utility of separation science in metabolomic studies. *J Sep Sci.* 2008;31(11):1936-47.
121. Trock BJ. Application of metabolomics to prostate cancer. *Urol Oncol.* 2011;29(5):572-81.
122. Raamsdonk LM, Teusink B, Broadhurst D, Zhang N, Hayes A. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nat Biotechnol.* 2001;19:45.
123. Pan Z, Raftery D. Comparing and combining NMR spectroscopy and mass spectrometry in metabolomics. *Anal Bioanal Chem.* 2007;387(2):525-7.
124. Kuhara T. Noninvasive human metabolome analysis for differential diagnosis of inborn errors of metabolism. *J Chromatogr B.* 2007;855(1):42-50.
125. Filipiak W, Sponring A, Baur M, Filipiak A, Ager C, Wiesenhofer H, et al. Molecular analysis of volatile metabolites released specifically by staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa. *BMC Microbiol.* 2012;12(1):113.
126. Koek M, Jellema R, Van Der Greef J, Tas A, Hankemeier T. Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives. *Metabolomics.* 2011;7(3):307-28.
127. Chen M, Zhao L, Jia W. Metabonomic Study on the Biochemical Profiles of A Hydrocortisone-Induced Animal Model. *J Proteome Res.* 2005 2012/10/08;4(6):2391-6.
128. Lee SH, Woo HM, Jung BH, Lee J, Kwon OS, Pyo HS, et al. Metabolomic Approach To Evaluate the Toxicological Effects of Nonylphenol with Rat Urine. *Anal Chem.* 2007 2012/10/08;79(16):6102-10.
129. Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Oresic M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics.* 2010;11(1):395.
130. Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G. XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal Chem.* 2006 2014/08/19;78(3):779-87.
131. Baran R, Kochi H, Saito N, Suematsu M, Soga T, Nishioka T, et al. MathDAMP: a package for differential analysis of metabolite profiles. *BMC Bioinformatics.* 2006;7(1):530.
132. Katajamaa M, Miettinen J, Orešič M. MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. *Bioinformatics.* 2006 March 1; 22(5):634-6.
133. Hamacher M, Eisenacher M, Stephan C, Bertsch A, Gröpl C, Reinert K, et al. OpenMS and TOPP: Open source software for LC-MS data analysis. *Methods Mol Biol.* 2011;696:353-67.

134. Tohge T, Fernie AR. Web-based resources for mass-spectrometry-based metabolomics: A user's guide. *Phytochemistry*. 2009;70(4):450-6.
135. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, et al. GenBank. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(D1):D36-D42.
136. Consortium U. Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res*. 2014;42(D1):D191-D8.
137. Kopka J, Schauer N, Krueger S, Birkemeyer C, Usadel B, Bergmüller E, et al. GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. *Bioinformatics*. 2005;21(8):1635-8.
138. Cline MS, Smoot M, Cerami E, Kuchinsky A, Landys N, Workman C, et al. Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nat Protoc*. 2007;2(10):2366-82.
139. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 2003;13:2498 - 504.
140. Mi H, Muruganujan A, Thomas PD. PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(D1):D377-D86.
141. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2008;4(1):44-57.
142. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(1):1-13.
143. Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(D1):D808-D15.
144. Bertacco E, Million R, Arrigoni G, Faggini E, Iop L, Puato M, et al. Proteomic analysis of clonal interstitial aortic valve cells acquiring a pro-calcific profile. *J Proteome Res*. 2010;9(11):5913-21.
145. Angel PM, Nusinow D, Brown CB, Violette K, Barnett JV, Zhang B, et al. Networked-based characterization of extracellular matrix proteins from adult mouse pulmonary and aortic valves. *J Proteome Res*. 2011;10(2):812-23.
146. Gil-Dones F, Martin-Rojas T, Lopez-Almodovar L, De la Cuesta F, Darde V, Alvarez-Llamas G, et al. Vascular aortic stenosis: a proteomic insight. *Clin Med Insights Cardiol*. 2010;Feb 4(4):1-7.
147. Martin-Rojas T, Gil-Dones F, Lopez-Almodovar LF, Padial LR, Vivanco F, Barderas MG. Proteomic profile of human aortic stenosis: insights into the degenerative process. *J Proteome Res*. 2012;11(3):1537-50.

148. Gil-Dones F, Darde V, Orgaz SA, Lopez-Almodovar LF, Mourino-Alvarez L, Padial LR, et al. Inside human aortic stenosis: A proteomic analysis of plasma. *Journal of Proteomics*. 2011(0).
149. Stastna M, Van Eyk JE. Secreted proteins as a fundamental source for biomarker discovery. *Proteomics*. 2012;Jan 13:n/a-n/a.
150. Alvarez-Llamas G, Martin-Rojas T, de la Cuesta F, Calvo E, Gil-Dones F, Darde VM, et al. Modification of the secretion pattern of proteases, inflammatory mediators, and extracellular matrix proteins by human aortic valve is key in severe aortic stenosis. *Mol Cell Proteomics*. 2013 September 1, 2013;12(9):2426-39.
151. Bergquist J, Baykut G, Bergquist M, Witt M, Mayer F, Baykut D. Human myocardial protein pattern reveals cardiac diseases. *Int J Proteomics*. 2012;2012:342659.
152. Baykut D, Grapow M, Bergquist M, Amirkhani A, Ivonin I, Reineke D, et al. Molecular differentiation of ischemic and valvular heart disease by liquid chromatography/fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Eur J Med Res*. 2006;11(6):221-6.
153. Matt P, von Orelli A, Bernet F, Grussenmeyer T, Lefkovits I, Zerkowski H-R. Proteomics of ascending aortic aneurysm with bicuspid or tricuspid aortic valve. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*. 2007;15(3):185-90.
154. Matt P, Fu Z, Carrel T, Huso DL, Dirnhofer S, Lefkovits I, et al. Proteomic alterations in heat shock protein 27 and identification of phosphoproteins in ascending aortic aneurysm associated with bicuspid and tricuspid aortic valve. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;43(6):792-801.
155. Kjellqvist S, Maleki S, Olsson T, Chwastyniak M, Branca RMM, Lehtiö J, et al. A combined proteomic and transcriptomic approach shows diverging molecular mechanisms in thoracic aortic aneurysm development in patients with tricuspid- and bicuspid aortic valve. *Mol Cell Proteomics*. 2013;12(2):407-25.
156. Neufeld EB, Zadrozny LM, Phillips D, Aponte A, Yu Z-X, Balaban RS. Decorin and biglycan retain LDL in disease-prone valvular and aortic subendothelial intimal matrix. *Atherosclerosis*. 2014;233(1):113-21.
157. Helske S, Miettinen T, Gylling H, Mäyränpää M, Lommi J, Turto H, et al. Accumulation of cholesterol precursors and plant sterols in human stenotic aortic valves. *J Lipid Res*. 2008;49(7):1511-8.
158. Schött H-F, Luister A, Husche C, Schäfers H-J, Böhm M, Plat J, et al. The relationships of phytosterols and oxyphytosterols in plasma and aortic valve cusps in patients with severe aortic stenosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;446(3):805-10.

159. Weingärtner O, Lütjohann D, Ji S, Weisshoff N, List F, Sudhop T, et al. Vascular effects of diet supplementation with plant sterols. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(16):1553-61.
160. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;May 7;72(248-254).
161. Dardé V, Barderas MG, Vivanco F. Depletion of high-abundance proteins in plasma by immunoaffinity subtraction for two-dimensional difference gel electrophoresis analysis. *Methods Mol Biol*. 2007;357:351-64.
162. Heukeshoven J, Dernick R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*. 1985;6(3):103-12.
163. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*. 1996;Mar 1;68(5):850-8.
164. Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *ELECTROPHORESIS*. 1999;20(18):3551-67.
165. Laborde C, Mourino-Alvarez L, Posada-Ayala M, Alvarez-Llamas G, Serranillos-Reus M, Moreu J, et al. Plasma metabolomics reveals a potential panel of biomarkers for early diagnosis in acute coronary syndrome. *Metabolomics*. 2014;10(3):414-24.
166. Xia J, Psychogios N, Young N, Wishart DS. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Res*. 2009 July 1, 2009;37(suppl 2):W652-W60.
167. Xia J, Mandal R, Sinelnikov IV, Broadhurst D, Wishart DS. MetaboAnalyst 2.0—a comprehensive server for metabolomic data analysis. *Nucleic Acids Res*. 2012 May 2, 2012;40:W127-33.
168. Xia J, Wishart DS. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. *Nat Protocols*. 2011;6(6):743-60.
169. Yu C, Belt K, Giles C, Campbell R, Porter R. Structural basis of the polymorphism of human complement components C4A and C4B: gene size, reactivity and antigenicity. *EMBO J*. 1986;5(11):2873.
170. Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN, Gottdiener JS, Scott CG, Enriquez-Sarano M. Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *The Lancet*. 2006;368(9540):1005-11.
171. Supino PG, Borer JS, Preibisz J, Bornstein A. The epidemiology of valvular heart disease: a growing public health problem. *Heart Fail Clin*. 2006;2(4):379-93.

172. Iung B, Baron G, Butchart EG, Delahaye F, Gohlke-Bärwolf C, Levang OW, et al. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *Eur Heart J*. 2003 July 1, 2003;24(13):1231-43.
173. Botkin N, Aurigemma G. Aortic valve diseases: a practical clinical approach. *Minerva Cardioangiol*. 2004;54(4):263-72.
174. Osbakken M, Bove A, Spann J. Left ventricular function in chronic aortic regurgitation with reference to end-systolic pressure, volume and stress relations. *Am J Cardiol*. 1981;47(2):193-98.
175. Kamath A, Rai R. Risk factors for progression of calcific aortic stenosis and potential therapeutic targets. *Int J Angiol*. 2008;17:63-70.
176. Akat K, Kaden JJ, Schmitz F, Ewering S, Anton A, Klomfa S, et al. Calcium metabolism in adults with severe aortic valve stenosis and preserved renal function. *Am J Cardiol*. 2010;105(6):862-4.
177. Lossie J, Köhncke C, Mahmoodzadeh S, Steffen W, Canepari M, Maffei M, et al. Molecular mechanism regulating myosin and cardiac functions by ELC. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;450(1):464-9.
178. Caleshu C, Sakhuja R, Nussbaum RL, Schiller NB, Ursell PC, Eng C, et al. Furthering the link between the sarcomere and primary cardiomyopathies: Restrictive cardiomyopathy associated with multiple mutations in genes previously associated with hypertrophic or dilated cardiomyopathy. *Am J Med Genet A*. 2011;155(9):2229-35.
179. Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev*. 2006;86:279-367.
180. Gagat M, Grzanka D, Izdebska M, Sroka WD, Marszał MP, Grzanka A. Tropomyosin-1 protects endothelial cell-cell junctions against cigarette smoke extract through F-actin stabilization in EA.hy926 cell line. *Acta Histochem*. 2014;116(4):606-18.
181. Wang M, Li W, Chang G, Ye C, Ou J, Li X, et al. MicroRNA-21 regulates vascular smooth muscle cell function via targeting tropomyosin 1 in arteriosclerosis obliterans of lower extremities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:2044-53.
182. de la Cuesta F, Alvarez-Llamas G, Maroto AS, Donado A, Zubiri I, Posada M, et al. A proteomic focus on the alterations occurring at the human atherosclerotic coronary intima. *Mol Cell Proteomics*. [Article]. 2011 Apr;10(4):13.
183. Lei Y, Sinha A, Nosoudi N, Grover A, Vyavahare N. Hydroxyapatite and calcified elastin induce osteoblast-like differentiation in rat aortic smooth muscle cells. *Exp Cell Res*. 2014;323:198-208.

184. Park SJ, Kim SH, Choi HS, Rhee Y, Lim S-K. Fibroblast growth factor 2-induced cytoplasmic asparaginyl-tRNA synthetase promotes survival of osteoblasts by regulating anti-apoptotic PI3K/Akt signaling. *Bone*. 2009;45:994-1003.
185. Conti MA, Even-Ram S, Liu C, Yamada KM, Adelstein RS. Defects in cell adhesion and the visceral endoderm following ablation of nonmuscle myosin heavy chain II-A in mice. *J Biol Chem*. 2004;279(40):41263-6.
186. Beazley KE, Banyard D, Lima F, Deasey SC, Nurminsky DI, Konoplyannikov M, et al. Transglutaminase inhibitors attenuate vascular calcification in a preclinical model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(1):43-51.
187. Matlung HL, Neele AE, Groen HC, van Gaalen K, Tuna BG, van Weert A, et al. Transglutaminase activity regulates atherosclerotic plaque composition at locations exposed to oscillatory shear stress. *Atherosclerosis*. 2012;224(2):355-62.
188. Griffin M, Casadio R, Bergamini C. Transglutaminases: nature's biological glues. *Biochem J*. 2002;368:377-96.
189. Buono R, Lang R. Hypoxic repression of lactate dehydrogenase-B in retina. *Exp Eye Res*. 1999;69:685-93.
190. Rossignol F, Solares M, Balanza E, Coudert J, Clottes E. Expression of lactate dehydrogenase A and B genes in different tissues of rats adapted to chronic hypobaric hypoxia. *J Cell Biochem*. 2003;89(1):67-79.
191. Kay HH, Zhu S, Tsoi S. Hypoxia and lactate production in trophoblast cells. *Placenta*. 2007;28(8):854-60.
192. Cai Z, Li F, Gong W, Liu W, Duan Q, Chen C, et al. Endoplasmic reticulum stress participates in aortic valve calcification in hypercholesterolemic animals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(10):2345-54.
193. Mesaeli N, Nakamura K, Zvaritch E, Dickie P, Dziak E, Krause K-H, et al. Calreticulin is essential for cardiac development. *J Cell Biol*. 1999;144(5):857-68.
194. Williams DB. Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci*. 2006;119(4):615-23.
195. Ellgaard L, Helenius A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(3):181-91.
196. Jarosch E, Taxis C, Volkwein C, Bordallo J, Finley D, Wolf DH, et al. Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nat Cell Biol*. 2002;4(2):134-9.
197. Ahmed M, Jadhav A, Hassan A, Meng Q. Acute phase reactants as novel predictors of cardiovascular disease. *ISRN Inflamm*. 2012;6:953461.

198. Hribal M, Procopio T, Petta S, Sciacqua A, Grimaudo S, Pipitone R, et al. Insulin-like growth factor-I, inflammatory proteins, and fibrosis in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98:E304-E8.
199. Anderson L. Candidate-based proteomics in the search for biomarkers of cardiovascular disease. *J Physiol.* 2005 February 15, 2005;563(1):23-60.
200. Wilson N, Schulz B, Karlsson N, Packer N. Sequential analysis of N- and O-linked glycosylation of 2D-PAGE separated glycoproteins. *J Proteome Res.* 2002;1(6):521-9.
201. Kleinert P, Kuster T, Arnold D, Jaeken J, Heizmann CW, Troxler H. Effect of glycosylation on the protein pattern in 2-D-gel electrophoresis. *Proteomics.* 2007;7(1):15-22.
202. Kovarova H, Hajduch M, Livingstone M, Dzubak P, Lefkovits I. Analysis of state-specific phosphorylation of proteins by two-dimensional gel electrophoresis approach. *J Chromatogr B.* 2003;787(1):53-61.
203. Thompson SG, Fechtrop C, Squire E, Heyse U, Breithardt G, van de Loo JCW, et al. Antithrombin III and fibrinogen as predictors of cardiac events in patients with angina pectoris. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16(3):357-62.
204. Takano K, Yamaguchi T, Uchida K. Markers of a hypercoagulable state following acute ischemic stroke. *Stroke.* 1992;23:194-8.
205. Borissoff J, Heeneman S, Kiliç E, Kassák P, Van Oerle R, Winckers K, et al. Early atherosclerosis exhibits an enhanced procoagulant state. *Circulation.* 2010;122:821-30.
206. Natorka J, Wypasek E, Grudzień G, Sadowski J, Undas A. Impaired fibrinolysis is associated with the severity of aortic stenosis in humans. *J Thromb Haemost.* 2013;11(4):733-40.
207. Chu A. Tissue factor, blood coagulation, and beyond: an overview. *Int J Inflam.* 2011;2011.
208. Doggen CJM, Rosendaal FR, Meijers JCM. Levels of intrinsic coagulation factors and the risk of myocardial infarction among men: opposite and synergistic effects of factors XI and XII. *Blood.* 2006;108:4045-51.
209. Bach J, Endler G, Winkelmann B, Boehm B, Maerz W, Mannhalter C, et al. Coagulation factor XII (FXII) activity, activated FXII, distribution of FXII C46T gene polymorphism and coronary risk. *J Thromb Haemost.* 2008;6:291-6.
210. Schwartz I, Seger D, Shaltiel S. Vitronectin. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999;31(5):539-44.
211. Schoenmakers SHHF, Reitsma PH, Spek CA. Blood coagulation factors as inflammatory mediators. *Blood Cells Mol Dis.* 2005 2005/2//;34(1):30-7.

212. Demetz G, Otto I. The interface between inflammation and coagulation in cardiovascular disease. *Int J Inflamm*. 2012;2012.
213. Kidmose R, Laursen N, Dobó J, Kjaer T, Sirotkina S, Yatime L, et al. Structural basis for activation of the complement system by component C4 cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:15425-30.
214. Goicoechea de Jorge E, Caesar JJE, Malik TH, Patel M, Colledge M, Johnson S, et al. Dimerization of complement factor H-related proteins modulates complement activation in vivo. *PNAS*. 2013;110(12):4685-90.
215. Havel RJ, Fielding CJ, Olivecrona T, Shore VG, Fielding PE, Egelrud T. Cofactor activity of protein components of human very low density lipoproteins in the hydrolysis of triglycerides by lipoprotein lipase from different sources. *Biochemistry*. 1973;12(9):1828-33.
216. Shachter NS, Hayek T, Leff T, Smith JD, Rosenberg DW, Walsh A, et al. Overexpression of apolipoprotein CII causes hypertriglyceridemia in transgenic mice. *J Clin Invest*. 1994;93(4):1683-90.
217. Fornengo P, Bruno A, Gambino R, Cassader M, Pagano G. Resistant hypertriglyceridemia in a patient with high plasma levels of apolipoprotein CII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(10):2329-39.
218. Tian L, Xu Y, Fu M, Jia L, Yang Y. Influence of apolipoproteinCII concentrations on HDL subclass distribution. *J Atheroscler Thromb*. 2009;16(5):611-20.
219. de Silva HV, Stuart WD, Duvic CR, Wetterau JR, Ray MJ, Ferguson DG, et al. A 70-kDa apolipoprotein designated ApoJ is a marker for subclasses of human plasma high density lipoproteins. *J Biol Chem*. 1990;265(22):13240-7.
220. Ahuja H, Tenniswood M, Lockshin R, Zakeri Z. Expression of clusterin in cell differentiation and cell death. *Biochem Cell Biol*. 1994;72:523-30.
221. Gelissen I, Hochgrebe T, Wilson M, Eastbrook-Smith S, Jessup W, Dean R, et al. Apolipoprotein J (clusterin) induces cholesterol export from macrophage-foam cells: a potential anti-atherogenic function? *Biochem J*. 1998;331:231-7.
222. Bassenge E. Endothelial function in different organs. *Prog Cardiovasc Dis*. 1996;39(3):209-28.
223. Machnica L, Deja G, Polanska J, Jarosz-Chobot P. Blood pressure disturbances and endothelial dysfunction markers in children and adolescents with type 1 diabetes. *Atherosclerosis*. 2014;237(1):129-34.
224. González-Ramón N, Hoebe K, Alava MA, van Leengoed L, Piñeiro M, Carmona S, et al. Pig MAP/ITIH4 and haptoglobin are interleukin-6-dependent acute-phase plasma proteins in porcine primary cultured hepatocytes. *Eur J Biochem*. 2000;267(6):1878-85.

225. Harraghy N, Mitchell TJ. Isolation and characterization of the promoter and partial enhancer region of the porcine inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 gene. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;12(11):1336-9.
226. Piñeiro M, Alava M, Gonzalez-Ramon N, Osada J, Lasierra P, Larrad L, et al. ITIH4 serum concentration increases during acute-phase processes in human patients and is up-regulated by interleukin-6 in hepatocarcinoma HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;263(1):224-9.
227. Balanescu S, Calmac L, Constantinescu D, Marinescu M, Onut R, Dorobantu M. Systemic inflammation and early atheroma formation: are they related? *Maedica (Buchar)*. 2010;5:292-301.
228. Desai D, Faubion WA, Sandborn WJ. Review article: biological activity markers in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;25:247-55.
229. Zeevalk GD, Derr-Yellin E, Nicklas WJ. Relative vulnerability of dopamine and GABA neurons in mesencephalic culture to inhibition of succinate dehydrogenase by malonate and 3-nitropropionic acid and protection by NMDA receptor blockade. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995;275:1124-30.
230. Pon J, Napoli E, Luckhart S, Giulivi C. Mitochondrial NAD⁺-dependent malic enzyme from *Anopheles stephensi*: a possible novel target for malaria mosquito control. *Malar J*. 2011;10(1):318.
231. Iwakura M, Hattori J, Arita Y, Tokushige M, Katsuki H. Studies on regulatory functions of malic enzymes. VI. Purification and molecular properties of NADP-linked malic enzyme from *Escherichia coli* W. *J Biochem*. 1979;85(5):1355-65.
232. Sanborn T, Gavin W, Berkowitz S, Perille T, Lesch M. Augmented conversion of aspartate and glutamate to succinate during anoxia in rabbit heart. *Am J Physiol*. 1979;237:H535-H41.
233. Peuhkurinen KJ, Takala TE, Nuutinen EM, Hassinen IE. Tricarboxylic acid cycle metabolites during ischemia in isolated perfused rat heart. *Am J Physiol*. 1983;244:H281-H8.
234. Pisarenko O, Studneva I, Khlopkov V, Solomatina E, Ruuge E. An assessment of anaerobic metabolism during ischemia and reperfusion in isolated guinea pig heart. *Biochim Biophys Acta*. 1988;934(1):55-63.
235. Pisarenko O, Studneva I, Khlopkov V. Metabolism of the tricarboxylic acid cycle intermediates and related amino acids in ischemic guinea pig heart. *Biomed Biochim Acta*. 1987;46(S568-71).
236. Semenza GL. Hypoxia-Inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci S T K E*. 2007;2007:cm8-cm.

237. Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*. 2005;7(1):77-85.
238. Wise D, Ward P, Shay J, Cross J, Gruber J, Sachdeva U, et al. Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of α -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:19611-6.
239. Weinberg JM, Venkatachalam MA, Roeser NF, Saikumar P, Dong Z, Senter RA, et al. Anaerobic and aerobic pathways for salvage of proximal tubules from hypoxia-induced mitochondrial injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000;279:F927-F43.
240. Kim J-w, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metabolism*. 2006;3(3):177-85.
241. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metabolism*. 2006;3(3):187-97.
242. Miuma S, Ichikawa T, Arima K, Takeshita S, Muraoka T, Matsuzaki T, et al. Branched-chain amino acid deficiency stabilizes insulin-induced vascular endothelial growth factor mRNA in hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Biochem*. 2012;113(10):3113-21.
243. Ijichi C, Matsumura T, Tsuji T, Eto Y. Branched-chain amino acids promote albumin synthesis in rat primary hepatocytes through the mTOR signal transduction system. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;303(1):59-64.
244. Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med*. 2002;8(4):S62-S7.
245. Salo T, Soini Y, Oiva J, KariYlitalo, Nissinen A, Biancari F, et al. Chemically modified tetracyclines (CMT-3 and CMT-8) enable control of the pathologic remodelling of human aortic valve stenosis via MMP-9 and VEGF inhibition. *Int J Cardiol*. 2006;111(3):358-64.
246. Pohjolainen V, Taskinen P, Soini Y, RysÄœ J, Ilves M, Juvonen T, et al. Noncollagenous bone matrix proteins as a part of calcific aortic valve disease regulation. *Hum Pathol* 2008;39(11):1695-701.
247. Mohler ER, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane MG, Kaplan FS. Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation*. 2001;103(11):1522-8.
248. Wessel PM, Graciet E, Douce R, Dumas R. Evidence for two distinct effector-binding sites in threonine deaminase by site-directed mutagenesis, kinetic, and binding experiments. *Biochemistry*. 2000;39(49):15136-43.

249. Chen L, Chen Z, Zheng P, Sun J, Zeng A-P. Study and reengineering of the binding sites and allosteric regulation of biosynthetic threonine deaminase by isoleucine and valine in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97(7):2939-49.
250. Parimi PS, Gruca LL, Kalhan SC. Metabolism of threonine in newborn infants. *Am J Physiol*. 2005;289:E981-E5.
251. Shet K, Siddiqui SM, Yoshihara H, Kurhanewicz J, Ries M, Li X. High-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy of human osteoarthritic cartilage. *NMR Biomed*. 2012;25(4):538-44.
252. Zhong Z, Jones S, Thurman RG. Glycine minimizes reperfusion injury in a low-flow, reflow liver perfusion model in the rat. *Am J Physiol*. 1996;270:G332-G8.
253. Spittler A, Reissner CM, Oehler R, Gornikiewicz A, Gruenberger T, Manhart N, et al. Immunomodulatory effects of glycine on LPS-treated monocytes: reduced TNF-alpha production and accelerated IL-10 expression. *The FASEB Journal*. 1999 March 1, 1999;13(3):563-71.
254. Wheeler M, Ikejema K, Enomoto N, Stacklewitz R, Seabra V, Zhong Z, et al. Glycine: a new anti-inflammatory immunonutrient. *Cell Mol Life Sci*. 1999;56:843-56.
255. Schemmer P, Zhong Z, Galli U, Wheeler M, Xiangli L, Bradford B, et al. Glycine reduces platelet aggregation. *Amino Acids*. 2013;44(3):925-31.
256. Vikenes K, Farstad M, Nordrehaug JE. Serotonin is associated with coronary artery disease and cardiac events. *Circulation*. 1999;100(5):483-9.
257. Yamada S, Akita H, Kanazawa K, Ishida T, Hirata K-i, Ito K, et al. T102C polymorphism of the serotonin (5-HT) 2A receptor gene in patients with non-fatal acute myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2000;150(1):143-8.
258. Mercado C, Kilic F. Molecular mechanisms of SERT in platelets: regulation of plasma serotonin levels. *Mol Interv*. 2010;10:231-41.
259. Shirakawa R, Yoshioka A, Horiuchi H, Nishioka H, Tabuchi A, Kita T. Small GTPase Rab4 regulates Ca²⁺-induced alpha-granule secretion in platelets. *J Biol Chem*. 2000;275(43):33844-9.
260. Symons M, Rusk N. Control of vesicular trafficking by Rho GTPases. *Curr Biol*. 2003;13(10):R409-R18.
261. Xu J, Jian B, Chu R, Lu Z, Li Q, Dunlop J, et al. Serotonin mechanisms in heart valve disease II: the 5-HT₂ receptor and its signaling pathway in aortic valve interstitial cells. *Am J Pathol*. 2002;161(6):2209-18.
262. Rajamannan N, Caplice N, Anthikad F, Sebo T, Orszulak T, Edwards W, et al. Cell proliferation in carcinoid valve disease: a mechanism for serotonin effects. *J Heart Valve Dis*. 2001;10:827-31.

263. Rosenblat M, Volkova N, Coleman R, Aviram M. Anti-oxidant and anti-atherogenic properties of liposomal glutathione: Studies in vitro, and in the atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2007;195(2):e61-e8.
264. Qiao M, Kisgati M, Cholewa JM, Zhu W, Smart EJ, Sulistio MS, et al. Increased expression of glutathione reductase in macrophages decreases atherosclerotic lesion formation in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(6):1375-82.
265. Cheng H, Gonzalez R. The effect of high glucose and oxidative stress on lens metabolism, aldose reductase, and senile cataractogenesis. *Metab Clin Exp*. 1986;35:10-4.
266. Tang W, Martin KA, Hwa J. Aldose reductase, oxidative stress and diabetic mellitus. *Front Pharmacol*. [Mini Review]. 2012;3:87.
267. Schulz C, Leuschen NV, Fröhlich T, Lorenz M, Pfeiler S, Gleissner CA, et al. Identification of novel downstream targets of platelet glycoprotein VI activation by differential proteome analysis: implications for thrombus formation. *Blood*. 2010;115:4102-10.
268. Ramana KV, Srivastava SK. Aldose reductase: A novel therapeutic target for inflammatory pathologies. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(1):17-20.
269. Vedantham S, Noh H, Ananthakrishnan R, Son N, Hallam K, Hu Y, et al. Human aldose reductase expression accelerates atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(8):1805-13.
270. Vikramadithyan RK, Hu Y, Noh H-L, Liang C-P, Hallam K, Tall AR, et al. Human aldose reductase expression accelerates diabetic atherosclerosis in transgenic mice. *J Clin Invest*. 2005;115(9):2434-43.
271. Bankar SB, Bule MV, Singhal RS, Ananthanarayan L. Glucose oxidase - An overview. *Biotechnol Adv*. 2009;27(4):489-501.
272. Kolodziejczyk J, Saluk-Juszczak J, Wachowicz B. In vitro study of the antioxidative properties of the glucose derivatives against oxidation of plasma components. *J Physiol Biochem*. 2011;67(2):175-83.
273. Yamani M, Nakhleh R. A novel chemical solution to demineralize valvular and coronary calcification: insights from yogurt and honey. *J Cardiovasc Dis Diagn*. 2013;1:130.
274. Mortimer BC, Kenrick MA, Holthouse DJ, Stick RV, Redgrave TG. Plasma clearance of model lipoproteins containing saturated and polyunsaturated monoacylglycerols injected intravenously in the rat. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1127(1):67-73.

275. Sposito AC, Ventura LI, Vinagre CG, Lemos PA, Quintella E, Santos RD, et al. Delayed intravascular catabolism of chylomicron-like emulsions is an independent predictor of coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2004;176(2):397-403.
276. Devlin CM, Lee S-J, Kuriakose G, Spencer C, Becker L, Grosskopf I, et al. An apolipoprotein(a) peptide delays chylomicron remnant clearance and increases plasma remnant lipoproteins and atherosclerosis in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(8):1704-10.
277. Van Buskirk JJ, Kirsch WM, Kleyer DL, Barkley RM, Koch TH. Aminomalonic acid: identification in *Escherichia coli* and atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(3):722-5.
278. Chakrabarti M, Cheng KT, Spicer KM, Kirsch WM, Fowler SD, Kelln W, et al. Biodistribution and radioimmunopharmacokinetics of ¹³¹I-Ama monoclonal antibody in atherosclerotic rabbits. *Nucl Med Biol*. 1995;22(6):693-7.
279. Krumme D, Wenzel H, Tschesche H. Hydroxamate derivatives of substrate-analogous peptides containing aminomalonic acid are potent inhibitors of matrix metalloproteinases1. *FEBS letters*. 1998;436(2):209-12.
280. Dweck MR, Boon NA, Newby DE. Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60:1854-63.
281. Bentz H, Nathan RM, Rosen DM, Armstrong RM, Thompson AY, Segarini PR, et al. Purification and characterization of a unique osteoinductive factor from bovine bone. *J Biol Chem*. 1989;264(34):20805-10.
282. Chan CYXa, Masui O, Krakovska O, Belozarov VE, Voisin S, Ghanny S, et al. Identification of differentially regulated secretome components during skeletal myogenesis. *Mol Cell Proteomics*. 2011;10(5).
283. Tanaka K-i, Matsumoto E, Higashimaki Y, Katagiri T, Sugimoto T, Seino S, et al. Role of osteoglycin in the linkage between muscle and bone. *J Biol Chem*. 2012;287(15):11616-28.
284. Lewandowska K, Choi HU, Rosenberg LC, Sasse J, Neame PJ, Culp LA. Extracellular matrix adhesion-promoting activities of a dermatan sulfate proteoglycan-associated protein (22K) from bovine fetal skin. *J Cell Sci*. 1991;99(3):657-68.
285. MacBeath JR, Shackleton DR, Hulmes DJ. Tyrosine-rich acidic matrix protein (TRAMP) accelerates collagen fibril formation in vitro. *J Biol Chem*. 1993;268(26):19826-32.
286. Liu X, Meng L, Shi Q, Liu S, Cui C, Hu S, et al. Dermatopontin promotes adhesion, spreading and migration of cardiac fibroblasts in vitro. *Matrix Biol*. 2013;32(1):23-31.
287. Porat A, Sagiv Y, Elazar Z. A 56-kDa selenium-binding protein participates in intra-Golgi protein transport. *J Biol Chem*. 2000;275(19):14457-65.

288. Torrealba JR, Colburn M, Golner S, Chang Z, Scheunemann T, Fechner JH, et al. Selenium-binding protein-1 in smooth muscle cells is downregulated in a rhesus monkey model of chronic allograft nephropathy. *Am J Transplant*. 2005;5(1):58-67.
289. Xu S, Gotlieb AI. Wnt3a/ β -catenin increases proliferation in heart valve interstitial cells. *Cardiovasc Pathol*. 2013;22(2):156-66.
290. Chakraborty S, Wirrig EE, Hinton RB, Merrill WH, Spicer DB, Yutzey KE. Twist1 promotes heart valve cell proliferation and extracellular matrix gene expression during development in vivo and is expressed in human diseased aortic valves. *Dev Biol*. 2010;347(1):167-79.
291. Das D, Holmes A, Murphy G, Mishra K, Rosenkranz A, Horowitz J, et al. TGF-beta1-Induced MAPK activation promotes collagen synthesis, nodule formation, redox stress and cellular senescence in porcine aortic valve interstitial cells. *J Heart Valve Dis*. 2013;22:621-30.
292. Shi S, Grothe S, Zhang Y, O'Connor-McCourt MD, Poole AR, Roughley PJ, et al. Link protein has greater affinity for versican than aggrecan. *J Biol Chem*. 2004;279(13):12060-6.
293. Rockel J, Bernier S, Leask A. Egr-1 inhibits the expression of extracellular matrix genes in chondrocytes by TNFalpha-induced MEK/ERK signalling. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(1):R8.
294. Kaden JJ, Dempfle C-E, Grobholz R, Fischer CS, Vocke DC, Kiliç R, et al. Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis. *Cardiovasc Pathol*. 2004;14(2):80-7.
295. Chang G-C, Liu K-J, Hsieh C-L, Hu T-S, Charoenfuprasert S, Liu H-K, et al. Identification of alpha-enolase as an autoantigen in lung cancer: its overexpression is associated with clinical outcomes. *Clin Cancer Res*. 2006;12(19):5746-54.
296. Díaz-Ramos A, Roig-Borrellas A, García-Melero A, López-Alemaný R. α -Enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:156795.
297. Feo S, Arcuri D, Piddini E, Passantino R, Giallongo A. ENO1 gene product binds to the c-myc promoter and acts as a transcriptional repressor: relationship with Myc promoter-binding protein 1 (MBP-1). *FEBS Lett* 2000;473(1):47-52.
298. Sedoris K, Thomas S, Miller D. Hypoxia induces differential translation of enolase/MBP-1. *BMC Cancer*. 2010;10(1):157.
299. Steele R, Mott J, Ray R. MBP-1 upregulates miR-29b that represses Mcl-1, collagens, and matrix-metalloproteinase-2 in prostate cancer cells. *Genes Cancer*. 2010;1:381-7.

300. Jian B, Jones PL, Li Q, Mohler ER, III, Schoen FJ, Levy RJ. Matrix metalloproteinase-2 is associated with tenascin-C in calcific aortic stenosis. *Am J Pathol.* 2001;159(1):321-7.
301. Kaden JJ, Vocke DC, Fischer CS, Grobholz R, Brueckmann M, Vahl CF, et al. Expression and activity of matrix metalloproteinase-2 in calcific aortic stenosis. *Z Kardiol.* 2004;93(2):124-30.
302. Hecker PA, Leopold JA, Gupte SA, Recchia FA, Stanley WC. Impact of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency on the pathophysiology of cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013;304:H491-H500.
303. Salvemini F, Franzé A, Iervolino A, Filosa S, Salzano S, Ursini MV. Enhanced glutathione levels and oxidoresistance mediated by increased glucose-6-phosphate dehydrogenase expression. *J Biol Chem.* 1999;274(5):2750-7.
304. Schousboe I. Beta 2-Glycoprotein I: a plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood.* 1985;66:1086-91.
305. Lin K-Y, Pan J-P, Yang D-L, Huang K-T, Chang M-S, Ding PY-A, et al. Evidence for inhibition of low density lipoprotein oxidation and cholesterol accumulation by apolipoprotein H (beta-2-glycoprotein I). *Life Sci.* 2001;69(6):707-19.
306. Woof JM, Burton DR. Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:89-99.
307. Gullestad L, Aass H, Fjeld JG, Wikeby L, Andreassen AK, Ihlen H, et al. Immunomodulating therapy with intravenous immunoglobulin in patients with chronic heart failure. *Circulation.* 2001;103(2):220-5.
308. Ballou M. Mechanisms of action of intravenous immune serum globulin in autoimmune and inflammatory diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;100(2):151-7.
309. Dufourcq P, Louis H, Moreau C, Daret D, Boisseau MR, Lamazière JMD, et al. Vitronectin expression and interaction with receptors in smooth muscle cells from human atheromatous plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:168-76.
310. de la Cuesta F, Zubiri I, Maroto AS, Posada M, Padial LR, Vivanco F, et al. Deregulation of smooth muscle cell cytoskeleton within the human atherosclerotic coronary media layer. *J Proteomics.* 2013;82:155-65.
311. Kaga E, Karademir B, Baykal AT, Ozer NK. Identification of differentially expressed proteins in atherosclerotic aorta and effect of vitamin E. *J Proteomics.* 2013;92:260-73.
312. Onda M, Ishiwata T, Kawahara K, Wang R, Naito Z, Sugisaki Y. Expression of lumican in thickened intima and smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis. *Exp Mol Pathol.* 2002;72:142-9.

313. de la Cuesta F, Barderas MG, Calvo E, Zubiri I, Maroto AS, Darde VM, et al. Secretome analysis of atherosclerotic and non-atherosclerotic arteries reveals dynamic extracellular remodeling during pathogenesis. *Journal of Proteomics*. 2012;75(10):2960-71.
314. Poggio P, Grau JB, Field BC, Sainger R, Seefried WF, Rizzolio F, et al. Osteopontin controls endothelial cell migration in vitro and in excised human valvular tissue from patients with calcific aortic stenosis and controls. *J Cell Physiol*. 2011;226:2139-49.
315. Felmeden DC, Spencer CGC, Chung NAY, Belgore FM, Blann AD, Beevers DG, et al. Relation of thrombogenesis in systemic hypertension to angiogenesis and endothelial damage/dysfunction (a Substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial [ASCOT]). *Am J Cardiol*. 2003;92:400-5.
316. van der Vusse GJ. Albumin as fatty acid transporter. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2009;24:300-7.
317. Gum ET, Swanson RA, Alano C, Liu J, Hong S, Weinstein PR, et al. Human serum albumin and its N-terminal tetrapeptide (DAHK) block oxidant-induced neuronal death. *Stroke*. 2004;35:590-5.
318. De Clercq S, Boucherie C, Vandekerckhove J, Gettemans J, Guillabert A. L-Plastin nanobodies perturb matrix degradation, podosome formation, stability and lifetime in THP-1 macrophages. *PLoS ONE*. 2013;8(11):e78108.
319. Ferretti G, Bacchetti T, Bicchiega V, Curatola G. Effect of human Apo AIV against lipid peroxidation of very low density lipoproteins. *Chem Phys Lipids*. 2002;114:45-54.
320. Simonovic M, Gettins PGW, Volz K. Crystal structure of human PEDF, a potent anti-angiogenic and neurite growth-promoting factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(20):11131-5.
321. Martin-Ventura JL, Duran MC, Blanco-Colio LM, Meilhac O, Leclercq A, Michel J-B, et al. Identification by a differential proteomic approach of heat shock protein 27 as a potential marker of atherosclerosis. *Circulation*. 2004;110:2216-9.
322. Rolla S, Ingoglia G, Bardina V, Silengo L, Altruda F, Novelli F, et al. Acute-phase protein hemopexin is a negative regulator of Th17 response and experimental autoimmune encephalomyelitis development. *J Immunol*. 2013;191:5451-9.
323. Talmud PJ, Martin S, Steiner G, Flavell DM, Whitehouse DB, Nagl S, et al. Progression of atherosclerosis is associated with variation in the alpha1-antitrypsin gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:644-9.
324. Buchmaier BS, Bibi A, Müller GA, Dihazi GH, Eltoweissy M, Kruegel J, et al. Renal cells express different forms of vimentin: the independent expression alteration of these forms is important in cell resistance to osmotic stress and apoptosis. *PLoS ONE*. 2013;8:e68301.

325. Li W, Febbraio M, Reddy SP, Yu D-Y, Yamamoto M, Silverstein RL. CD36 participates in a signaling pathway that regulates ROS formation in murine VSMCs. *J Clin Invest.* 2010;120:3996-4006.

ANEXO I: CURRICULUM VITAE

EXPERIENCIA PROFESIONAL

-Momento actual: Contrato asociado a proyecto en el Laboratorio de Fisiopatología Vascular del Hospital Nacional de Paraplégicos. Laboratorio de la Dra. M. G. Barderas.

-10/2009-01/2011: Ampliación de estudios en el Laboratorio de Fisiopatología Vascular del Hospital Nacional de Paraplégicos en Toledo. Laboratorio de la Dra. M. G. Barderas.

-03/2009-07/2009: Prácticas en empresa en Applus en el departamento de Agroalimentaria en Madrid.

-09/2008-05/2009: Colaboración en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la UAH. Proyecto: Análisis microbiológico de polen de abeja de Guadalajara. Laboratorio de la Dra. Fernández Monistrol.

DATOS ACADÉMICOS

-Estudiante de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina en la Universidad Complutense de Madrid

-Máster en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina en la Universidad Complutense de Madrid (Fecha de finalización: 09/2012)

-Licenciatura de Biología (Especialidad: Biología Sanitaria) en la Universidad de Alcalá de Henares, Madrid (Fecha: 09/2003-09/2009)

-Título superior de inglés en la Escuela Oficial de Idiomas en San Fernando de Henares, Madrid (Fecha de finalización: 09/2005)

PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS

Nuevos abordajes proteómicos y metabolómicos en el estudio de la evolución de órganos diana en pacientes hipertensos tratados con bloqueantes del sistema renina

angiotensina. Financiado por la Fundación para la Investigación Sanitaria. PI 11/02239. Duración: 2011-2014. IP: MG. Barderas

Estenosis Aórtica Degenerativa. Estudio de Aspectos Patogénicos mediante análisis proteómico. Financiado por la Sociedad Española de Cardiología (SEC). Duración: 2007-2008. IP: Luis Rodríguez Radial

Búsqueda de biomarcadores pronóstico y diagnóstico en células endoteliales circulantes de pacientes con Infarto Cerebral y con Infarto Agudo de Miocardio mediante análisis proteómico. Financiado por la Fundación para la Investigación Sanitaria en Castilla-La Mancha. PI2008/28. Duración: 2008-2011. IP: Félix Gil Dones.

Búsqueda de nuevas proteínas diagnósticas y pronósticas en la enfermedad cardiovascular mediante análisis proteómico. Financiado por la Fundación para la Investigación Sanitaria. Duración: 2007-2010. IP: Dra. M. G. Barderas.

PUBLICACIONES

1. Laborde CM, Alonso-Orgaz S, Mourino-Alvarez L, Moreu J, Vivanco F, Padial LR, Barderas MG. The plasma proteomic signature as a strategic tool for early diagnosis of acute coronary syndrome. *Proteome Sci*. IF: 2.42 (2013)
2. Laborde CM, Mourino-Alvarez L, Posada-Ayala M, Alvarez-Llamas G, Serranillos-Reus MG, Moreu J, Vivanco F, Padial LR and Barderas MG. Plasma metabolomics reveals a potential panel of biomarkers for early diagnosis in acute coronary syndrome. *Metabolomics*. June 2014, Volume 10, Issue 3, pp 414-424. IF. 4.433 (2013)
3. Mourino-Alvarez L, Laborde CM, Barderas MG. Proteomics and metabolomics in Aortic Stenosis: Studying healthy valves for a better understanding of the disease (2013). In: *Calcific Aortic Valve Disease*, Dr. Elena Aikawa (Ed.), ISBN 978-953-51-1150-4, InTech, DOI: 10.5772/55589.
4. Mourino-Alvarez L, Calvo E, Moreu J, Padial LR, Lopez JA, Barderas MG*, Gil-Dones F*. Proteomic characterization of EPCs and CECs "in vivo" from acute coronary syndrome patients and control subjects. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Dec 26. IF. 3.84 (2013)

5. Laborde CM, Mourino-Alvarez L, Akerstrom F, Padial LR, Vivanco F, Gil-Dones F, Barderas MG. Potential blood biomarkers for stroke. *Expert Rev Proteomics*. 2012 Aug;9(4):437-49. IF. 3.542(2013)
6. Gil-Dones F, Darde VM, Alonso-Orgaz S, Lopez-Almodovar LF, Mourino-Alvarez L, Padial LR, Vivanco F, Barderas MG. Inside Human Aortic Stenosis: a proteomic analysis of plasma. *J Proteomics*. 2012 Feb 16;75(5):1639-53. IF. 4.088 (2013)
7. Laborde CM, Zubiri I, Alonso-Orgaz S, Mourino-Alvarez L, Padial LR, Gomez-Serranillos M, Vivanco F, Alvarez-Llamas G, Barderas MG. Aportaciones de la proteómica al laboratorio clínico. *Rev Lab Clín*. 2011; 4(4):214-224.

PREMIOS DE INVESTIGACIÓN

Accésit a la mejor comunicación en Investigación Clínica al poster titulado: "Characterization of individualized proteomic profiles in st-segment elevation and non st-segment elevation Acute Coronary Syndrome." VIII Jornadas de Jóvenes Investigadores de Albacete, Albacete, Junio, 2011.

BECAS OBTENIDAS

Beca de la Fondation pour la Prevention des Maladies Cardiovasculaires para la realización de la Tesis Doctoral (Fecha: 07/2013-07/2014)

Beca de la Sociedad Española de Proteómica (SeProt) para la asistencia a: 6th European Summer School "FEBS Advanced Lecture Course on High Performance Proteomics" (Fecha: 19-25/08/2012)

COMUNICACIONES ORALES

Desarrollo de nuevas estrategias para el estudio del Infarto Cerebral. Seminario de la Unidad de Neurología Experimental del Hospital Nacional de Parapléjicos (Fecha: 08/04/2011)

COMUNICACIONES A CONGRESOS

1. Elucidating the relationship between calcific aortic stenosis and atherosclerosis: a comprehensive proteomic study in aortic valve tissue. L. Mourino-Alvarez, F. de la Cuesta, T. Sastre-Oliva, M. Baldan-Martin, LF. Lopez-Almodovar, E. Rosello-

- Lleti, M. Rivera, PL. Sanchez, LR. Padial, MG. Barderas. HUPO 13th Annual World Congress, Madrid (Spain), Octubre, 2014
2. Identification of potential biomarkers of ischemic stroke by integrating 2D-DIGE and label free-MS/MS. L. Mourino-Alvarez, F. Gil-Dones, A. Juarez-Belaunde, R. Moreno-Luna, T. Sastre-Oliva, C. Marsal, LR. Padial, JA. López, MG. Barderas. HUPO 13th Annual World Congress, Madrid (Spain), Octubre, 2014.
 3. iTRAQ: a strategy for biomarker profiling in aortic stenosis disease. T. Martin-Rojas, L. Mourino-Alvarez, F. de la Cuesta, S. Alonso-Orgaz, T. Sastre-Oliva, LF. Lopez-Almodovar, E. Calvo, LR. Padial, JA. Lopez, MG. Barderas. HUPO 13th Annual World Congress, Madrid (Spain), Octubre, 2014
 4. A characteristic proteomic and metabolomic profile with utility in predicting evolution of patients with arterial hypertension. Montserrat Baldan-Martin, Laura Mourino-Alvarez, Fernando de la Cuesta, Laura Gonzalez-Calero, Gloria Alvarez-Llamas, Julián Segura, Cesar Cerezo, Luis R. Padial, Fernando Vivanco Luis M. Ruilope, Maria G. Barderas. The American Journal of Hypertension, New York (USA), Mayo, 2014
 5. Existe un perfil proteómico y metabolómico en sangre de pacientes hipertensos con valor pronóstico de la eficiencia de la supresión del sistema renina-angiotensina. Montserrat Baldan-Martin, Fernando de la Cuesta, Laura Mourino-Alvarez, Gloria Alvarez Llamas, Laura Gonzalez-Calero, Julián Segura, Luis R. Padial, Fernando Vivanco, Luis M. Ruilope, Maria G. Barderas. 19ª Reunión Nacional de la SEH-LEHLHA. Madrid (Spain), Marzo, 2014
 6. Aortic stenosis in a rabbit model: proteomic analysis of valve tissue. L. Mourino-Alvarez, F. de la Cuesta, M. Baldan-Martin and MG. Barderas. HUPO 12th Annual World Congress, Yokohama (Japón), Septiembre, 2013
 7. Proteomics and Metabolomics: New Tools to Study Albuminuria in Patients with Arterial Hypertension. M. Baldan-Martin, L. Mourino-Alvarez, F. de la Cuesta, LM. Ruilope, LR. Padial, MG. Barderas. HUPO 12th Annual World Congress, Yokohama (Japón), Septiembre, 2013
 8. Searching for potential biomarkers of degenerative aortic disease using differential proteomics. Mourino-Alvarez L., F. De la Cuesta, M.G. Barderas. VIII Jornadas de Jóvenes Investigadores de Albacete, Albacete, Octubre, 2012
 9. Degenerative aortic disease: searching for potential biomarkers using differential proteomics. L. Mourino-Alvarez, F. de la Cuesta, MG Barderas. 6th European

Summer School “FEBS Advanced Lecture Course – High Performance Proteomics”, Brixen/Bressanone (Italy), Agosto, 2012

10. Metabolómica: una nueva herramienta para el estudio conjunto de la aterosclerosis y la estenosis aórtica degenerativa. Laura Mourino-Alvarez, Carlos M. Laborde, Luis R. Padial, José Moreu, Fernando Vivanco, Manuel Gómez Serranillos-Reus, Félix Gil-Dones, María G. Barderas. III Jornadas Bienales de Jóvenes Investigadores en Proteómica, Santiago de Compostela, Febrero, 2012.
11. Caracterización proteómica in vivo de células endoteliales circulantes y células progenitoras de endoteliales en pacientes con síndrome coronario agudo. L. Mourino-Alvarez, E. Calvo, CM. Laborde, S. Alonso-Orgaz, LR. Padial, J. Moreu, JA. Lopez, MG. Barderas+, F. Gil-Dones+. III Jornadas Bienales de Jóvenes Investigadores en Proteómica, Santiago de Compostela, Febrero, 2012.
12. Hacia una comprensión completa de la fisiopatología del síndrome coronario agudo mediante la combinación de estudios proteómicos y metabolómicos. Carlos M. Laborde, Laura Mourino-Alvarez, Sergio Alonso-Orgaz, Luis R. Padial, Fernando Vivanco, Manuel Gómez Serranillos-Reus, María G. Barderas. III Jornadas Bienales de Jóvenes Investigadores en Proteómica, Santiago de Compostela, Febrero, 2012.
13. Characterization of endothelial cell populations in acute coronary syndrome using a proteomic approach. L. Mourino-Alvarez, E. Calvo, CM. Laborde, S. Alonso-Orgaz, L.R. Padial, JA. Lopez, MG. Barderas, F. Gil-dones. 13as Jornadas de Análisis Instrumental, Barcelona, Noviembre, 2011.
14. Towards a complete understanding of physiopathology of acute coronary syndrome by metabolomic and proteomic studies. Carlos M. Laborde, Laura Mourino-Alvarez, Sergio Alonso-Orgaz, Luis R. Padial, Fernando Vivanco, María G. Barderas. 13as Jornadas de Análisis Instrumental, Barcelona, Noviembre, 2011.
15. Quantitative proteomic approach for identification of differentially expressed proteins after Primary Percutaneous Coronary Intervention in ST-segment elevation Myocardial Infarction. Sergio Alonso-Orgaz, Carlos M. Laborde, Laura Mourino, Félix Gil-Dones, Fernando de la Cuesta, Fernando Vivanco, Luis R. Padial, José Moreu, María G. Barderas. Transcatheter Cardiovascular Therapeutics 2011. San Francisco (California), Noviembre, 2011
16. Proteomic characterization of circulating endothelial cells and circulating progenitor endothelial cells. L. Mouriño-Álvarez, E. Calvo, C. M. Laborde, T.

- Martin-Rojas, S. Alonso-Orgaz, L. R. Padial, J. A. López, F. Vivanco, M. G. Barderas, F. Gil-Dones. HUPO 10th Annual World Congress, Genova (Italia), Septiembre, 2011.
17. Aortic stenosis valve secretome analysis: new approach to understanding this pathology. T. Martin Rojas, G. Alvarez Llamas, F. de la Cuesta, E. Calvo, F. Gil-Dones, V. M. Darde, L. Mouriño-Alvarez, L. F. López-Almodovar, L. R. Padial, J. A. López, F. Vivanco, M. G. Barderas. HUPO 10th Annual World Congress, Genova (Italia), Septiembre, 2011.
 18. Proteomic characterization of endothelial cell populations in acute coronary syndrome. L. Mourino-Alvarez, E. Calvo, CM. Laborde, T. Martin-Rojas, S. Alonso-Orgaz, LR. Padial, JA. Lopez, F. Vivanco, MG. Barderas, F. Gil-Dones. VIII Jornadas de Jóvenes Investigadores de Albacete, Albacete, Junio, 2011.
 19. Characterization of individualized proteomic profiles in st-segment elevation and non st-segment elevation Acute Coronary Syndrome. CM. Laborde, L. Mouriño, S. Alonso-Orgaz, J. Moreu, LR. Padial. F. Vivanco, F. Gil-Dones, MG. Barderas. VIII Jornadas de Jóvenes Investigadores de Albacete, Albacete, Junio, 2011. ACCÉSIT A LA MEJOR COMUNICACIÓN EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA.
 20. Proteomics: A powerful tool to deepen the molecular mechanisms of ischemic stroke. L. Mouriño, CM. Laborde, S. Alonso-Orgaz, LR. Padial, MM. Morín, C. Marsal, MG. Barderas, F. Gil-Dones. IFCC WorldLab and EuroMedLab, Berlin (Alemania), Mayo, 2011.
 21. Characterization of individualized proteomic profiles in ST-segment elevation and non ST-segment elevation Acute Coronary Syndrome. CM. Laborde, L. Mouriño, S. Alonso-Orgaz, J. Moreu, LR. Padial, F. Vivanco, F. Gil-Dones, MG. Barderas. IFCC WorldLab and EuroMedLab, Berlin (Alemania), Mayo, 2011.
 22. Identification of proteins secreted by aortic valves in the search for biomarkers. Tatiana Martín-Rojas, Gloria Alvarez-Llamas, Fernando de la Cuesta, Enrique Calvo, FelixGil-Dones, VeronicaM. Dardé, Laura Mouriño, Luis F. Lopez-Almodovar, Luis R. Padial, Juan-AntonioLopez, Fernando Vivanco, Maria G. Barderas. Proteomics Forum, Berlin (Alemania), Abril, 2011.
 23. Proteomics: A powerful tool to deepen the molecular mechanisms of Ischemic Stroke. L. Mouriño, CM. Laborde, S. Alonso-Orgaz, LR. Padial, MM. Morín, C.

- Marsal, MG. Barderas, F. Gil-Dones. 4th Congress of the Spanish Proteomics Society, Segovia. Febrero, 2011.
24. Characterization of individualized proteomic profiles in ST-segment elevation and non ST-segment elevation Acute Coronary Syndrome. CM. Laborde, L. Mouriño, S. Alonso-Orgaz, J. Moreu, LR. Padial, F. Vivanco, F. Gil-Dones, MG. Barderas. 4th Congress of the Spanish Proteomics Society, Segovia. Febrero, 2011.
25. Búsqueda de marcadores pronóstico-diagnóstico en plasma de pacientes de Ictus Isquémico mediante proteómica diferencial. L. Mouriño, CM. Laborde, S. Alonso-Orgaz, LR. Padial, MM. Morín, C. Marsal, MG. Barderas, F. Gil-Dones. IV Congreso Nacional de Laboratorio Clínico, Zaragoza. Octubre, 2010.
26. Análisis proteómico cuantitativo para la identificación de nuevos biomarcadores de interés pronóstico y diagnóstico en Síndrome Coronario Agudo. CM. Laborde, L. Mouriño, S. Alonso-Orgaz, LR. Padial, J. Moreu, F. Vivanco, F. Gil-Dones, MG. Barderas. IV Congreso Nacional de Laboratorio Clínico, Zaragoza. Octubre, 2010.

OTROS CURSOS Y JORNADAS FORMATIVAS

HUPO 10th Annual World Congress, Yokohama, Japan (Fecha: 14-18/09/2013)

Curso: El proyecto proteoma humano: herramientas para su estudio y aplicaciones biomédicas, Madrid (Fecha: 22-24/07/2013)

Integración de resultados multi-ómicos: la clave en la investigación biomédica del siglo XXI, Madrid (Fecha: 14/03/2013)

IX Jornadas de Jóvenes Investigadores de Albacete, Albacete (Fecha: 4-5/10/2012)

Curso: 6th European Summer School “FEBS Advanced Lecture Course – High Performance Proteomics”, Brixen/Bressanone, Italy (Fecha: 19-25/08/2012)

La metabolómica: una –ómica clave en la investigación biomédica, Madrid (Fecha: 19/06/2012)

13as Jornadas de Análisis Instrumental, Barcelona (Fecha: 14-16/Noviembre/2011)

Curso: Introducción a la Citometría de Flujo (16 horas) en el Hospital Nacional de Parapléjicos, Toledo (Fecha: 19-22/Septiembre/2011)

VIII Jornadas de Jóvenes Investigadores de Albacete, Albacete (Fecha: 15-16/Junio/2011)

1st International Workshop on Brain Reorganization after Spinal Cord Injury, Toledo (Fecha: 10-12/Mayo/2011)

Emergent therapies and translational research for Spinal Cord Injury, Toledo (Fecha: 14-15/Abril/2011)

4th Congress of the Spanish Proteomics Society, Segovia (Fecha: 8-11/Febrero/2011)

Curso: Estadística aplicada a las ciencias de la salud: prácticas con SPSS (20 horas) en el Hospital Nacional de Parapléjicos, Toledo (Fecha: 03-23/Noviembre/2010)

Curso: Proteómica (21 horas) en el Hospital Nacional de Parapléjicos, Toledo (Fecha: 28/09/2010-08/10/2010)

OTRAS ACTIVIDADES DE INTERÉS

Comité organizador de las VIII Jornadas de Jóvenes Investigadores de Albacete, Albacete (Fecha: 4-5/10/2013)

Colaborador en el módulo "Formación en Centros de Trabajo" de 380 horas de duración, perteneciente al CFGC Laboratorio de Diagnóstico Clínico para alumnos del IES Juanelo Turriano. Hospital Nacional de Parapléjicos, Toledo (Fecha: Abril-Junio 2011)

Colaborador en la Semana Internacional del Cerebro (Brain Awareness Week 2011), patrocinada por la fundación DANA y Federación Europea de las Sociedades de Neurociencia (FENS). Hospital Nacional de Parapléjicos, Toledo. (Fecha: 14-17/Marzo/2011)

