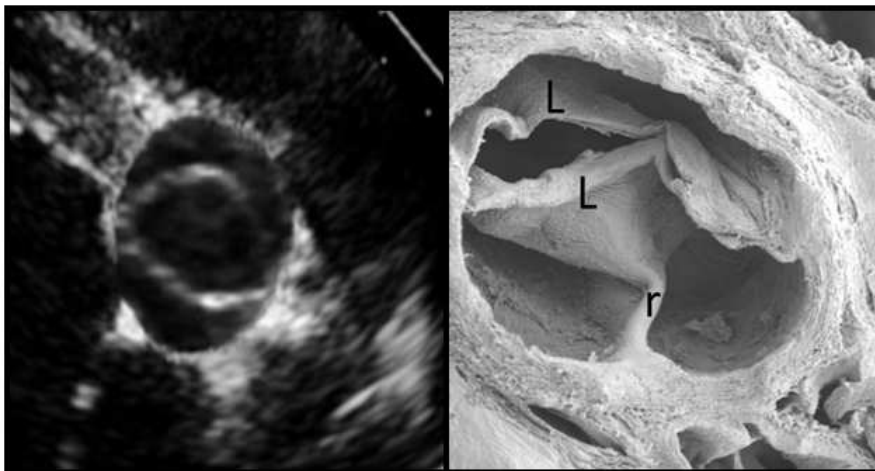


TESIS DOCTORAL POR COMPENDIO



MARCADORES MOLECULARES DE DILATACIÓN AÓRTICA ASOCIADOS A LA VÁLVULA AÓRTICA BICÚSPIDE EN PACIENTES Y UN MODELO ANIMAL



Doctorando


María del Carmen Rueda Martínez

Málaga, 2017



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: María del Carmen Rueda Martínez

 <http://orcid.org/0000-0002-3278-8475>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



**Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Animal**

**Programa de Doctorado: Cirugía, Nutrición y Obesidad:
Adquisición de Capacidades Técnicas, de Investigación y Desarrollo Profesional**

TESIS DOCTORAL POR COMPENDIO

**MARCADORES MOLECULARES DE DILATACIÓN AÓRTICA
ASOCIADOS A LA VÁLVULA AÓRTICA BICÚSPIDE EN PACIENTES Y UN
MODELO ANIMAL**

Doctorando

María del Carmen Rueda Martínez

Directores

Dr. Francisco de Borja Fernández Corujo

Dra. María Isabel Queipo Ortuño

Dr. Miguel Such Martínez

Málaga, 2017



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Dr. Francisco de Borja Fernández Corujo (Profesor Titular del Departamento de Biología Animal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga). **Dra. María Isabel Queipo Ortuño** (Investigadora Senior Miguel Servet) y **Dr. Miguel Such Martínez** (Profesor Asociado del Departamento de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga y Facultativo Especialista del Área de la UGC del Corazón y Patología Cardiovascular del Hospital Universitario Virgen de la Victoria) certifican que el trabajo de Tesis elaborado por la doctoranda **María del Carmen Rueda Martínez**, titulado “ *MARCADORES MOLECULARES DE DILATACIÓN AÓRTICA ASOCIADOS A LA VÁLVULA AÓRTICA BICÚSPIDE EN PACIENTES Y UN MODELO ANIMAL*” ha sido realizado bajo su supervisión y dirección y puesto que cumple todos los requisitos legales, autorizan su defensa pública y obtención del grado de doctora.

Málaga, Junio 2017

Dr. F. de Borja Fernández Corujo. Dra. M.I. Queipo Ortuño. Dr. M. Such Martínez

(Director)

(Codirectores)

AGRADECIMIENTOS

En un primer lugar, me gustaría agradecer al **Área del Corazón del Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga** por prestarme sus instalaciones en los laboratorios de Investigación Biomédica (IBIMA) para poder diseñar, desarrollar los experimentos que albergan esta tesis. Al Dr. Eduardo de Teresa Galván, por despertarme la curiosidad por la investigación en el área del corazón durante una clase de Master de Biomedicina Regenerativa impartida en la Universidad de Granada y al Dr. Manuel Jiménez Navarro por acogerme en su grupo de Investigación en el Área del Corazón dándome un espacio, las herramientas y materiales necesarios para poder desarrollar mi trabajo. A los pacientes sometidos a cirugía cardíaca, que a pesar de ser conscientes de la importancia de su intervención, han confiado en este estudio y en nosotros, al donarnos su tejido para poder afianzar y crear nuevos senderos para el estudio de esta enfermedad. En especial a los cirujanos cardíacos Dr. Carlos Porras, Dra. María José Mataró, Dra. Gemma Spín y mi codirector de tesis el Dr. Miguel Such Martínez, por su predisposición y colaboración para la recogida de las muestras de tejido aórtico procedentes de los pacientes y hacerme partícipe de la labor humana tan importante que desempeñan cada día.

De igual modo me gustaría agradecer al **grupo de Estudios Cardiovasculares en Vertebrados del Departamento de Biología Animal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga** por confiar en mí para el estudio genético del Modelo Animal de Hámster Syrio con Válvula Aórtica Bicúspide creado en este Departamento, y así sumarme a la gran trayectoria de este proyecto que lleva en activo más de 20 años. En especial agradecerle a la Dra. María Carmen Fernández y Dr. Alejandro López García por su predisposición y colaboración por cederme las muestras de aorta de los

hámsteres empleados en este estudio, a la Dra. Ana Carmen Durán por mostrarme siempre su amabilidad. En especial a mi director de Tesis, el Dr, Francisco de Borja Fernández Corujo, por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto, además de su apoyo científico y el apoyo anímico cuando ha sido necesario.

Agradecer a **mis compañeras de grupo**, las enfermeras de ensayos clínicos, Gloria y Alicia por estar ahí cuando las he necesitado y los ratillos de risas y complicidad que a veces eran necesario.

A mis compañeros del **Laboratorio de Investigación Biomédicas (IBIMA)**, del Hospital Universitario Virgen de la Victoria que a pesar de ser de Grupos de Unidades de Investigación diferentes muchas veces los he sentido como verdaderos compañeros. Agradecer a Alicia (Ali), por ayudarme en todos los aspectos tanto profesionales como personales y hacer que cada día fuera fácil para poder trabajar.

A las chicas Endocrino, Leticia, Mercedes, Lourdes, Rajaa y Adriana por estar siempre ahí y solventar dudillas de laboratorio. A Conchi y Lidia aunque hemos coincidido poco en mi último año, me ha encantado poder conocerlos. A mi codirectora de Tesis la Dra. María Isabel Queipo Ortuño por prestarme su sabiduría, su experiencia en el Área de la Biología Molecular y por sus revisiones científicas, además de convencerme cada día que estaba por el buen camino cuando mi yo interno discrepaba...

A los Chicos Endocrino, Fernando, Manuel, por su toque de humor y profesionalidad, a Will por su simpatía y sus charlas filosóficas de la vida que a veces me han hecho recapacitar, a Said por mostrarme siempre su simpatía.

A Juanillo, a parte de las muchas risas y conversaciones compartiendo la poyata, me faltarían líneas para poder agradecerle toda la vida, nunca mejor dicho mi vida, por remover al hospital entero cuando más lo necesitaba y darme sus ánimos y apoyo. Además agradecer al equipo que me operó por la sensación de cariño y tranquilidad antes de cerrar los ojos bajo efecto de la anestesia.

A las Chicas Onco, desde que entré en el laboratorio Stephi, Vanessa, Cristina, por su amistad y conversaciones de poyata a Rosario aunque no hemos coincidido mucho me alegro de haberte conocido.

A las chicas de Infeccioso, Isa y Carmen ha sido un placer poder conoceros y espero volver coincidir con vosotras algún día.

A mis queridos Tertulianos Ángela, Luis, Isa y Dani por esas comidas de conversaciones filosóficas y de historia interminables... por la experiencias, por las risas, por las lágrimas compartidas en definitiva por vuestra amistad, por vuestros conocimientos, por vuestra lealtad, y por demostrarme que cuando se cierra una puerta se abren cuatro grandes ventanas y que a pesar de estar separados, en mí, siempre tendréis vuestra casa. En definitiva agradecer a todos los que formáis este equipo humano, que siempre que vuelvo al laboratorio me hacéis sentir que vuelvo a casa.

A mi familia,

A mis abuelos Isabel y Manolo que desde pequeña estaban siempre cuidando de mí. Espero que allí donde estén, sigan haciéndolo.

A mis padres por darme la vida, por educarme y enseñarme en el bien, por apoyarme y ayudarme cada día en todos los proyectos que iniciados. Por enseñarme que con trabajo duro todo es posible. Agradecerle por darme el espacio y el tiempo para poder dedicarme a terminar este proyecto.

A mis hermanas Isabel y Mariana a ellas agradecerle por estar siempre cuando las necesito, apoyarme en todas mis decisiones y consolarme cuando ha sido necesario.

A Alberto, por apoyarme en todas mis aventuras, ya estuvieran a miles de kilómetros y por construir juntos nuestra familia. A mis hijos, Alberto y el recién llegado Álvaro porque este proyecto representa menos horas de juego y de dedicación a ellos.

A mi Maia, que ha sido la peor parada junto a mí, en esta locura acompañándome cada madrugada en el silencio frente al ordenador, cuando toda la casa descansaba.

En definitiva mis éxitos son sus éxitos.

INDICE

ESTRUCTURA DE LA TESIS DOCTORAL POR COMPENDIO.....2

INTRODUCCIÓN

A. LA VÁLVULA AÓRTICA BICÚSPIDE Y LA DILATACIÓN AÓRTICA.....4
 B. MARCADORES MOLECULARES DE DILATACIÓN AÓRTICA.....13
 C. EL MODELO DE HAMSTER CON VÁLVULA AÓRTICA BICÚSPIDE.....25
 D. EL HAMSTER COMO MODELO PARA DILATACIÓN AÓRTICA.....29

HIPÓTESIS.....32

OBJETIVOS.....35

RESUMEN GLOBAL DE LOS MÉTODOS, LOS RESULTADOS Y LA DISCUSIÓN

A. MÉTODOS.....39
 B. RESULTADOS.....53
 C. DISCUSIÓN.....88

CONCLUSIONES FINALES.....100

PUBLICACIONES

A. **Publicación 1:** *Selection of reference genes for quantitative real time PCR (qPCR) assays in tissue from human ascending aorta.....103*
 B. **Publicación 2:** *Fibrillin 2 is upregulated in the ascending aorta of patients with bicuspid aortic valve.....112*
 C. **Publicación 3:** *Identification of Reference Genes for Quantitative Real Time PCR Assays in Aortic Tissue of Syrian Hamsters with Bicuspid Aortic Valve.....120*

BIBLIOGRAFÍA.....137

ESTRUCTURA DE LA TESIS DOCTORAL POR COMPENDIO

Previamente autorizada la presente Tesis Doctoral por los Directores de Tesis, Dr. Francisco de Borja Fernández Corujo, Dr. Miguel Such Martínez y Dra. María Isabel Queipo Ortuño, la Doctoranda Dña. María del Carmen Rueda Martínez presenta esta Tesis Doctoral de acuerdo con el programa de doctorado correspondiente, como un compendio de tres trabajos previamente publicados. Las referencias de los artículos que dan forma al cuerpo de la presente Tesis Doctoral se detallan a continuación:

I. *Rueda-Martínez C, Lamas O, Mataró MJ, Robledo-Carmona J, Sánchez-Espín G, Jiménez-Navarro M, Such-Martínez M, Fernández B. Selection of reference genes for quantitative real time PCR (qPCR) assays in tissue from human ascending aorta. PLoS One. 2014 May 19;9(5):e97449. doi: 10.1371/journal.pone.0097449. eCollection 2014. PubMed PMID: 24841551; PubMed Central PMCID: PMC4026239.*

II. *Rueda-Martínez C, Lamas O, Mataró MJ, Robledo-Carmona J, Sánchez-Espín G, Moreno-Santos I, Carrasco-Chinchilla F, Gallego P, Such-Martínez M, de Teresa E, Jiménez-Navarro M, Fernández B. Fibrillin 2 is upregulated in the ascending aorta of patients with bicuspid aortic valve. Eur J Cardiothorac Surg. 2016 Sep 15.pii: ezw277. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27634926.*

III. *Rueda-Martínez C, Fernández MC, Soto-Navarrete MT, Jiménez-Navarro M, Durán AC, Fernández B. Identification of Reference Genes for Quantitative Real Time PCR Assays in Aortic Tissue of Syrian Hamsters with Bicuspid Aortic Valve. PLoS One. 2016 Oct 6;11(10):e0164070. doi: 10.1371/journal.pone.0164070. PubMed PMID:27711171.*

Así mismo, se ha considerado incluir otro trabajo, aún no publicado, que forma parte importante de la estructura de esta Tesis Doctoral.

IV. *Alteraciones moleculares en la pared de la aorta ascendente en el modelo de hámster con valvular aórtica bicúspide.*

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

A. LA VÁLVULA AÓRTICA BICÚSPIDE Y LA DILATACIÓN AÓRTICA

Desde el punto de vista funcional, la válvula aórtica regula el flujo de la sangre desde el ventrículo izquierdo a la aorta, impidiendo el flujo retrogrado de la sangre en cada diástole ventricular. Leonardo Da Vinci fue el primero en demostrar que el diseño tricúspide es el más eficaz para que la válvula aórtica realice de forma adecuada su función (Figura 1). Hoy en día se considera que este diseño es el ideal para el correcto funcionamiento de la válvula aórtica. Por esa razón, la válvula aórtica tricúspide (VAT) sigue estando sometida a una selección natural de carácter positivo (Férrandez et al., 2010).

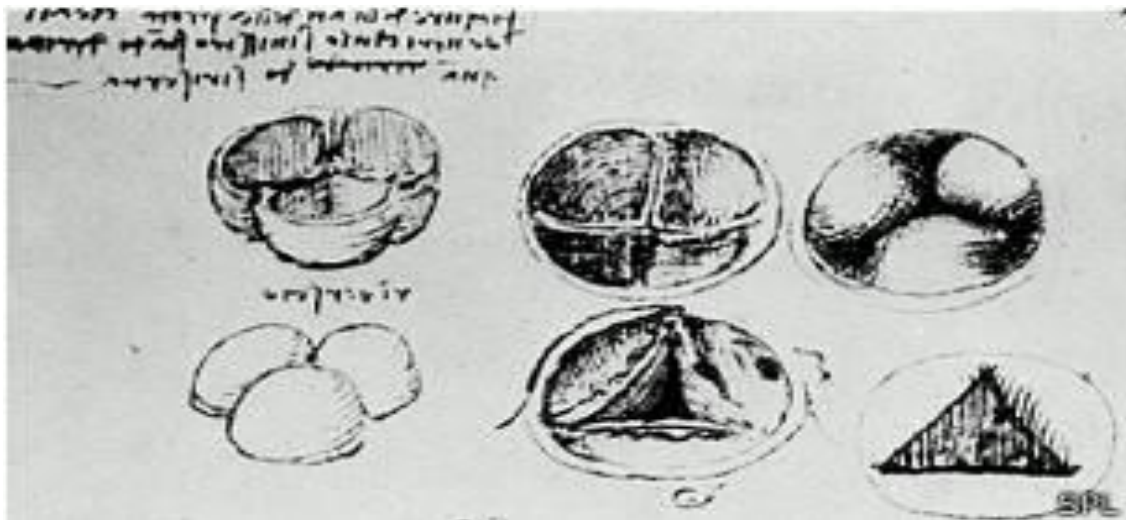


Figura 1: Representación del diseño tricúspide de la válvula aórtica realizada por Leonardo Da Vinci.

http://iche1.bbci.co.uk/news/ws/304/amz/worldservice/live/assets/images/2014/06/30/140630110443_leonardo_da_vinci_304x171_spl.jpg

La VAT está compuesta por tres cúspides o valvas, izquierda derecha y no coronaria, que tienen una apariencia semilunar y constituyen los componentes móviles de la válvula (Figuras 1 y 2). Cada valva está anclada a su correspondiente seno aórtico o seno de Valsalva mediante una línea parabólica. Los triángulos resultantes de esta

configuración anatómica se denominan triángulos intervalvares y los puntos de unión entre valvas adyacentes se conocen como comisuras. Las dos arterias coronarias derecha e izquierda nacen de los senos derechos e izquierdos respectivamente.

Se han descrito diferentes anomalías congénitas de las válvulas semilunares, entre las cuales, la válvula aórtica bicúspide (VAB) es la más común. La VAB presenta dos valvas, dos senos, dos triángulos intervalvares y dos comisuras, en lugar de las tres que presentan las válvulas normales, tricúspides (Figura 2).

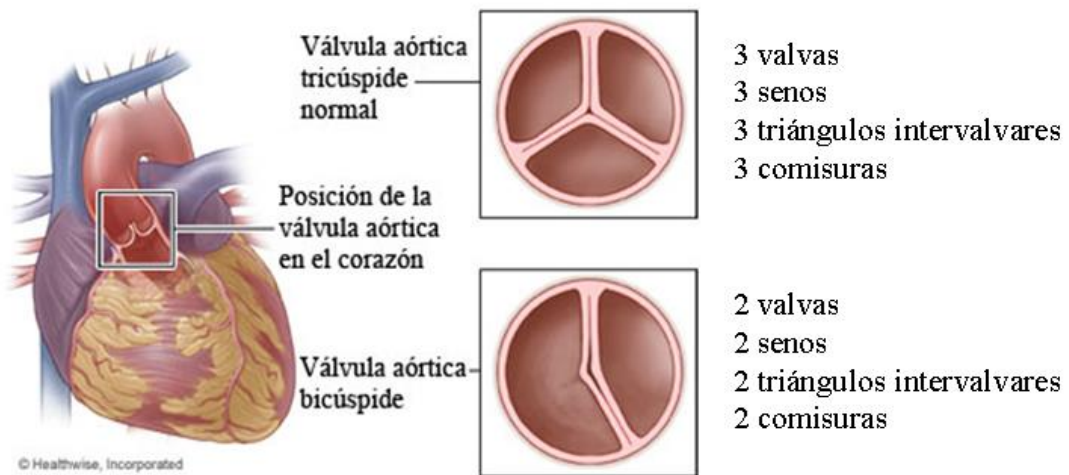


Figura 2: Posición anatómica (izquierda) y anatomía en visión craneal (derecha), de la válvula aórtica tricúspide (arriba) y la válvula aórtica bicúspide (abajo).

https://espanol.kaiserpermanente.org/static/health-encyclopedia/es-us/pi/media/medical/hw/s_h9991304_004_pi.jpg

La VAB es el defecto congénito del corazón más común en el ser humano, con una prevalencia de entre el 1 y el 2% de la población (Fedak et al., 2002). Aunque los individuos afectados pueden mantener una función valvular normal, suelen manifestar una serie de complicaciones en la etapa más tardía de su vida. Las más frecuentes son la estenosis valvular por calcificación distrófica, la regurgitación aórtica por endocarditis

infecciosa y la dilatación e incluso disección o ruptura de la aorta, haciendo de esta una enfermedad potencialmente letal (Tandros et al., 2009). En general, se ha estimado que la VAB es responsable de más morbilidad, mortalidad y de más complicaciones cardíacas, que la suma de los efectos combinados de todos los otros defectos congénitos del corazón (Ward et al., 2000).

Varios estudios han propuesto que la VAB sigue un patrón de herencia autosómica dominante con penetrancia incompleta. Sin embargo, se ha visto que esta enfermedad es predominante en el género masculino con un ratio respecto al género femenino de 3:1 (Basso et al., 2004; Tutar et al., 2005; Nistri et al., 2005). Se han descrito mutaciones en diversos genes (*NOTCH1*, *ACTA2*) asociadas a la VAB (Garg et al., 2005; Mohamed et al., 2006; Zhu et al., 2006; Guo et al., 2007; McKellar et al., 2007), pero aparecen en un reducido número de agrupaciones familiares, por lo que aun se desconocen los genes responsables de la mayoría de los casos de VAB. Las investigaciones realizadas en agrupaciones familiares humanas y en modelos animales sugieren que la VAB es el resultado de diferentes posibles etiologías (Padang et al., 2012; Prakash et al., 2014; Gharibeh & Nemer 2015).

Desde el punto de vista anatómico se han descrito diferentes tipos de VAB (A, B y C) según la posición de las valvas, los senos y las comisuras (Figura 3). En el tipo A, las valvas coronarias derecha e izquierda están anatómicamente fusionadas, de manera que existe una sola valva anterior y otra posterior. En los tipo B y C las dos valvas están una a la derecha y otra a la izquierda. Esta disposición es consecuencia de la unión de la valva coronaria derecha y de la valva no coronaria (tipo B) o de la valva izquierda y de la no coronaria (tipo C). En el tipo A, los orificios coronarios se localizan en la pared del seno aórtico que sostiene la valva anterior, mientras que en el tipo B y C las arterias

coronarias se originan en senos aórticos opuestos, izquierdo y derecho. El tipo de VAB mas frecuente es el A, con una incidencia de entre el 50 y el 80%, mientras que el menos frecuente es el tipo C, con una incidencia de alrededor del 2%. En muchas VABs hay septos más o menos desarrollados, denominados rafes, que se extienden desde la pared del seno de valsava hacia la valva. Los rafes suelen estar en las unidades valvulares (senos y valvas) fusionadas (Fernández et al., 2009; 2010).

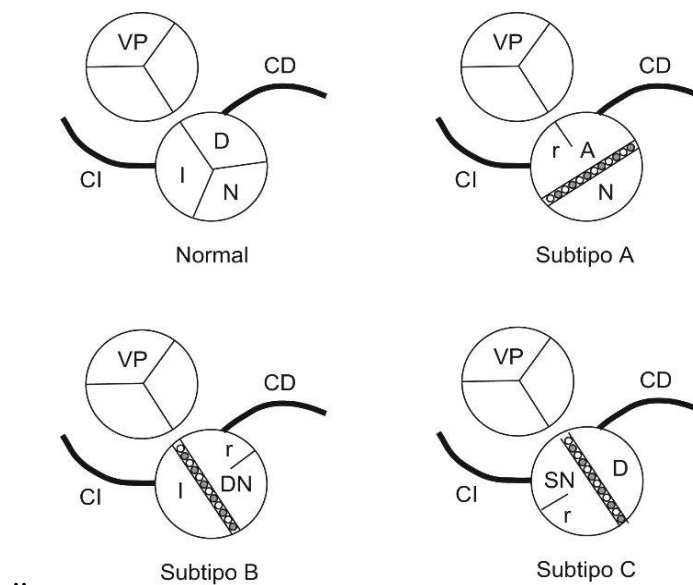


Figura 3: Esquema representativo de la VAT (normal) y de los tres tipos de VAB humanas (subtipo A, subtipoB y subtipo C). En las bicúspides, el seno y la valva anómalas suelen ser de mayores dimensiones que el seno y la valva normales. A: seno y valva anterior o dextro-sinistros; CD: arteria coronaria derecha; CI: arteria coronaria izquierda; D: seno y valva derechos; DN: seno y valva dextro-no coronarios; I: seno y valva izquierdos; N: seno y valva no coronarios; r: posición habitual del rafe cuando existe; SN: seno y válvula sinistro-no coronario; VP: válvula pulmonar.

<http://www.elsevier.es/ficheros/images/298/298v45n02/298v45n02-13150930fig1.jpg>

Hasta tiempos recientes se consideraba que los diferentes tipos anatómicos de VAB constituían meras variantes de un mismo defecto embrionario, sin mayor repercusión patogenética o clínica. Sin embargo, durante los últimos años se ha comprobado que los diferentes tipos de VAB, al menos los más frecuentes, los tipos A y B, son el resultado de diferentes defectos morfogénéticos, por lo que constituyen

entidades etiológicas distintas (Fernández et al., 2009). Además, el riesgo, severidad y tipo de complicaciones que pueden experimentar las VABs difieren en función del tipo anatómico (Russo et al., 2008; Schaefer et al., 2008; Fernandes et al., 2012; Della Corte et al., 2014; Ruzmetov et al., 2015).

Una de las complicaciones más comunes que aparece asociada a la enfermedad de la VAB es el aneurisma de la aorta o dilatación de la aorta (DA) (Tadros et al., 2009; Verma et al., 2014). La incidencia de la DA en la población ha incrementado en estas últimas décadas, debido al aumento de la esperanza de vida y al uso de nuevas tecnologías que han ayudado a una mejor detección de esta enfermedad (Tadros et al., 2009). La progresión continua de la dilatación de la aorta puede llegar a causar la disección o rotura de la arteria, provocando la muerte del individuo afecto (Fedak et al., 2002; Girdauskas et al., 2011).

Desde el punto de vista anatómico, la aorta se compone de los siguientes segmentos: la raíz aórtica, que incluye la válvula aórtica, hasta el límite seno-tubular; la aorta ascendente o tubular, desde el límite seno-tubular hasta la arteria innominada; el cayado aórtico, del que salen las arterias que irrigan la parte superior del cuerpo; la aorta torácica, desde el cayado aórtico hasta el diafragma, que irriga pulmones, esófago y los músculos intercostales; la aorta abdominal, por debajo del tórax, que conduce la sangre a la parte inferior del cuerpo (ver figura 4).

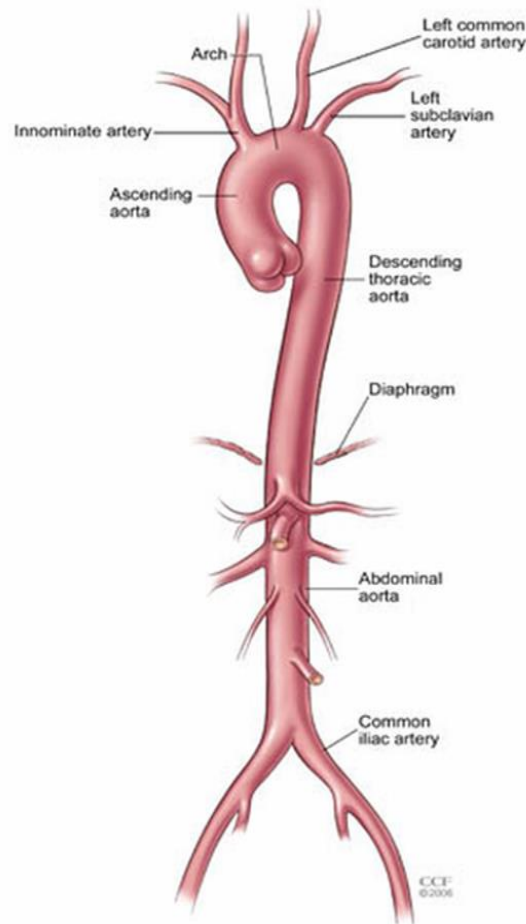


Figura 4: Representación de los diferentes segmentos que forman la aorta.

<http://biologia.laguia2000.com/wp-content/uploads/2013/03/aortaLG-214x300.jpg>

La pared de la aorta es gruesa y elástica, para aguantar la alta presión de la sangre que se recibe desde el corazón. Está organizada en tres capas; la íntima, la media y la adventicia. La capa más externa es la adventicia y esta compuesta por las fibras de colágeno y de elastina. La capa más interna está compuesta del revestimiento endotelial con su lámina basal y fibras de elastina formando la lámina elástica interna. La capa media está compuesta por fibras elásticas y de colágeno y está poblada principalmente por células musculares lisas vasculares (CMLVs), estas últimas tienen propiedades contráctiles y secretoras, asegurando la síntesis y reparación (homeostasis) de los componentes de la matriz extracelular (MEC). Estas propiedades de síntesis responden a señales bioquímicas reguladas principalmente por el factor de crecimiento

transformante ($TGF-\beta$). La unidad estructural y funcional básica de la media arterial es la lamela, compuesta por CMLVs entre dos capas de fibras de elastina a modo de sándwich, intercalada de fibras de colágeno, que con las microfibrillas y proteoglycanos forman la MEC de la media arterial. (El-Hamamsy et al., 2009; Hinton, 2012) (ver figura 5).

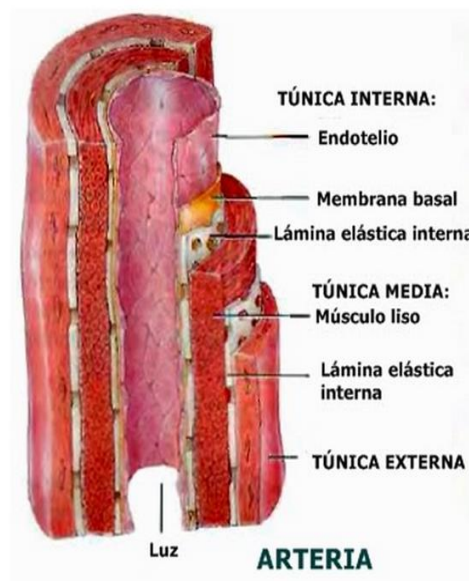


Figura 5: Representación de las capas que constituyen la pared de la aorta.

http://4.bp.blogspot.com/-ghjEffQ0I84/VB2yGb_VSZI/AAAAAAAAAJ2A/MhB2ohLKO9M/s400/Arteria.jpg

Se han propuesto dos hipótesis que explican la aparición de la aortopatía en la enfermedad de la VAB, la hipótesis hemodinámica y la hipótesis genética. La hipótesis hemodinámica propone que las válvulas aórticas bicúspides provocan un flujo turbulento excéntrico en la aorta ascendente, lo que produce un stress hemodinámico anormal que induce la dilatación de la arteria. La hipótesis genética propone que la alteración o alteraciones genéticas que conducen al desarrollo de VABs producen también anomalías estructurales en la pared aórtica que predisponen al desarrollo de

aortopatías. Estas dos hipótesis no son mutuamente excluyentes y, de hecho, actualmente, los expertos opinan que la mayoría de los casos de DA asociada a VAB son el resultado de la combinación de factores genéticos y hemodinámicos (Girdauskas et al., 2011; Hinton et al., 2012).

Ya en 1928, Abbott fue el primero que describió la asociación entre la VAB y la enfermedad de la aorta. Años más tarde, Mc Kusick et al. (1972) descubrió la base histopatológica de la DA asociada a la VAB, la necrosis cística de la media, que resulta en la degeneración acelerada de la capa media arterial. Durante las últimas décadas, numerosos estudios se han dirigido a identificar la fisiopatología y los mecanismos moleculares implicados en la degeneración de la media asociada a la VAB. A pesar de que se ha propuesto la implicación de diversas vías moleculares, aun no se conocen con exactitud los mecanismos implicados. La hipótesis más consistente propone que la DA asociada a la VAB es el resultado final de una regulación anormal de la vía de señalización de TGF- β de las CMLV de la media de la aorta, asociada al procesamiento anormal de la Fibrilina 1 (*FBNI*) y a la liberación y activación de las metaloproteasas (MMPs). El resultado sería una desregulación de la homeostasis tisular que conduciría a la fragmentación de las fibras elásticas de la media arterial, la apoptosis de las CMLVs y la acumulación de sustancia basófila en las áreas acelulares, comprometiendo la integridad y flexibilidad de la aorta como resultado final (Figura 6) (Fedak et al., 2002, 2003; Tadros et al., 2009; Siu et al., 2010; Verma et al., 2014).

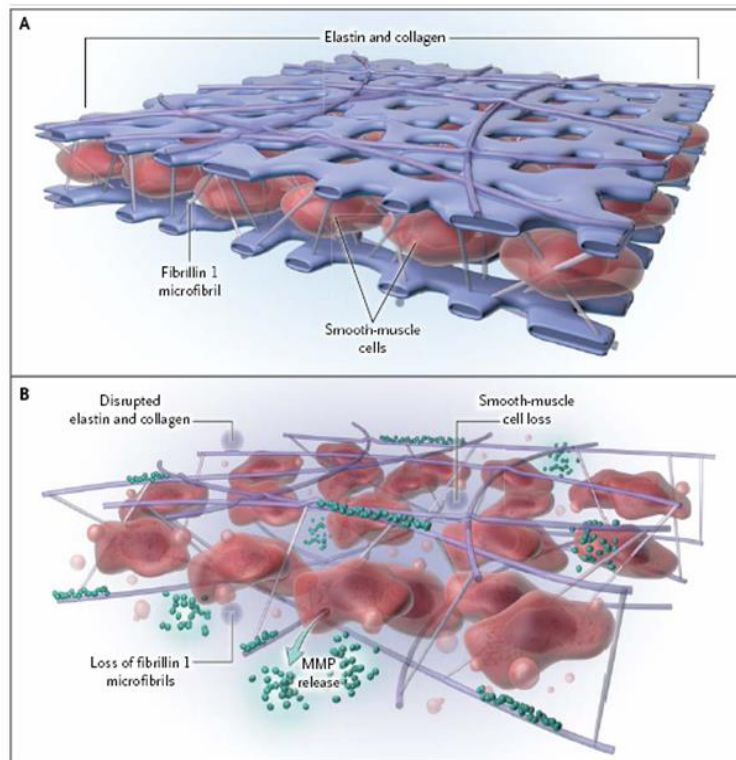


Figura 6: Modelo de patogénesis de la DA asociada a la VAB. (A) Esquema de los componentes de una lamela elástica normal en individuos con VAT. Las CMLVs se conectan con la matriz de elastina y de colágeno adyacente mediante las microfibrillas compuestas de *FBNI*. (B) En la aorta de los pacientes con VAB, las CMLVs pierden sus conexiones con la matriz elástica, secretan MMPs y mueren, perdiéndose la integridad de la matriz extracelular.

http://www.nejm.org/na101/home/literatum/publisher/mms/journals/content/nejm/2014/nejm_2014.370.issue-20/nejmra1207059/20140509/images/small/nejmra1207059_f2.gif

B. MARCADORES MOLECULARES DE DILATACIÓN AÓRTICA

La MEC es un entramado de moléculas, proteínas y carbohidratos, que se dispone en el espacio intercelular y que es sintetizada y secretada por las propias células. La composición molecular de la MEC es típica de cada tejido y sus componentes son renovados continuamente por las células que la producen. Entre otras funciones de la fisiología celular, la MEC mantiene la adhesión celular para formar tejidos, aporta propiedades mecánicas a los tejidos, mantiene la forma celular, permite la comunicación intercelular, forma sendas por las que se mueven las células, regula la diferenciación y la fisiología celular y secuestra factores de crecimiento que modulan una variedad de eventos de desarrollo y de homeostasis (Lockhart et al., 2011).

Diversas líneas de evidencia apuntan a una desregulación de la homeostasis de la MEC vascular como base patogenética de la DA asociada a la VAB (Fedak et al., 2002, 2003; Siu et al., 2010; Tandros et al., 2009; Ikonomidis et al., 2012). A continuación se presentan algunas moléculas (Fibrilinas, Metaloproteasas, Óxido nítrico sintasa endotelial y Factor de crecimiento transformante) que se consideran actualmente marcadores moleculares de la DA asociada a la VAB, ya que diversos estudios han mostrado su participación en la fisiopatología de la aortopatía (Fedak et al., 2002, 2003; Ikonomidis et al., 2007; Wilton et al., 2008; Tzemos et al., 2010; Boyum et al., 2004; Aicher et al., 2007; Lee et al., 2000; Pannu et al., 2005; Matt et al., 2008; Hillebrand et al., 2014; Naito et al., 2016).

FIBRILINAS

Las Fibrilinas (FBNs) son uno de los componentes principales que forman las microfibrillas de la capa media arterial (ver figura 7). Las microfibrillas son heterogeneas en su composición. Los componentes integrales y asociados de las microfibrillas incluyen la superfamilia de FBNs y las proteínas de unión a TGFβ latentes, así como las familias estructuralmente únicas de fibulinas, emilinas, glicoproteínas asociadas a microfibrilas y proteínas asociadas a microfibrilas. En la aorta, las microfibrillas se asocian con elastina en la túnica media para formar las láminas concéntricas que separan las capas individuales de las CMLV y que confieren elasticidad a la pared aórtica.

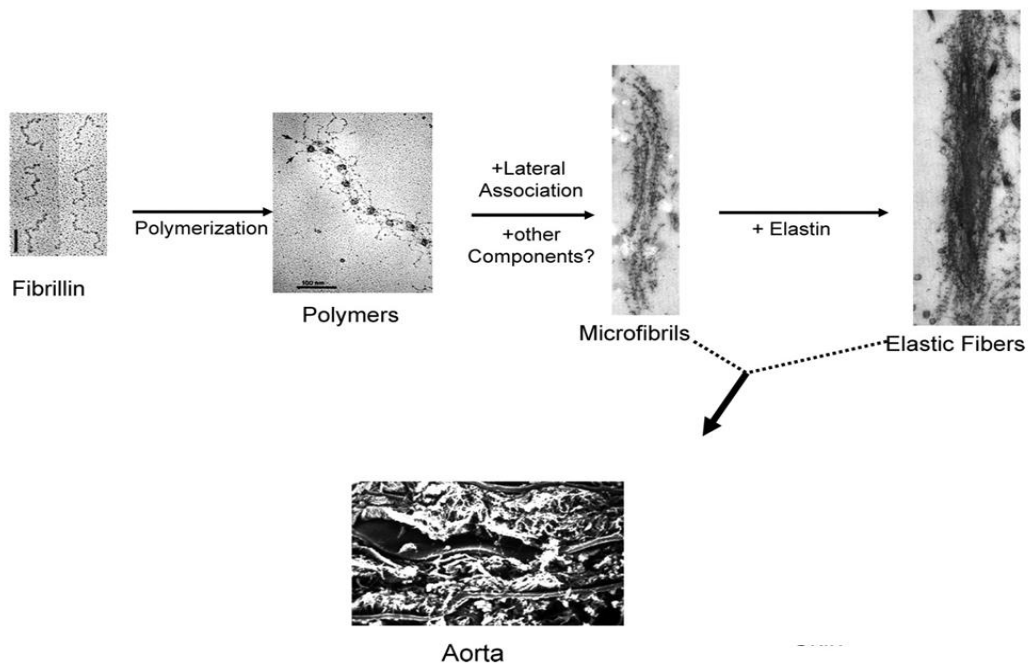


Figura 7: Representación esquemática de los pasos principales del montaje de microfibrillas y fibras elásticas en tejido aórtico.

<http://physiolgenomics.physiology.org/content/physiolgenomics/19/2/151/F1.medium.gif>

Las FBNs interactúan con varios de los componentes de la MEC como la elastina, el colágeno, la fibronectina y la vitronectina (Ramirez et al., 2004). Junto al colágeno y la elastina, las FBNs son el componente estructural más abundante de la capa media de la aorta (El-Hamamsy et al., 2009).

Se conocen varias isoformas de FBNs, la más estudiada es la FBN1 (ver figura 8). Esta glucoproteína es un componente estructural que forma un enrejado alrededor de las fibras elásticas contribuyendo así a la fuerza mecánica de la pared de la aorta. Además tiene un papel crucial en la regulación de la actividad de factores de crecimiento como el TGF- β , mediante su secuestro en la MEC (El-Hamamsy et al., 2009).

El síndrome de Marfan es causado por mutaciones en el gen que codifica a la *FBNI* (Robison et al., 2000). Además, Fedak et al. (2003) mostraron deficiencias en los niveles de *FBNI* en la aorta ascendente de pacientes con VAB. Se ha comprobado que existen múltiples similitudes entre la aortopatía asociada al síndrome de Marfan y la asociada a la VAB, tanto a nivel clínico como histopatológico y molecular. Dado que la FBN1 ayuda al manteniendo de la integridad estructural de la capa media arterial, aportando el anclaje de las CMLV a la matriz de elastina y de colágeno, se ha propuesto que la pérdida de microfibrillas asociada a defectos en la FBN1 podría separar las CMLV de los componentes de la matriz, provocando apoptosis y desorganización de la matriz, perdiéndose la integridad estructural de la media arterial (Fedak et al., 2002). Además, se sabe que deficiencias de FBN1 en la MEC aumenta la actividad de las Metaloproteasas (MMPs), lo que aumentaría el efecto degenerativo (Fedak et al., 2003).

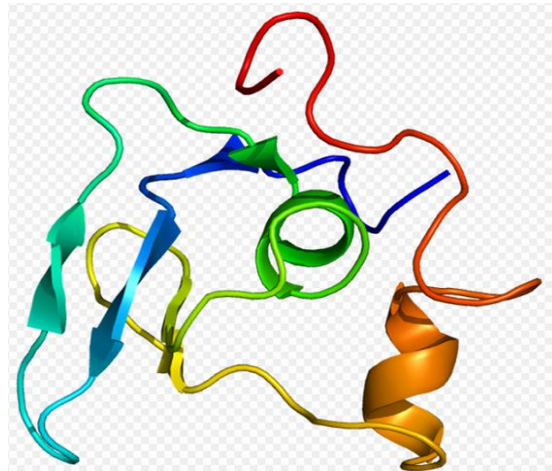


Figura 8: Estructura de la proteína de la FBN1

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/95/Protein_FBN1_PDB_1apj.png

La FBN2 es menos conocida (ver figura 9). Está implicada principalmente en la morfogénesis de la aorta durante el periodo fetal (Zhang et al., 1994) y se desconoce su implicación real en la homeostasis de la pared aórtica adulta. Mutaciones en *FBN2* causan la enfermedad denominada aracnodactilia congénita contractural (Putnam et al., 1995; Wang et al., 1995) y el inicio temprano de la degeneración macular (Ratnapriya et al., 2014), pero no causa anomalías vasculares. Estos indicios sugieren que las diferentes isoformas de fibrilina tienen bien definido su papel en tejidos específicos.

Se ha estudiado la expresión de los genes de la *FBN1* y *FBN2* durante el desarrollo embrionario de ratones y ratas. En la mayoría de los tejidos, los transcritos de *FBN2* aparecían antes y se acumulaban durante cortos periodos de tiempo comparados con los transcritos de *FBN1* (Zhang et al., 1994; 1995). La síntesis de FBN1 se correlaciona con morfogénesis tardía y con la aparición de la estructura definitiva de los órganos, mientras que por el contrario, la síntesis de FBN2 coincide con morfogénesis temprana y el inicio de la elastogénesis (Zhang et al., 1994). Zhang et al. (1995)

propusieron que la FBN1 proporciona principalmente soporte estructural, mientras que FBN2 regula el proceso temprano de montaje de la fibra elástica.

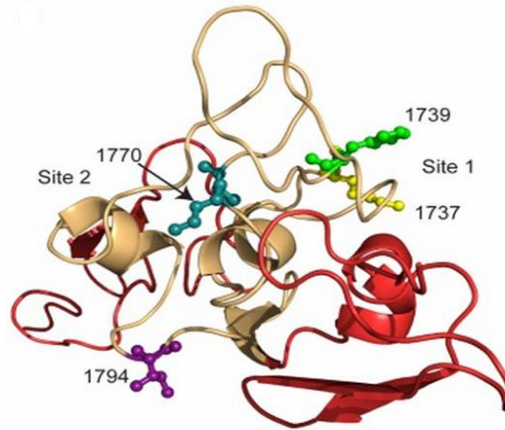


Figura 9: Estructura de la proteína FBN2

https://www.researchgate.net/profile/Stuart_Cain2/publication/232975785/figure/fig2/AS:216418852315149@1428609683079/A-Sequence-alignment-of-human-fibrillin-1-and-fibrillin-2-TB5-indicating-the.png

METALOPROTEASA

Las MMPS constituyen una serie de familias de enzimas que están implicadas en los procesos de degradación, remodelación y procesamiento de las proteínas de la MEC y de las moléculas de adhesión, bajo condiciones fisiológicas y patológicas (Raffetto et al., 2008). Son producidas por una variedad de células incluyendo las CMLV, fibroblastos y células inflamatorias, en respuestas a la inflamación, al estrés oxidativo, a los productos de degradación de la matriz o a los incrementos de actividad del TGF- β del tejido conectivo (kim et al., 2004). Las MMPs causan la degradación de la matriz directamente por proteólisis. Los TIMPs son los inhibidores endógenos de las MMPs, que actúan directamente por unión e inactivación (Raffetto et al., 2008, El-Hamamsy et al., 2009). Actualmente se conocen 23 MMPs en tejido humano, de las cuales se ha

propuesto la implicación de MMP2 y MMP9 en la patogénesis de las enfermedades vasculares (Apte et al., 2015; Longo et al., 2002; Naito et al., 2016).

MMP2

La MMP2, también conocida como gelatinasa A (ver figura 10), está involucrada en la degradación de la ECM, relacionada tanto con procesos fisiológicos normales, tales como el desarrollo embrionario, la reproducción y la remodelación de tejidos, como con procesos de enfermedad. Se secreta de forma inactiva y es activada cuando se escinde por una proteinasa extracelular. MMP2 degrada principalmente la elastina. A diferencia de la mayoría de los miembros de su familia, la activación de MMP2 puede ocurrir en la membrana celular. Esta enzima puede ser activada extracelularmente por proteasas o intracelularmente por su S-glutatioación, sin necesidad de eliminación proteolítica del pro-dominio. Se cree que MMP2 está involucrada en múltiples procesos biológicos, incluyendo funciones en el sistema nervioso, descomposición menstrual endometrial, regulación de la vascularización y metástasis (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4313>).

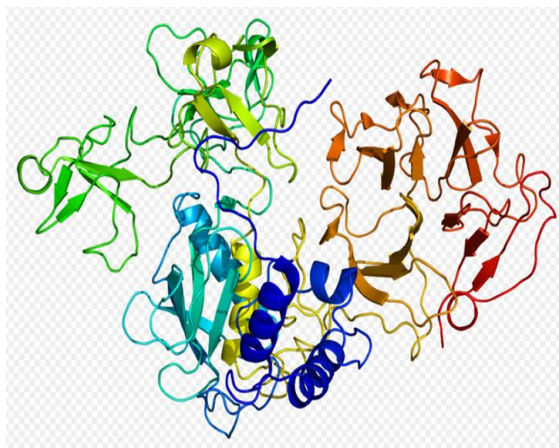


Figura 10: Estructura de la enzima MMP2

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d2/Protein_MMP2_PDB_1ck7.png/250px-Protein_MMP2_PDB_1ck7.png

MMP9

La MMP9, también conocida como gelatinasa B, también está involucrada en la degradación de la MEC tanto en procesos fisiológicos normales como en procesos de enfermedad, como artritis y metástasis. También MMP9 se secreta como proproteína inactiva que se activan cuando se escinden por proteinasas extracelulares. A diferencia de MMP2, MMP9 degrada los colágenos tipo IV y V.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4318>)

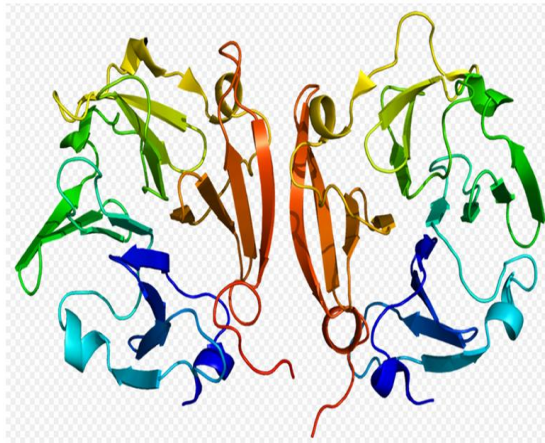


Figura 11: Estructura de la enzima MMP9

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/f4/Protein_MMP9_PDB_1itv.png/250px-Protein_MMP9_PDB_1itv.png

Algunos estudios han mostrado un incremento de la expresión de MMP 2 y 9 en pacientes con DA, incluyendo pacientes con VAB (koullias et al., 2004; (Barbour et al., 2007). Sin embargo, se ha observado una marcada heterogeneidad en la expresión de las MMPs entre aneurismas con etiologías distintas. Esto se ha achacado a la diferente localización de las muestras de aorta en los diferentes estudios, a la diferente edad de los pacientes, a las diferentes severidades de los aneurismas, al género

(masculino/femenino) y a la presencia de complicaciones cardiacas como la estenosis y la regurgitación en los pacientes incluidos en los estudios (El-Hamamsy et al., 2009).

Hay una gran variedad de estudios y no todos ellos coinciden con los resultados de la expresión de las MMPs. Algunos estudios han mostrado una expresión incrementada de MMPs (koullias et al., 2004; Boyum et al., 2004; Wang et al., 2016), mientras que en otros se ha observado una reducción de la expresión de MMP2 (Schmoker et al., 2007) o no se han encontrado diferencias significativas en la actividad de las MMPs entre pacientes con VAB y VAT (Mohamed et al., 2012 & Ikonomidis et al., 2013). Debido a la falta de unanimidad en los resultados de la expresión de las MMPs sería necesario crear protocolos para futuros estudios.

OXIDO NITRICO SINTETASA ENDOTELIAL

La oxido nitrico sintetasa endotelial (eNOS), también conocida como NOS3, (ver figura 12) es una enzima que, a partir de la L-arginina, sintetiza el óxido nítrico (NO), que participa en diversos procesos biológicos. La eNOS es principalmente responsable de la generación de NO en el endotelio vascular, que desempeña un papel crucial en la regulación del tono vascular y la proliferación celular. También tiene efectos antitrombóticos y afecta a la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular y la agregación plaquetaria, por lo que se puede decir que NO tiene una función protectora en el sistema cardiovascular. También se sabe que tiene propiedades antioxidantes, ya que reduce la formación de aniones superóxido induciendo así la expresión de la superóxido dismutasa. El NO es un radical libre reactivo que actúa como mediador biológico en varios procesos, incluyendo la neurotransmisión además de participar en

varias como son las actividades antimicrobianas y las antitumorales. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4846>).

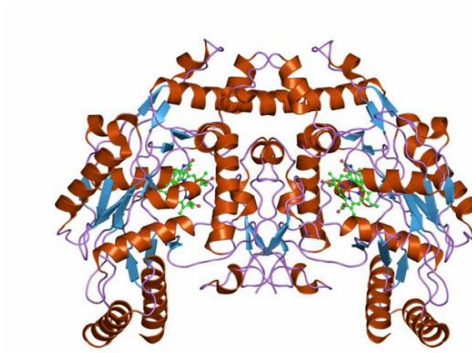


Figura 12: Estructura de la proteína eNOS

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/de/PDB_1m9j_EBL.jpg/250px-PDB_1m9j_EBL.jpg

Diversas líneas evidencian la implicación del eNOS en el desarrollo de la enfermedad de la VAB. Por un lado, Lee et al. (2000) demostraron que los ratones deficientes en eNOS eran propensos al desarrollo de VAB. Por otro lado, los estudios realizados en pacientes, han demostrado que existe una desregulación de eNOS en la aorta aneurismática de pacientes con VAB (Aicher et al., 2007; Mohamed et al., 2012; Grewal et al., 2014; Henn et al., 2014).

FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE

El TGF- β 1 es una proteína (ver figura 13) perteneciente a la superfamilia de factores de crecimiento transformante beta de las citoquinas. Este es sintetizado por muchos tipos celulares y casi todos ellos tienen receptores específicos para reconocerlo. Es una proteína de secreción que regula de manera autócrina o parácrina varios procesos

como son el control del crecimiento celular, la proliferación celular, la diferenciación celular y la apoptosis (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7040>).

El TGF- β tiene un papel central en la morfogénesis cardíaca y vascular y en el mantenimiento de la homeostasis de la MEC (Goumans et al., 2009). Además de participar en la síntesis de la MEC, estimulando la producción de elastina y colágeno, también participa en su degradación induciendo el incremento de la MMP2 y 9 (Kim et al., 2004).

Los mecanismos de acción y regulación de la expresión de TGF- β son complejos y aún no se comprenden del todo. Sin embargo, se ha comprobado que la FBN1 actúa como un potente regulador de la biodisponibilidad del TGF β (Isogai et al., 2003). Una reducción o mutación del gen *FBNI* implica una mayor actividad de la TGF β y por lo tanto una mayor liberación de las MMPs (Kim et al., 2004).

Todas las isoformas del TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3) actúan a través de los mismos sistemas de receptores de señalización. El TGF- β 1 fue el primer miembro de la familia en ser descubierto en plaquetas humanas. Esta proteína actúa sinérgicamente junto con la TGF-alfa en la inducción de la tumorigénesis. Los ligandos de TGF- β se unen a diversos receptores que conducen al reclutamiento y activación de factores de transcripción de la familia SMAD que regulan la expresión génica (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7040>).

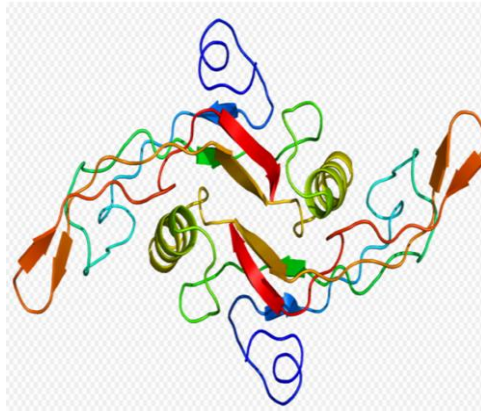


Figura 13: Estructura de la proteína de Tgf- β

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/16/Protein_TGFB1_PDB_1kla.png/245px-Protein_TGFB1_PDB_1kla.png

El TGF- β afecta al remodelado de la MEC vascular, de tal manera que una desregulación de su señalización puede alterar la estructura y la composición de la MEC (Pannu H et al., 2005). Una excesiva activación de la TGF- β contribuye a las manifestaciones pleiotropicas de síndrome de marfan, incluidas la dilatación y disección de la aorta. Matt et al. (2008) mostraron una correlación significativa entre la concentración de TGF- β y el diámetro de la aorta en un modelo murino de síndrome Marfan. Por otra parte, se ha comprobado que mutaciones en el receptor de TGF- β son responsables de la predisposición hereditaria de aneurisma de la aorta torácica y disecciones familiares en el 5% de los casos (Pannu H et al., 2005).

Hillebrand et al. (2014) mostraron elevadas concentraciones circulantes de TGF- β 1 en pacientes con VAB y en grupos con mutaciones en *NOTCH1* y *FBNI*. Varios autores han propuesto el uso de TGF- β 1 como un marcador valioso para los síndromes aórticos genéticos como es en el caso de la aortopatía asociada a la BAV (Naito et al., 2016).

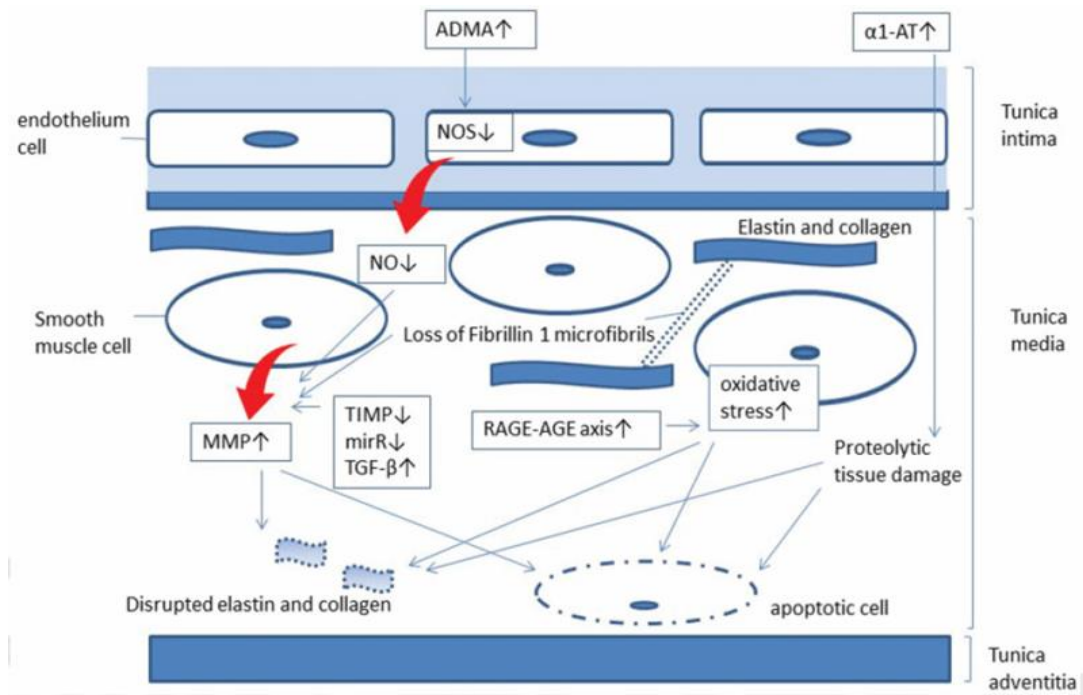


Figura 14: Vías moleculares y marcadores ponteciales en la aortopatía en pacientes con VAB.

<https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-0036-1583525>

C. EL MODELO DE HÁMSTER CON VÁLVULA AÓRTICA BICÚSPIDE

El modelo hámster con VAB constituye el único modelo animal espontáneo de VAB congénita aislada, no sindrómica, es decir, no asociada a otras malformaciones cardíacas o extracardíacas. Se trata de una cepa consanguínea (cepa T) de hámsteres sirios (*Mesocricetus auratus*), desarrollada en el Departamento de Biología Animal de la Universidad de Málaga, que presenta una incidencia relativamente alta (~40%) de VAB del tipo A. La cepa T se originó a partir de una pareja de animales adquiridos de un proveedor local a finales de los años 80 del siglo XX. Tras más de 30 generaciones de cruces endogámicos, se ha establecido una cepa isogénica, con un coeficiente de consanguinidad superior al 99%, en la que, por definición, los animales son genéticamente idénticos, es decir, se comportan como clones (Festing, 1979, 1993).

La mayoría de los estudios realizados sobre el modelo hámster se han centrado en la anatomía, histomorfología, embriología y herencia de la VAB (Sans-Coma et al., 1992, 1993, 1994, 1996, 2005, 2012; Franco et al., 1994; Fernández et al., 2009, 2012). A continuación se hace un compendio de los hallazgos que pueden considerarse relevantes para discutir los resultados de la presente tesis.

Los primeros estudios con el modelo hámster pusieron de manifiesto que la morfología valvular, al menos en lo que se refiere a las alteraciones en el número de sus componentes, no constituye un carácter discreto (VAT vs. VAB), sino un carácter de variación continua, cuyos morfotipos conforman un continuo morfológico que representa diversos grados de severidad de la malformación (Sans-Coma et al., 1993). Esta noción, que ya había sido apuntada por Waller et al., en 1973, es ampliamente

aceptada actualmente, también para el hombre (Sievers & Schmidtke, 2007; Collins et al., 2008; Mangini et al., 2010; Sperling & Lubat, 2015). Los estudios en el modelo hámster mostraron que, como cabía esperar para un carácter de variación continua, la VAB sigue un patrón de herencia complejo, probablemente poligénico con expresividad variable y penetrancia incompleta (Sans-Coma et al., 1993, 2012). Diversos estudios sobre agrupaciones familiares de pacientes afectados han constatado que el patrón hereditario de la VAB humana es similar al descrito para el hámster (Huntington et al., 1997; Cripe et al., 2004; Ellison et al., 2007; Loscalzo et al., 2007; McBride et al., 2011; Robledo-Carmona et al., 2013). Aunque los hámsteres de la cepa T no desarrollan las complicaciones (valvulopatías y aortopatías) asociadas a la VAB y comunes en el ser humano, la similitud entre la anatomía y la herencia de la VAB en ambas especies, además de su aparición espontánea en el hámster, ha hecho que la cepa T se considere un modelo fiel y bien establecido de la VAB aislada humana (Laforest & Nemer, 2012; Della Corte et al., 2014; Prakash et al., 2014; Mathieu et al., 2015).

Como ya se ha comentado, las VABs en el modelo hámster son del tipo A o antero-posterior, es decir, con fusión anatómica de las valvas derecha e izquierda (en inglés “R-L fusion”). Este es el tipo anatómico de VAB predominante en la especie humana (~70%), seguido del tipo B (~25%; fusión de valvas derecha y no coronariana) y del C (~5%; fusión de valvas izquierda y no coronariana). En la cepa T también han aparecido VABs del tipo B, aunque de manera esporádica, con una frecuencia similar a la de otras cepas control, mientras que las del tipo C nunca se han detectado. Estudios recientes, aún no publicados, realizados a base de cruzamientos híbridos entre animales de diversa cepas, indican que la o las mutaciones responsables del desarrollo de VAB en este modelo predisponen a la formación de VABs exclusivamente del tipo A. Es decir,

en este modelo no parece haber modificadores genéticos, factores ambientales o epigenéticos que influyan en el morfotipo de la VAB, sino que los factores causales son específicos de VABs tipo A.

En el año 2000, se publicó un estudio que mostraba que una proporción relativamente alta de ratones mutantes (knockout) deficientes en la proteína eNOS presentaba VAB (Lee et al., 2000). Años más tarde se comprobó que la VAB de los ratones deficientes en eNOS era del tipo B y que el defecto embrionario responsable era diferente al de los hámsteres con VAB tipo A (Fernández et al., 2009). En el modelo hámster, la VAB tipo A se forma por un defecto en la septación del tracto de salida cardiaco embrionario, inducido por el comportamiento anómalo de las células de la cresta neural cardiaca, mientras que en los ratones mutantes para eNOS, la VAB tipo B se forma por un defecto en la formación de los cojines endocárdicos del tracto de salida cardiaco embrionario, producto de anomalías en el proceso de transformación endocardio-mesénquima (Fernández et al., 2009). Durante la última década, se han identificado nuevas cepas de ratones mutantes con alta incidencia de VAB en las que, tanto los defectos genéticos responsables como los mecanismos morfogenéticos implicados difieren sustancialmente (Biben et al., 2000; Macatee et al., 2003; Laforest et al., 2011; Thomas et al., 2012; Phillips et al., 2013; Makki et al., 2012; Bosse et al., 2013; Dupuis et al., 2013; Akerberg et al., 2015; Quintero-Rivera et al., 2015; Wang et al., 2015). Esta serie de estudios constituyen pruebas experimentales de la elevada variabilidad de etiologías que puede presentar la VAB. Los estudios genéticos y clínicos en pacientes ya hacían sospechar de esta variabilidad, habida cuenta del elevado número de genes, regiones cromosómicas, malformaciones, síndromes y presentaciones clínicas asociados a la VAB (Abdulkareem et al., 2013; Michelena et al., 2014). Se puede

concluir que la enfermedad de la VAB tiene múltiples posibles etiologías y que el modelo hámster debe representar a una población de pacientes con una etiología específica, relacionada con alteraciones en las células de la cresta neural cardiaca.

D. EL HÁMSTER COMO MODELO PARA LA DILATACIÓN AÓRTICA

Como se ha comentado en el capítulo anterior, la cepa T de hámsteres se considera actualmente un modelo bien establecido de la VAB no sindrómica humana (Laforest & Nemer, 2012; Della Corte et al., 2014; Prakash et al., 2014; Mathieu et al., 2015). Aunque se ha comprobado que la morfología valvular de los hámsteres se asocia con algunas anomalías en el origen de las arterias coronarias (Sans-Coma et al., 1991; Fernández et al., 2000; Durán et al., 2006), displasia de las valvas (Franco et al., 1994) y focos de cartílago (Sans-Coma et al., 1994, 2005), no se han detectado dilataciones conspicuas de la aorta ascendente.

La cepa T es el resultado de sucesivos cruces endogámicos (entre hermanos) durante más de 30 generaciones, para los que se han seleccionado aquellos individuos con progenitores portadores de VAB. Se planteó la hipótesis de que la ausencia de dilatación aórtica en los animales de esta cepa se debiera a que a lo largo de las generaciones se seleccionara, junto a los alelos responsables de la VAB, otros alelos que confirieran resistencia a la dilatación. Para falsar esta hipótesis se utilizaron los cruzamientos híbridos descritos en el capítulo anterior destinados a identificar alelos modificadores del fenotipo valvular. La idea consistía en segregar, mediante cruzamientos con animales de otras cepas, los alelos responsables de la VAB, de los hipotéticos alelos responsables de la resistencia a la dilatación. Se comprobó que la VAB aparecía, con una incidencia variable, en animales híbridos con fondos genéticos mixtos. Sin embargo no se detectó ningún caso de dilatación aórtica, a pesar de que el estudio se centrara en animales viejos. Estos datos permiten refutar la hipótesis propuesta y sugieren que la ausencia de dilataciones aórticas en el modelo hámster se debe a diferencias inter-específicas entre el hámster sirio y la especie humana.

En el campo de la biología cardiovascular son frecuentes los casos de diferencias inter-específicas entre el ser humano y los roedores en cuanto a su propensión a padecer determinadas enfermedades. Por ejemplo, el ratón de laboratorio es poco propenso al desarrollo de lesiones ateroscleróticas, incluso cuando se somete a dietas hipercolesterolémicas (Carmeliet et al., 1998). Con estos antecedentes y sobre la base de los resultados obtenidos con los hámsteres híbridos, se planteó la hipótesis de que el modelo de hámsteres con VAB puede presentar el sustrato histopatológico de la DA, pero no desarrollar la enfermedad debido a la baja propensión de esta especie a la aortopatía. Para falsar esta hipótesis, se decidió realizar un estudio anatómico, histomofológico y molecular de la aorta ascendente de los hámsteres de la cepa T, de manera comparada con una cepa control. Los resultados preliminares sugirieron la existencia de diferencias en la estructura histológica de la aorta entre animales de las cepas T y control. Estos resultados se presentaron en el congreso anual de la Sociedad Española de Cardiología (Fernández et al., 2014). A continuación se completaron los estudios histomorfológicos y se realizaron los estudios moleculares, consistentes estos últimos en el análisis de la expresión de algunos genes relevantes en el contexto de la aortopatía, en la aorta de los animales de las cepas T y control. Este último estudio, aunque aun no publicado, se ha incluido en la presente tesis doctoral, constituyendo el Objetivo 4 y la Publicación 4.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

1. Dado que 1) los genes de referencia “housekeeping” son necesarios para normalizar los datos de expresión génica procedentes de PCR a tiempo real y 2) los genes de referencia empleados hasta ahora en los estudios sobre la expresión génica en la aorta de pacientes con VAB y/o DA, no han sido validados correctamente, proponemos que el uso de programas informáticos específicos para la identificación de genes de referencia, como son el geNorm, NorFinder y Bestkeeper, puede ser útiles para la identificación de los genes de referencia más adecuados para estudios sobre expresión génica en la aorta humana y aorta de hámster.

2. Diversas líneas de evidencia indican que las proteínas Fibrilina 1 y Metaloproteasas 2 y 9 están implicadas en el desarrollo de DA asociada a la VAB. Proponemos que la cuantificación de la expresión de estos genes en la aorta de pacientes con DA y/o VAB, mediante PCR a tiempo real con genes de referencia validados, puede ayudar a confirmar su participación en el desarrollo de la aortopatía. En esta misma línea, proponemos investigar la participación de la Fibrilina 2, cuya expresión no se ha estudiado hasta el momento en el contexto del aneurisma aórtico.

3. Aunque el modelo de hámsteres con VAB no presenta aortopatías, los estudios preliminares indican que los animales de esta cepa muestran alteraciones histológicas en la media aórtica. Planteamos la hipótesis de que la cepa de hámsters afectos puede ser un buen modelo animal para estudiar los factores moleculares que predisponen a la aortopatía asociada a la VAB. Para falsar esta hipótesis e indagar en los mecanismos moleculares de la DA, proponemos la cuantificación de la expresión de los genes *Nos3*,

Mmps (*Mmp9* y *Mmp2*), Fibrilinas (*Fbn1* y *Fbn2*) y *Tgf-β* en la aorta de hámsteres de distintas cepas, edades y morfologías valvulares, mediante PCR a tiempo real con genes de referencia validados.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los estudios que configuran la presente tesis doctoral constituyen la primera fase de una estrategia experimental, destinada a identificar biomarcadores moleculares de la DA asociada a la VAB, que puedan contribuir al esclarecimiento de su fisiopatología y que puedan servir como marcadores diagnóstico o pronóstico de la enfermedad. Esta estrategia se inició merced a la colaboración entre dos grupos de investigación asociados, el Grupo de Estudios Cardiovasculares en Vertebrados del Departamento de Biología Animal de la Universidad de Málaga y el Área del Corazón del Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga. El primero cuenta, como se ha comentado en capítulos precedentes, con el único modelo animal espontáneo de VAB no sindrómica. El segundo cuenta con un servicio de Cardiocirugía que realiza cada año una media de 110 cirugías de raíz aórtica y recambio valvular y/o de aorta ascendente.

El objetivo principal de esta primera fase experimental consiste en estudiar la expresión de diversos genes, relevantes en el ámbito de la aortopatía, en aortas procedentes de pacientes afectos y hámsteres del modelo de VAB. La intención es, por una parte, esclarecer la participación de algunos de estos genes en el desarrollo de la aortopatía y comprobar si esta participación implica alteraciones en su expresión génica. Por otra parte, se pretende validar el modelo animal para estudios sobre la DA asociada a la VAB y comprobar si existe un paralelismo con los pacientes en cuanto a las alteraciones en la expresión génica.

La metodología básica empleada ha sido la comparación de la expresión génica mediante la cuantificación de transcritos específicos utilizando la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). Un paso clave en esta técnica es la

normalización con genes de referencia o “housekeeping”, que permite comparar la concentración de transcritos específicos entre muestras, evitando la variabilidad intrínseca derivada de diferencias en las cantidades iniciales de muestra, en la extracción y transcripción del ARN, en la síntesis de ADNc, etc. Los genes de referencia se caracterizan por tener niveles de expresión constantes, independientemente del estado fisiológico de los tejidos. Aunque existen varios genes de referencia de uso común en muchos experimentos de RT-qPCR (p.ej. *GAPDH*, *ACTB* o *18S*), numerosos estudios han demostrado que estos genes muestran niveles de expresión variable dependiendo del estado fisiológico de las células, lo que obliga a validar su estabilidad en el tejido y condición fisiológica a investigar. Actualmente, se aconseja validar los genes de referencia en todos los estudios en los que se emplea RT-qPCR. Sin embargo, atendiendo a la bibliografía disponible, la práctica totalidad de los estudios sobre expresión génica diferencial en tejido aórtico, en el contexto de la DA, han utilizado genes de referencia no validados. En consecuencia, para la presente tesis, como paso previo al estudio de la expresión de genes específicos en la aorta de pacientes y animales, se procedió a la identificación de genes de referencia adecuados. Para ello se utilizaron tres softwares (geNorm, NormFinder y Bestkeeper), considerados hoy día como “gold estándar” para este propósito.

A continuación se detallan los objetivos específicos de la presente tesis:

1. *Identificación de genes de referencia adecuados para estudios de expresión génica diferencial en tejido aórtico de pacientes con dilatación aórtica asociada a válvula aórtica bicúspide.*
2. *Identificación de genes de referencia adecuados para el estudio de la expresión génica diferencial en tejido aórtico de hámsteres con válvula aórtica bicúspide.*

3. *Estudio de la expresión génica de los genes Metaloproteasa- 2, Metaloproteasa-9, Fibrilina 1 y Fibrilina 2 en la aorta de pacientes con válvula aórtica normal o bicúspide y aorta normal o dilatada..*

4. *Estudio de la expresión génica de los genes Metaloproteasa-2, Metaloproteasa-9, Fibrilina 1, Fibrilina 2, Factor de crecimiento transformante beta y Óxido nítrico sintasa 3 en la aorta de hámsteres adultos y viejos con válvula aórtica normal o bicúspide.*

**RESUMEN GLOBAL DE LOS MÉTODOS,
LOS RESULTADOS Y LA DISCUSIÓN**

RESUMEN GLOBAL DE LOS MÉTODOS, LOS RESULTADOS Y LA DISCUSIÓN

A. MÉTODOS

La metodología principal empleada para la realización de la presente tesis se basa en la cuantificación de transcritos mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa (q) a tiempo real (RT) o RT-qPCR. Previamente a la aplicación de esta técnica hay que realizar la extracción de ARN del tejido experimental y su retro-transcripción a ADNc. La técnica de qPCR consiste en la amplificación de secuencias de interés utilizando cebadores específicos, obteniéndose así una curva de amplificación, que representa el aumento de la concentración de ADNc por cada ciclo de amplificación, a partir de la cual se estimará la concentración inicial del transcrito.

A continuación se explican algunos pasos de las técnicas empleadas que, por su complejidad, requieren una atención especial para comprender de manera apropiada el método general. Además, se detallan algunas partes del protocolo experimental que, por falta de espacio, no pudieron tratarse en las publicaciones correspondientes.

La primera clave para obtener buenos resultados con la técnica de la RT-qPCR es contar con un buen método de extracción de ARN, con la suficiente cantidad y calidad para su correcta retrotranscripción, amplificación y cuantificación. Así pues, la primera fase del presente estudio consistió en la puesta a punto de la metodología necesaria para la correcta extracción del ARN procedente de tejido de la aorta. Los

principales problemas que hubo que solventar fueron la dureza y la elasticidad del tejido aórtico y la cantidad limitada de tejido en cada muestra.

En los experimentos con tejido humano se utilizó el Kit de mirVana Paris, (Ambion, Alemania) para favorecer una adecuada extracción del ARN y el β -mercaptoethanol para prevenir la digestión del ARN mientras se procede la lisis celular. Para mejorar el proceso de disgregación y homogeneización del tejido de la muestra, se utilizaron el homogeneizador IKA ultra- turrax T10B básico (LABOTAQ, España) y el Ultra-Sonicador Sonifier Liquid processor 150D (Branson, USA). También se empleó una jeringuilla estéril de insulina, por la cuál se hizo pasar la muestra varias veces, con el fin de terminar de romper los posibles restos celulares. Todas estas técnicas de homogenización y de disgregación se hicieron bajo campana de flujo laminar, cámara de extracción de gases y en frío.

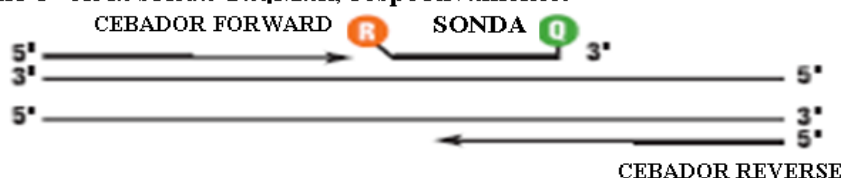
En los experimentos con tejido de hámster se empleó el Kit de Minikit Rneasy (Quiagen, Alemania) para la extracción de ARN y la Proteinasa K para mejorar la digestión de las proteínas del tejido aórtico. En el hámster, el tejido aórtico era aún más elástico y por lo tanto más difícil de disgregar. Además, el tamaño de la muestra obtenida de la aorta era más pequeño que en el caso de los pacientes. Para mejorar el procedimiento de disgregado y homogeneizado del tejido se emplearon las mismas técnicas que para las aortas humanas. Se añadió un paso que consistió en el triturado de las muestras de tejido con bisturí estéril para favorecer los procesos de disgregación y homogeneizado.

Tanto en los experimentos con tejido humano como de hámster se obtuvo poca cantidad de ARN por muestra. Por ello, para la aplicación de la técnica de RT-qPCR, se emplearon, para el caso de las muestras humanas, las sondas Taqman, ya que una de las ventajas de estas sondas, a parte de su alta especificidad, es que no requieren una alta concentración de muestra.

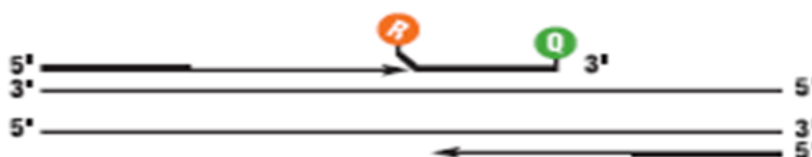
Las sondas Taqman están diseñadas de manera que hibriden con una región específica de ADN, que va a ser amplificada por un par de oligonucleótidos específicos. A medida que la Taq polimerasa sintetiza la cadena en sentido 3'-5', la actividad exonucleasa 5'-3' de esta misma enzima degrada la sonda TaqMan ya hibridada al ADN. La degradación de la sonda separa el fluoróforo, permitiendo así la emisión de fluorescencia. La fluorescencia detectada es directamente proporcional a la cantidad de fluoróforo liberado y, por lo tanto, a la cantidad de ADN de interés presente en el producto de PCR (ver figura 1).

SONDAS TAQMAN

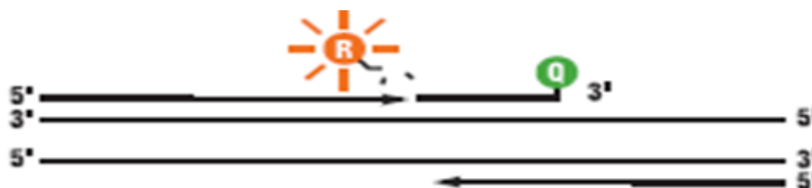
1. **Etapa de Polimerización:** Un marcador fluorescente (fluoróforo) y un quencher (desactivador de fluorescencia) son unidos al extremo 5' y al extremo 3' en la sonda TaqMan, respectivamente.



2. **Desplazamiento de la Hebra:** Cuando la sonda está intacta, la emisión de fluorescencia está desactivada



3. **La escisión:** Durante el ciclo de extensión, la ADN polimerasa escinde el fluoróforo desde la sonda



4. **La polimerización completada:** Una vez separada del desactivador, el fluoróforo emite su fluorescencia.

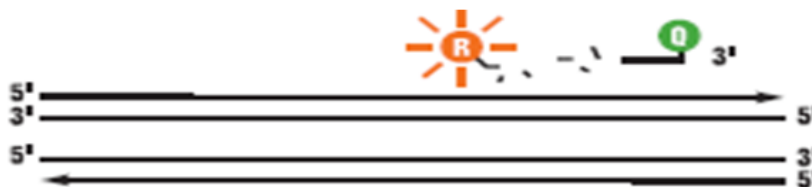


Figura 1: Flujo de trabajo de la sonda Taqman

<https://encryptedtbn2.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcR0bcKBUQSrsoaaXE2GjmNRJsnT81fyPixw0s9x3OGbrR4awogZ1Q>

En el caso de las muestras de hámster, para solventar el problema de la baja cantidad de ARN, se procedió a juntar varias muestras de aorta de hámster del mismo grupo de edad y de sexo. Otro inconveniente fue el diseño de las sondas a emplear para la PCR cuantitativa a tiempo real, ya que las secuencias de los amplicones de interés no

aparecían en artículos previamente publicados, por lo que la mayoría de sondas hubo que diseñarlas con el programa de Primer-Blast. En este caso, para realizar la PCR cuantitativa a tiempo real, se utilizó FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche, USA). Éste es un fluoróforo que se usa como marcador y se une a cada nueva copia de ADN de doble cadena que se amplifica durante la técnica de PCR cuantitativa, por lo que el resultado es un aumento de intensidad de la fluorescencia proporcional a la cantidad de producto de PCR producido, pudiéndose cuantificar la cantidad de ADN inicial (ver figura 2).

FLUOROFORO SYBR GREEN I

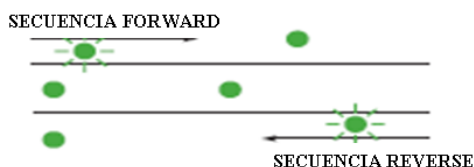
1. Función de la Reacción: El SYBR Green I emite fluorescencia cuando se une a ADN de doble cadena.



2. Etapa de Desnaturalización: Cuando el ADN es desnaturalizado, el SYBR Green es liberado y la fluorescencia es drásticamente reducida



3. Etapa de Polimerización: durante la extensión, los cebadores se unen y se genera el producto de la PCR.



4. Etapa de Polimerización completada: Cuando se completa la polimerización SYBR Green se une a la doble cadena del producto de ADN y se observa un incremento de la fluorescencia.

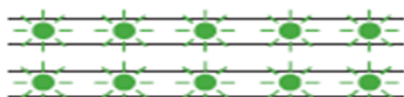


Figura 2: Flujo de trabajo de la sonda Sybr Green I

http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/portal/documents/web_content/cms_052221.png

Para la RT-qPCR, la cuantificación, tanto si se utiliza SYBR Green o Taqman, se basa en que la fluorescencia obtenida es directamente proporcional a la cantidad de ADN de doble cadena presente en la reacción de amplificación. La curva de amplificación que se obtiene de esta reacción muestra una morfología típica sigmoidal que se divide en tres fases que se detallan a continuación (ver figura 3):

Fase I, se corresponde con la fase de latencia donde no se observa ningún tipo de amplificación.

Fase II, se corresponde con los primeros ciclos en los que se detecta fluorescencia y sigue un comportamiento exponencial. La pendiente de la curva en esta fase se denomina eficiencia de amplificación que, ideal o teóricamente sería $E=2$.

Fase III, se corresponde con la fase estable donde la concentración de ADN no aumenta más de forma exponencial y finalmente llega a una meseta, donde el valor de $E=1$.

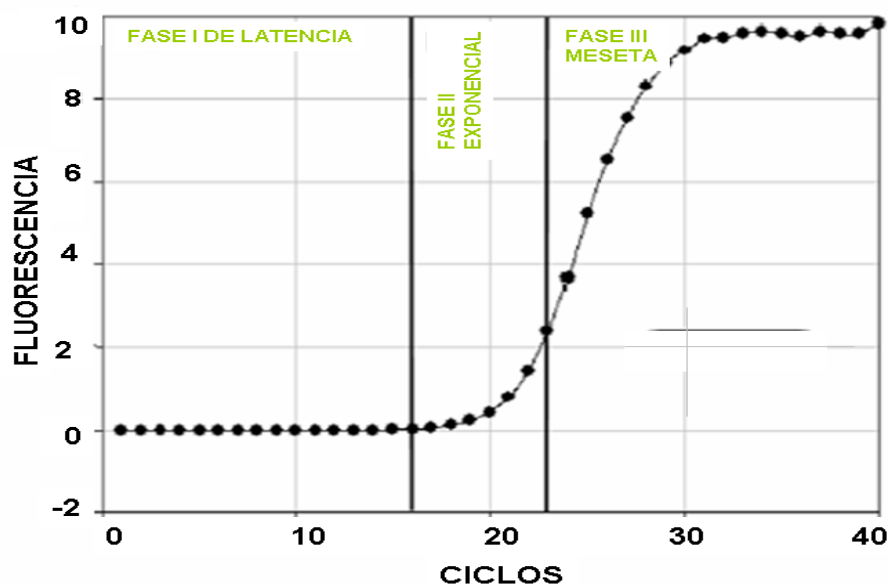


Figura 3: Fases de la amplificación

<http://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-8-131>

Un paso crucial para estimar la concentración de transcritos utilizando la técnica de la RT-qPCR, es el cálculo de la eficiencia de amplificación de cada gen. Este paso, además, nos permite comprobar que el ensayo de PCR ha sido ejecutado de forma correcta. En teoría, para que la eficiencia de amplificación sea máxima, el número de copias de moléculas de ADN deben duplicarse en cada ciclo de la PCR, dando un valor de eficiencia igual a 2 o el 100%. El rango del valor de la eficiencia de amplificación varía entre el valor 1, cuando no ha ocurrido amplificación y el valor 2, cuando se ha duplicado la concentración de ADN en cada ciclo. Lo normal es que en condiciones experimentales, debido a errores de pipeteo, variación de la temperatura ambiental, etc, el valor de la eficiencia de amplificación nunca llegue al valor máximo de 2. Para la presente Tesis Doctoral, la eficiencia de amplificación fue determinada para todos los genes de estudio.

Actualmente, para poder estimar la Eficiencia de Amplificación, hay dos métodos empleados:

1) **Método de las diluciones seriadas.** Este método requiere hacer una serie de diluciones seriadas de una muestra y múltiples reacciones de PCR. Posteriormente, para cada dilución, se realiza una regresión lineal desde la cuál se obtiene la eficacia media (ver figura 4). Este método es solo válido si los valores Ct son medidos desde la fase exponencial de la reacción de la PCR y si la eficiencia es idéntica entre amplificaciones

$$E=10^{-1/\text{pendiente}}$$

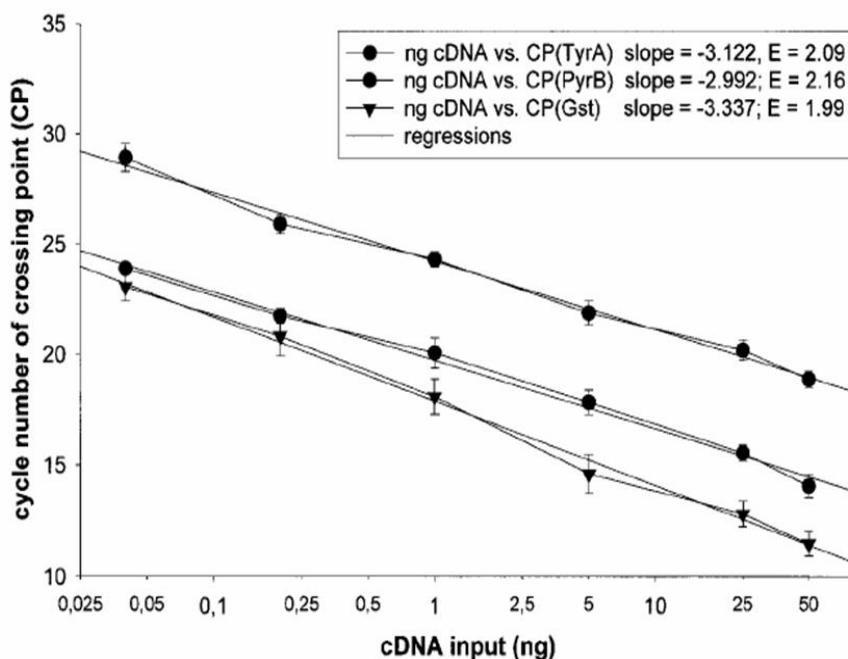


Figura 4: Representación grafica de las diluciones seriadas en la estimación de la eficiencia de amplificación. El rango de ADNc inicial fue desde 0,40 a 50 ng para n=3, las cuales muestran una alta linealidad, con un coeficiente de Pearson de $r > 0,95$

www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC55695/pdf/gne045.pdf

El programa LinRegPCR es el método actualmente más utilizado para estudiar la eficiencia de amplificación en los experimentos de RT-qPCR. El programa se basa en la ecuación que se detalla a continuación, en la cuál se asocia el valor de la eficiencia con cada producto de la reacción. El LinRegPCR identifica la fase exponencial de la reacción por el trazado de la fluorescencia en escala logarítmica, luego realiza una regresión lineal permitiendo la estimación de la eficiencia en cada reacción de PCR.

$$\text{Log } N_c = \log N_0 + c \cdot \log E$$

Debido a las posibles variaciones que se pueden obtener, el método de las diluciones seriadas fue descartado para el cálculo de las eficiencias de amplificación en el presente estudio. Los datos obtenidos desde la PCR cuantitativa a tiempo real, fueron

utilizados para el análisis a través del programa LinReg PCR. Así se obtuvieron los valores de las eficiencias medias de amplificación y los coeficientes de correlación medios para cada gen estudiado.

El método más común para estimar la concentración inicial de transcritos a partir de la curva de amplificación es el método de delta Ct (ΔCt), donde Ct es el número de ciclos necesario para obtener un cierto nivel de fluorescencia. Este nivel de fluorescencia, determinado por el observador, establece un valor umbral, que se corresponde con una concentración para cada transcrito.

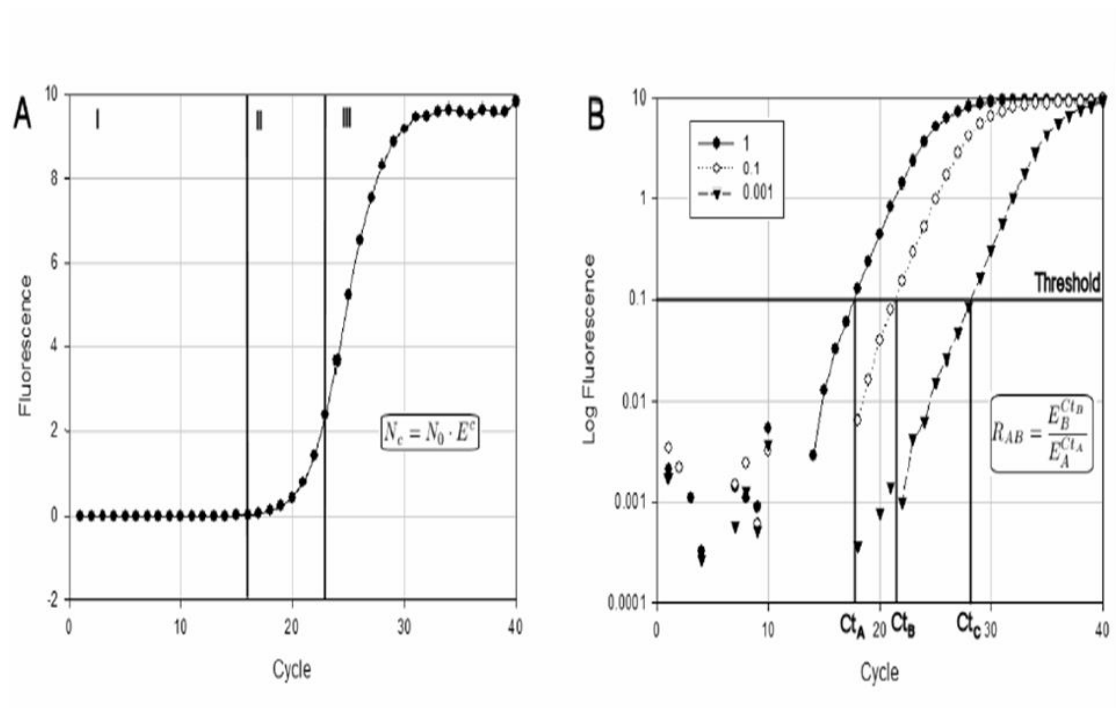


Figure 5: Representación grafica del calculo de la eficiencia de amplificaron por eL software LinRegPCR

<http://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-8-131>

En la imagen de la izquierda de la figura 5 se pueden observar las 3 fases de la reacción de amplificación en escala lineal, con la típica curva sigmoideal. En la fase II se puede observar la amplificación exponencial del ADN que ocurre entre los ciclos 16 y 23. En la imagen de la derecha se puede visualizar la fase de amplificación

correspondiente a la porción lineal de la curva, donde el valor del umbral se cruza con la porción lineal de la curva logarítmica, definiendo así el valor del ciclo umbral, conocido con las siglas en inglés (Ct). La ecuación de la imagen de la derecha nos muestra la dinámica durante la fase II de la amplificación.

A continuación se detalla cómo se obtiene la fórmula para calcular la concentración relativa de los genes de interés.

En la figura 5 (izquierda) aparece la fórmula que representa la curva de amplificación:

$$N_c = N_0 \times E^c$$

N_c = cantidad de transcrito en un ciclo determinado de la fase II

N_0 = cantidad inicial de transcrito

E = eficiencia de amplificación

A partir de ésta se plantea la fórmula de la concentración relativa de un transcrito que aparece en la figura 5 (derecha):

$$N_c = N_0 \times E^c \Rightarrow N_0 = N_c / E^c$$

Si tomamos el ciclo del valor umbral ($c = q$)

$$N_0 = N_q / E^q$$

La concentración relativa del transcrito de un gen A respecto a un gen B será:

$$R_{AB} = N_{0A} / N_{0B} = N_q / E^{CtA} / N_q / E^{CtB} \Rightarrow N_{0A} / N_{0B} = E^{CtB} / E^{CtA}$$

El método ΔCt asume que todas las eficiencias de amplificación son máximas ($E = 2$) o al menos igual en todas las reacciones. Por lo tanto:

$$R_{AB} = 2^{(CtB - CtA)} = 2^{-\Delta Ct}$$

El método ΔCt asume que todas las eficiencias de amplificación son máximas ($E = 2$) o al menos son iguales en todas las reacciones. Es decir, no se tienen en consideración las posibles variaciones que ocurren entre unas secuencias y otras, ya que se asume que estas variaciones son mínimas cuando todas las reacciones se llevan a cabo a la vez y en las mismas condiciones. Se calcula la diferencia de valores entre el

valor Ct del gen diana y el valor Ct del gene de referencia, por lo que al menos los dos genes deben ser amplificados con valores de eficiencias similares para que esta comparación sea adecuada. En la presente tesis se utilizo el método del delta Δ Ct para determinar los niveles de expresión de los genes experimentales o diana normalizados con un gen de referencia.

Como se ha explicado en un capítulo anterior, la normalización es el método mas adecuado para asegurar una correcta cuantificación de los datos obtenidos a partir de la PCR cuantitativa a tiempo real. Este método permite “tamponar” las posibles diferencias en las cantidades iniciales de muestra, en la extracción de ARN, así como en la integridad del ARN, la síntesis de ADNc, entre las propias células o tejidos analizados, en las temperaturas ambientales, etc, que pueden afectar a la variabilidad experimental, permitiendo así poder comparar las concentraciones de ARNm entre diferentes muestras. El uso de genes de control interno también conocidos con el nombre de genes de referencias o genes “housekeeping” es el método más adecuado y el más empleado para la normalización de datos de la PCR cuantitativa a tiempo real. Para que un gen sea definido como control interno, su expresión no debería variar en el tejido o células de estudio, tiene que tener un nivel constante de expresión independientemente del tratamiento experimental y diseños realizados.

Para identificar los genes de referencias que posteriormente se emplearon para la normalización de los niveles de expresión de nuestros genes experimentales, se utilizaron tres software ampliamente citados. Estos softwares se consideran el “gold standar” entre los métodos de identificación de genes de referencia y sus características generales se detallan a continuación:

1. El programa geNorm. Es un software que utiliza los datos brutos obtenidos de la PCR cuantitativa a tiempo real mediante una aplicación de Microsoft Excell. Este software determina, a partir de un grupo de genes candidatos para genes de referencia, cual de ellos es el más estable. El software también calcula el Factor de Normalización de expresión génica para cada muestra de tejido, basándose en la media geométrica de un definido número de genes de referencia.

El algoritmo de GeNorm calcula la expresión de dos valores, **M** y **V**. **M** representa la estabilidad, que no debe sobrepasar del valor 1.5. **V** es el valor promedio de variaciones de todos los genes estudiados, lo que nos va a indicar cuantos genes son necesarios para utilizarlos en el factor de Normalización. El valor de corte de **V** es de 0.15, por debajo de este valor no se requiere ningún otro gen de referencia adicional para el factor de normalización.

A continuación se detallan algunas de las fórmulas que utiliza el programa geNorm para la transformación de los datos.

Ecuaciones de la delta- Ct para la transformación de valores Ct a cantidades relativas con el mayor nivel de expresión. Aquí se detalla como los valores brutos procedentes de la PCR a tiempo real son transformados en cantidades (**Q**) para poder introducirlos en el programa y este pueda calcular los valores **M** de estabilidad.

- (1) $Q = E^{\Delta Ct}$
 (2) $Q = E^{(minCt - sampleCt)}$

Q = Cantidad de muestra en relación con la muestra de mayor expresión.
 E = Eficiencia de Amplificación.
 minCt = menor valor de Ct= al valor Ct de la muestra con mayor expresión.

(3) $SD Q = E^{\Delta Ct} \cdot \ln E \cdot SD \text{ samples Ct}$

LnE= logaritmo natural de la eficiencia de amplificación.

SD sample Ct = desviación estándar de los valores Ct de las muestras replicadas.

Para el Cálculo del factor de Normalización para n genes de referencia, geNorm utiliza las formulas matemáticas que se detallan a continuación. FNn (Factor de Normalizaron) y SD NFn (la desviación estándar del factor de normalización) son los valores obtenido a partir de la formulas empleadas por genNorm

$$NF_n = \sqrt[n]{gen\ REF_1 \cdot GEN\ REF_2 \cdot gen\ REF_3 \dots gen\ REF_n}$$

$$SD\ NF_n = NF_n \cdot \sqrt{\left(\frac{SD\ REF_1}{n \cdot REF_1}\right)^2 + \left(\frac{SD\ REF_2}{n \cdot REF_2}\right)^2 + \dots + \left(\frac{SD\ REF_n}{n \cdot REF_n}\right)^2}$$

2. El programa NormFinder. Es un algoritmo que identifica, a partir de una serie de genes candidatos, el gen óptimo para la normalización. Los genes candidatos son clasificados de acuerdo a su estabilidad, basándose en las muestras del estudio y en el diseño experimental. NormFinder emplea un sistema estadístico para estimar, no solo la variación global de expresión de los genes candidatos, sino también la variación entre

subgrupos de las muestras. NormFinder proporciona el valor de estabilidad de cada gen (M), el cual es medido directamente, para la estimación de la variación de la expresión. NormFinder no permite usar directamente los valores Ct obtenidos desde la PCR cuantitativa a tiempo real, por lo que hay que utilizar una curva estándar o el método delta Ct para transformar los valores Ct a la expresión de cantidades en escala lineal.

3. El programa Bestkeeper. Es un software que se emplea como herramienta para la identificación de los genes de referencia más estables por medio de un análisis de correlación por parejas de los genes candidatos. Bestkeeper calcula para cada gen candidato los siguientes estadísticos descriptivos: la media geométrica de los valores los Cp o Ct, la media de los valores Cp, el valor mínimo y máximo de Cp, los valores de la desviación estándar y el coeficiente de variación. Además, este software calcula el coeficiente de correlación de cada gen de referencia con el valor “índice de Bestkeeper” junto con el valor de probabilidad, el cuál indica la significación obtenida de los coeficientes de correlación. Los genes de referencia que dispongan de valores de correlación altos y tengan una baja desviación estándar son combinados dentro del índice (factor de normalización), usando la media geométrica de los valores Cq. Este programa identifica como genes de referencia más estables aquellos que muestran valores de coeficientes de variación y valores de desviaciones estándar más bajos. Los genes de referencia que obtengan valores de desviaciones estándar mayores que el valor 1 son desechados.

B. RESULTADOS

En este apartado se describen los principales resultados obtenidos de los trabajos incluidos en el capítulo de Publicaciones. Como en el apartado de Métodos, se detallan algunos aspectos que, por falta de espacio, no pudieron tratarse en las publicaciones correspondientes.

Publicación 1

Rueda-Martínez C, Lamas O, Mataró MJ, Robledo-Carmona J, Sánchez-Espín G, Jiménez-Navarro M, Such-Martínez M, Fernández B. Selection of reference genes for quantitative real time PCR (qPCR) assays in tissue from human ascending aorta. PLoS One. 2014 May 19;9(5):e97449. doi: 10.1371/journal.pone.0097449. eCollection 2014. PubMed PMID: 24841551; PubMed Central PMCID: PMC4026239.

Las muestras utilizadas en este estudio procedían de pacientes sometidos a cirugía cardiaca. Las muestras se clasificaron en cuatro grupos de estudio, en función de la morfología de la válvula aórtica y de la aorta ascendente: VAT y aorta normal (NDTAV); VAT y aorta dilatada (DTAV); VAB y aorta normal (NDBAV); VAB y aorta dilatada (DBAV).

Para evaluar la concentración del ARN aislado y su pureza, se empleó el espectrofotómetro. En la figura 6 se muestra el aparato del espectrofotómetro nanodrops D-1000 y, junto a este, una imagen con la gráfica obtenida, donde se detalla en rojo el valor obtenido (1,90) del cociente de absorbancia 260/280. Este valor se encuentra dentro del rango de 1,8-2, lo que indica un alto grado de pureza. También se detalla, más abajo en rojo, la concentración de ARN obtenida de unas de las muestras de tejido aórtico analizadas (40,4 ng/µl).

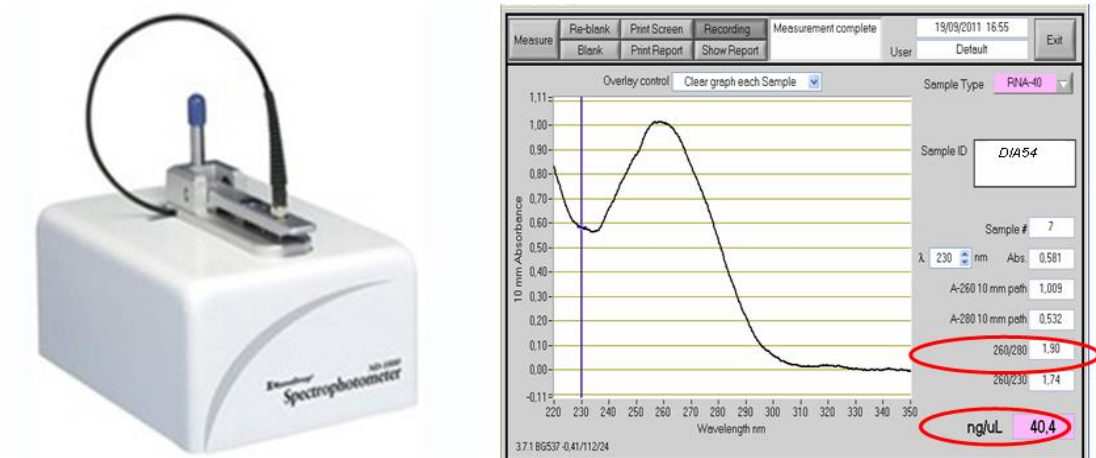


Figura 6: Aparato de espectrofotómetro utilizado e imagen de absorbancia y de concentración de ARN

Para confirmar la integridad de las moléculas de ARN aisladas, se realizó una electroforesis en gel de agarosa/ formaldehído desnaturizante al 1,2%, con el fin de separar las bandas que ponen de manifiesto la integridad de ARN y la ausencia de degradación. En la figura 7, se observa un gel de agarosa desnaturizado donde se muestran las típicas bandas de 28S del ARNr y 18S del ARNr y la ausencia de degradación. La presencia de estas bandas indica que la integridad del ARN es la correcta para realizar el estudio.

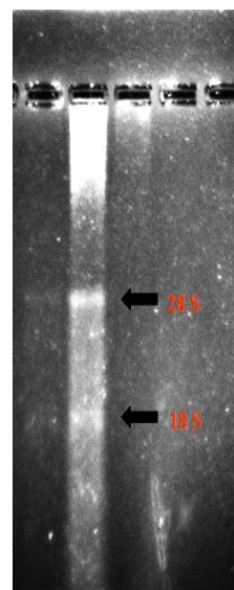


Figura 7: Gel de Agarosa desnaturizado

Los niveles de expresión de los seis genes candidatos a genes de referencia, *ABL1*, *CASC3*, *CDKN1 β* , *HMBS*, *POLR2A* y *TBP*, obtenidos de la PCR a tiempo real se estudiaron en todas las muestras de los pacientes. Para confirmar el buen estado del ADNc previamente sintetizado, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Las bandas obtenidas fueron del tamaño molecular esperado y solo se observó una única banda por cada gen, por lo que no se encontró ningún indicio de degradación del ADN. En cada gel se empleó un control negativo (NTC), en el que no se detectó banda en ningún caso. La figura 8 muestra las bandas de expresión de los genes de referencia candidatos. El primer pocillo se empleó para el marcador molecular y el último para el control negativo. Todos los genes candidatos tenían un tamaño de entre 50 y 100 pares de bases excepto el gen *TBP*. No se observó ninguna banda degradada.

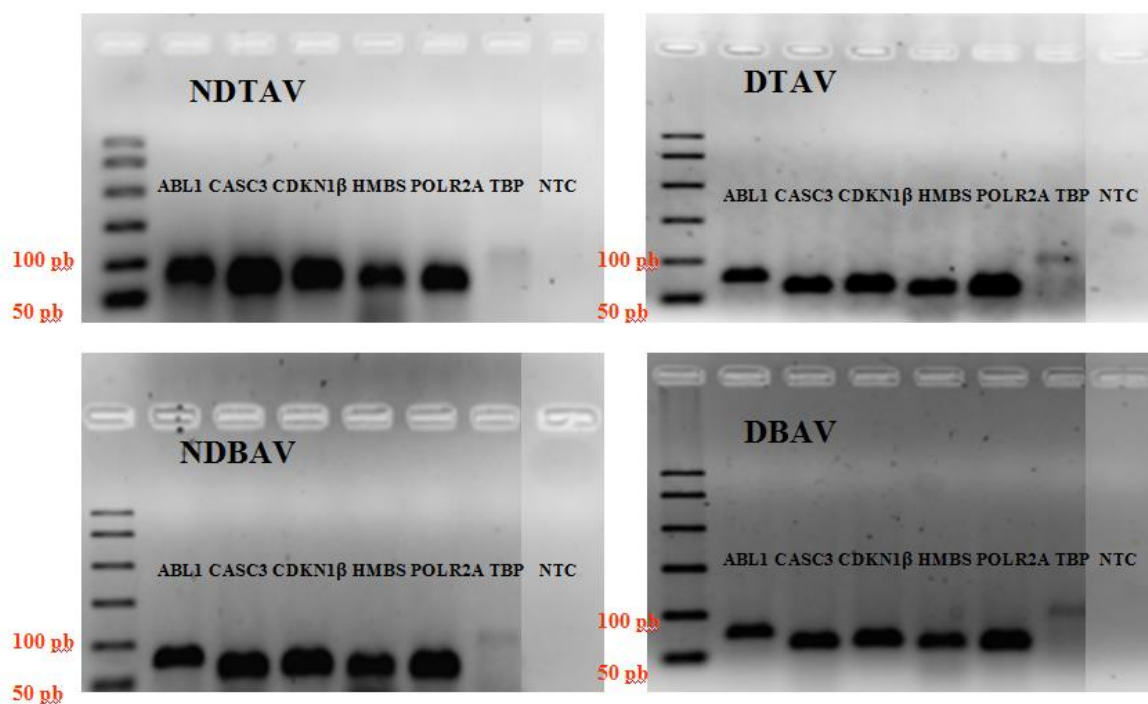


Figura 8: Geles de agarosa de los diferentes genes expresados para cada grupo.

Los valores de expresión de los genes candidatos (Ct), obtenidos de la PCR a tiempo real, fueron utilizados para el cálculo de los valores medios para cada amplicon, para así conocer el nivel de expresión medio de cada gen en las muestras estudiadas. En la figura 9 se muestra un diagrama de caja donde aparecen los valores medios de las Ct de cada gen estudiado. Éstos variaron entre 32 y 35, siendo los valores de las Ct más altos los correspondientes a los genes de *HMBS* y *TBP* y, por lo tanto, los que menos expresión mostraban, ya que el nivel de expresión de los genes es inversamente proporcional al valor de las Ct obtenidas.

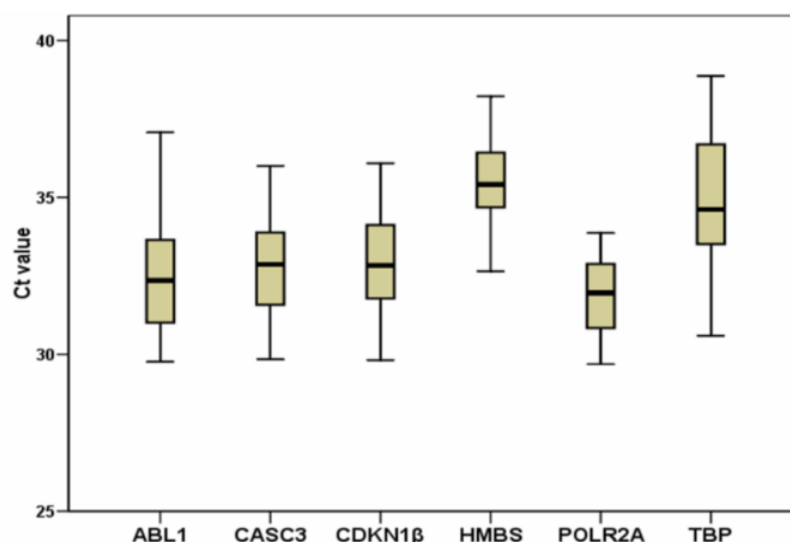


Figura 9: valores de las Ct medias de cada gen

Para el cálculo de las eficiencias de amplificación y los coeficientes de correlación de los genes candidatos se empleó el programa de LinRegPCR. Las eficiencias medias variaron desde el 90% al 100%, indicando un correcto proceso de amplificación. Los coeficientes de correlación medios fueron desde 0,963 a 1, indicando una alta linealidad de todas las curvas. En la figura 10 se observan las gráficas de

fluorescencia, donde se recoge el proceso de amplificación de cada uno de los amplicones. La Fase II de amplificación comprende la curva entre las dos líneas azules y el umbral corresponde a la línea verde. En las graficas inferiores de cada curva se pueden observar las eficiencias de cada muestra, con valores desde 1, que se corresponde con una amplificación nula, a 2, como máximo de amplificación, y los coeficientes de correlación de cada muestra, con valores de 0,995 a 1. De estas gráficas se obtuvieron posteriormente los valores medios de las eficiencias de amplificación y los valores medios de los coeficientes de correlación.

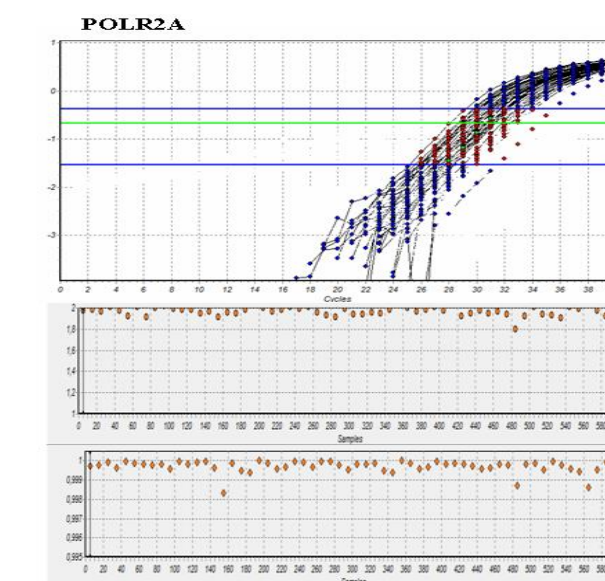
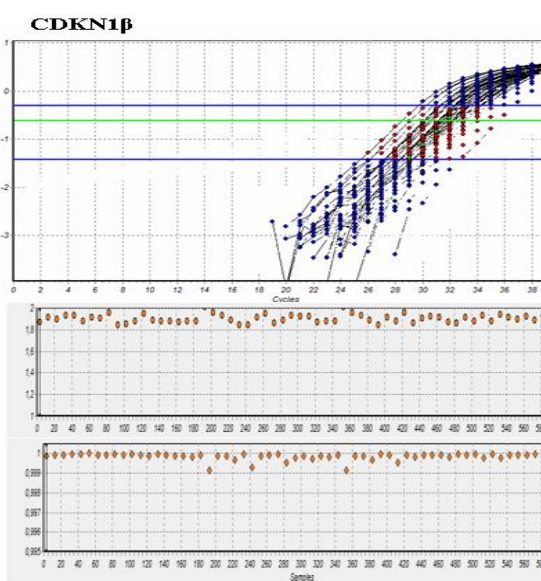
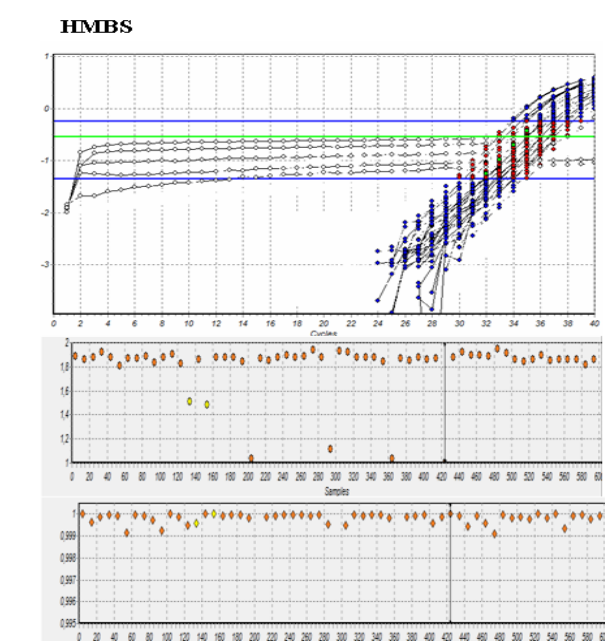
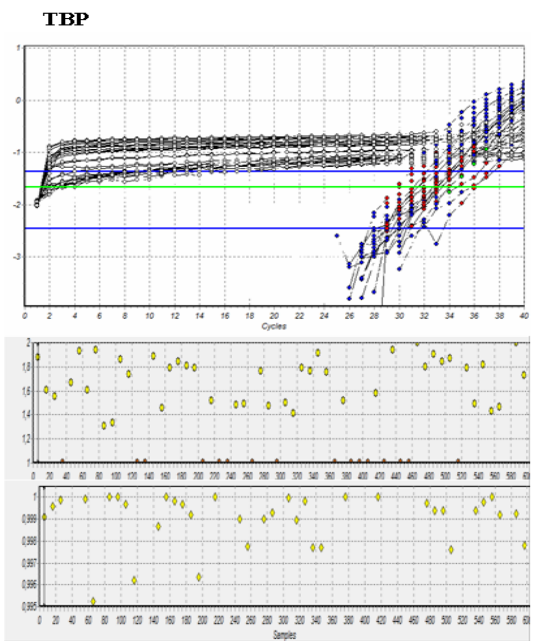
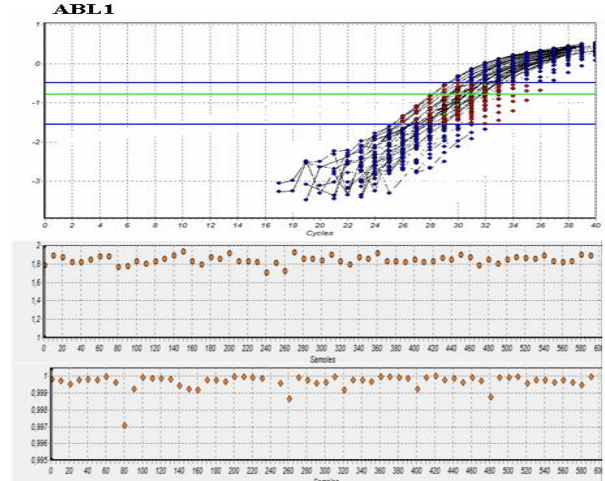
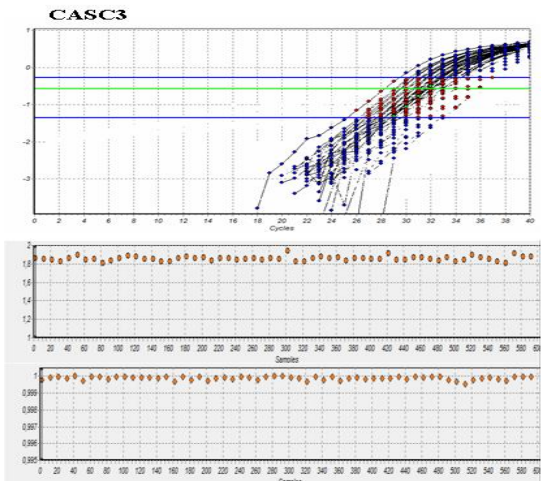


Figura 10: Curvas de Amplificación de cada gen.

Los datos obtenidos de la PCR cuantitativa a tiempo real de los genes candidatos fueron sometidos a tres algoritmos (geNorm, NormFinder y Bestkeeper), para la identificación de los genes más estables. Los datos más relevantes, obtenidos a partir de estos softwares se citan a continuación.

La figura 11A recoge los datos obtenidos del software de geNorm. Los dos genes más estables por igual fueron *CASC3* y *CDKN1 β* , con un valor $M = 0.52$, seguido de *ABLI* con un valor $M = 0.63$. En la figura 11B queda reflejado el número óptimo de genes de referencia que son necesarios para calcular el factor de Normalidad. El valor más bajo de variación (0.15) se obtuvo para $V_{(3/4)}$, lo cuál indica que según este software, para el calculo del factor de Normalización, son necesarios al menos tres genes de referencia.

Según el software de NormFinder, cuando se tienen en cuenta todas las muestras (Fig. 12A), el gen más estable es *CDKN1 β* con un valor $M = 0.056$, seguido del gen *POLR2A* ($M = 0.070$) y del gen *CASC3* ($M = 0.093$). Cuando NormFinder analiza los datos agrupados (NDVAT, DVAT, NDVAB, DVAB), el orden de los genes más estables es el mismo que en el caso anterior (Fig. 12B). En la figura 12C se puede observar que el gen *CDKN1 β* es el que muestra menor variación intra/intergrupos.

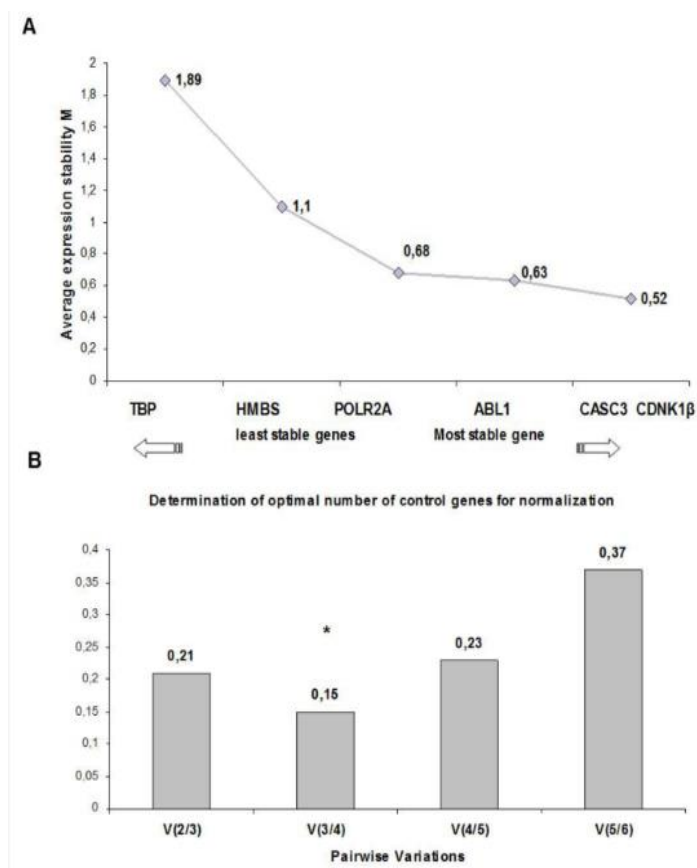


Figura 11: Gráficas procedentes del programa geNorm (A) valores de estabilidad M y (B) los de valores V

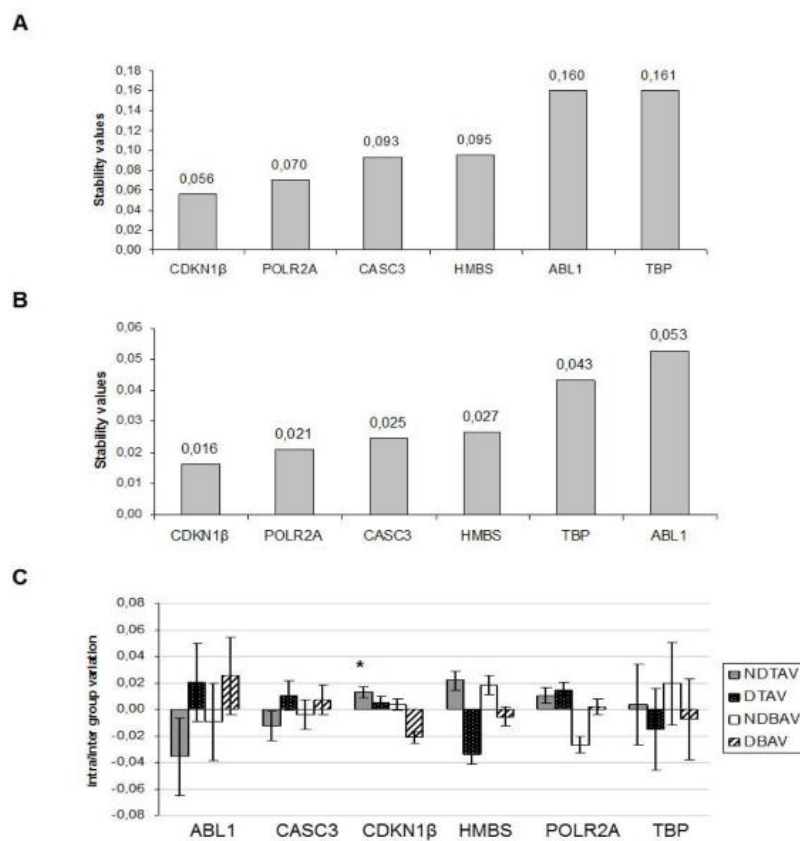


Figura 12: Gráficas procedentes de programa NormFinder (A) valores M de todas las muestra juntas (B) valores M de muestras por grupos; (C) valores intra/intergrupos

La tabla 1 muestra los datos del tercer software empleado, el Bestkeeper, para la búsqueda de los genes de referencia más estables. Según este software, los genes más estables son los que tienen desviaciones estándar más bajas con altos coeficientes de correlación. En este caso, los genes más estables eran *POLR2A* y *CDKN1β*, seguido del *CASC3*. Los genes menos estables fueron el *TBP* y *ABL1*, ya que las desviaciones estándar eran mayores que 1.

Genes	POLR2A	CDKN1β	CASC3	HMBS	ABL1	TBP	BI
Geo mean	32.02	32.86	32.83	35.51	32.33	34.77	33.3
Min	29.68	32.65	29.83	32.65	29.73	30.59	30.9
Max	34.41	38.96	36.35	38.96	35.81	38.87	35.9
Std dev	0.91	0.99	1	1	1.2	1.6	0.99
Std dev (x-fold)	1.70	1.79	1.89	1.81	2.02	2.56	1.92
Coeff of corr. (r)	0.92	0.97	0.94	0.85	0.86	0.80	
p-value	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	

Tabla 1: Datos obtenidos del Programa de Bestkeeper. GM: media geometrica (Ct); Min: valor minimo;

Los resultados globales de este trabajo se resumen en la tabla 2. El mejor gen de referencia es el gen *CDKN1β*, cuando se pretende normalizar con un solo gen como control interno. Cuando se pretende utilizar varios genes para la normalización de los datos de expresión, los genes de referencia adecuados serian *CDKN1β*, *POLR2A* y *CASC3*, ya que geNorm indica que para una correcta normalización de estos datos, se requiere un mínimo de 3 genes de referencia.

Ranking	GeNorm	NormFinder	Bestkeeper
1	CDKN1β/ CASC3	CDKN1β	POLR2A
2	ABL1	POLR2A	CDKN1β
3	POLR2A	CASC3	CASC3
4	HMS	HMBS	HMBS
5	TBP	ABL1	ABL1
6		TBP	TBP

Tabla 2: Resultado de los tres software



Publicación 2

*Rueda-Martínez C, Lamas O, Mataró MJ, Robledo-Carmona J, Sánchez-Espín G, Moreno-Santos I, Carrasco-Chinchilla F, Gallego P, Such-Martínez M, de Teresa E, Jiménez-Navarro M, Fernández B. **Fibrillin 2 is upregulated in the ascending aorta of patients with bicuspid aortic valve.** Eur J Cardiothorac Surg. 2016 Sep 15. pii: ezw277. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27634926.*

La selección de los pacientes y las técnicas de extracción de ARN fueron las mismas que en el trabajo anterior, ya que este segundo trabajo es una continuación del anterior, para el que se emplearon las mismas muestras.

Los niveles de expresión de los cuatro genes seleccionados, *MMP9*, *MMP2*, *FBN1* y *FBN2*, obtenidos de la PCR a tiempo real se estudiaron en todas las muestras de los pacientes. Para confirmar el estado del ADNc sintetizado, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Los tamaños moleculares de las bandas de los genes experimentales fueron los esperados y solo se observó una única banda por gen, por lo que no se detectó degradación ninguna de ADN. En el control negativo no se observó ninguna banda por lo que no hay incidencia de contaminación.

En la figura 13 se muestran los geles de agarosa en los que aparecen las bandas correspondientes a cada uno de los genes estudiados a partir del tejido aórtico de los cuatro grupos de pacientes (NDVAT, DVAT, NDVAB y DVAB). El primer pocillo se empleó para el marcador molecular (M) y el último pocillo para el control negativo (NTC). Las 6 primeras calles corresponden a los genes de referencia estudiados en la primera publicación desde el pocillos 2 hasta el 7). Los tamaños moleculares de los genes experimentales fueron entre 50 y 100 pb.

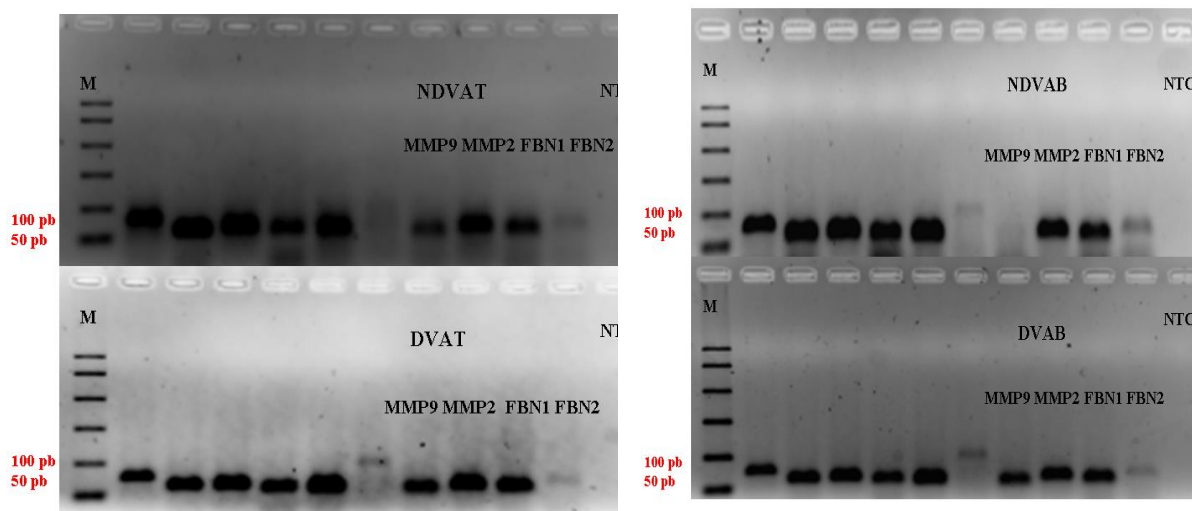


Figura 13: Geles de agarosa de la expresión de los genes específicos en los cuatro grupos.

Para el cálculo de las eficiencias de amplificación y los coeficientes de correlación de los genes analizados, se empleó el programa de LinRegPCR. Las eficiencias medias fueron de entre el 90% y el 95%, indicando un correcto proceso de amplificación. Los coeficientes de correlación medios fueron desde 0,9 al 1, indicando una alta linealidad de todas las curvas.

La figura 14 muestra las gráficas de fluorescencia de los cuatro genes estudiados donde se recoge el proceso de amplificación de cada uno de los amplicones. La Fase II comprende entre las dos líneas azules y la línea verde corresponde al umbral. En las gráficas inferiores a cada curva se puede observar las eficiencias de cada muestra, que comprende valores desde uno (amplificación nula) a 2 (máximo de amplificación), y los coeficientes de correlación de cada muestra de tejido aórtico que comprende desde los valores de 0,995 hasta 1. De estas gráficas se obtuvieron los valores medios de las eficiencias y los valores medios de los coeficientes de correlación.

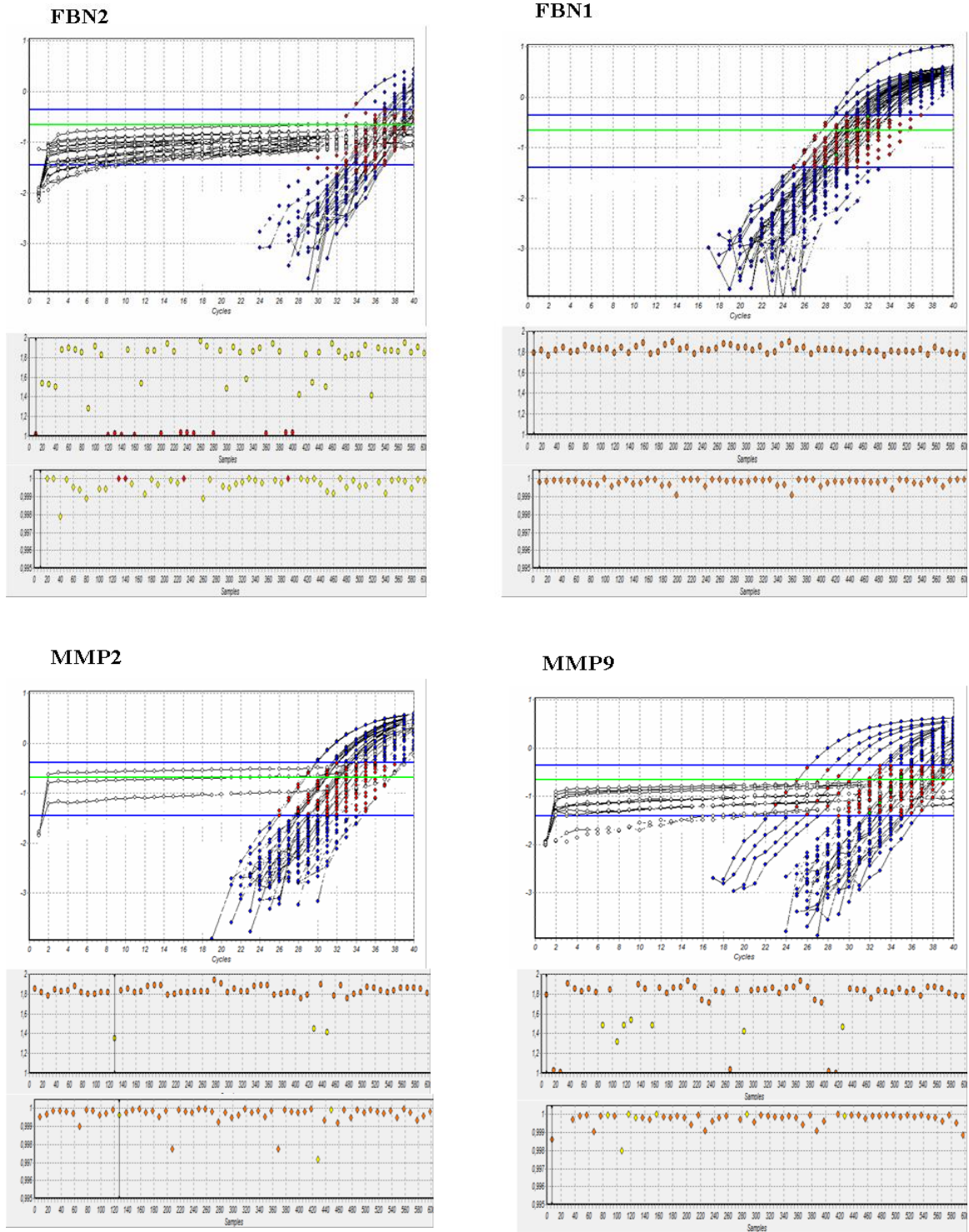


Figura 14: Curvas de amplificación de cada gene específico

En las gráficas de la figura 15 se muestra la expresión relativa de los genes *MMP9*, *MMP2*, *FBN1* y *FBN2*, normalizados por el gen de referencia *CDKN1 β* (Figs. 15A, B) o por tres genes de referencia, *CDKN1 β* , *POLR2A* y *CASC3* (Figs. 15C,D), en los cuatro grupos de pacientes (NDVAT, DVAT, NDVAB y DVAB).

La única diferencia significativa fue el incremento de expresión del gen *FBN2* en el grupo DVAB versus DVAT. Las gráficas de las figuras 16 y 17 son similares a las de la figura 15, pero en este caso se comparan pacientes con VAT y VAB (Fig. 16) o pacientes con (AD) y sin (ND) dilatación aórtica (Fig. 17). Solo se detectaron diferencias significativas entre pacientes con VAT y VAB para el gen *FBN2*, aunque el gen *FBN1* mostraba una tendencia.

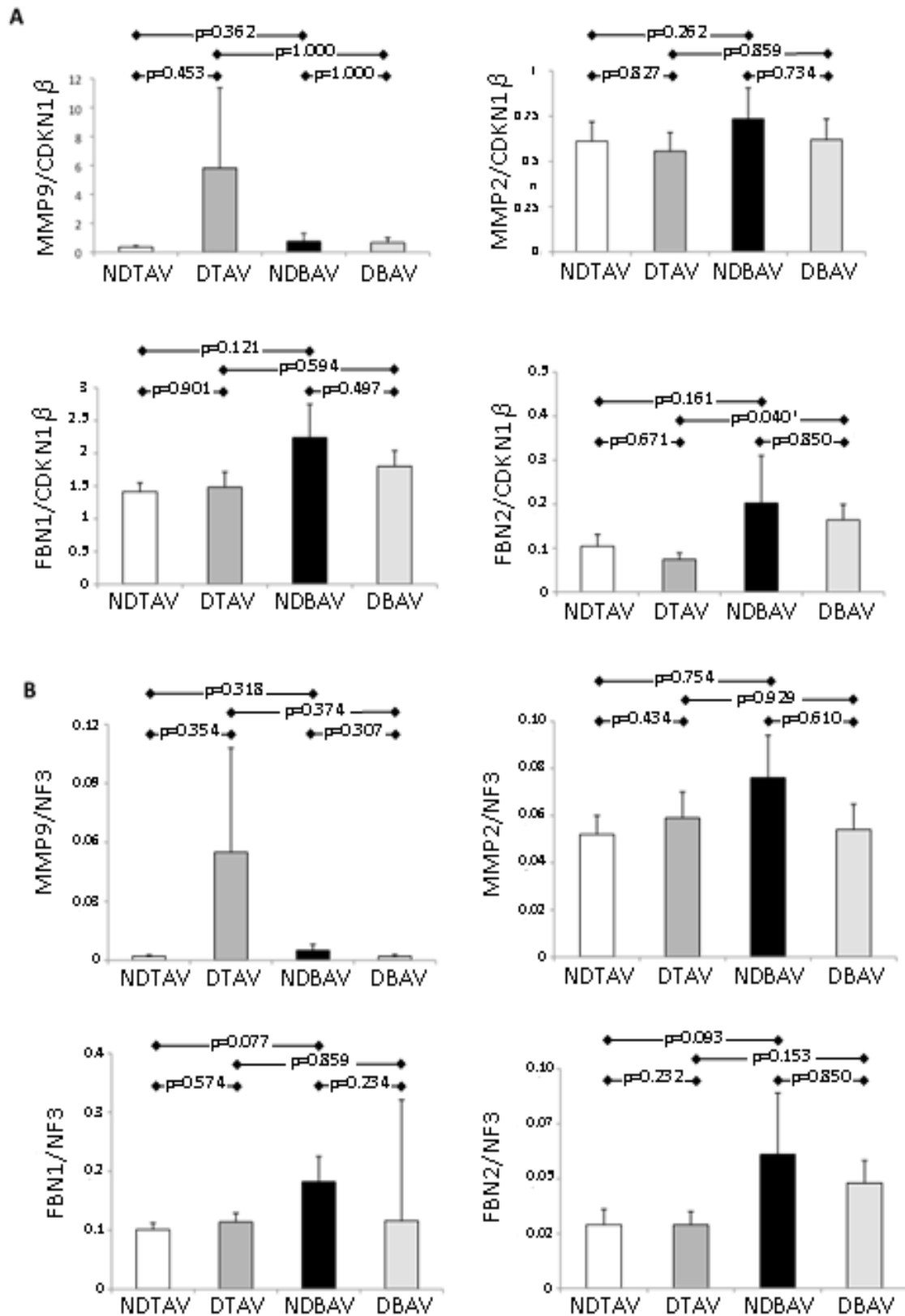


Figura 15: Expresión de los genes *MMP2*, *9* y *FBN1*, *2* en los cuatro grupos de pacientes (NDVAT, DVAT, NDVAB, DVAB) normalizados con *CDKN1* (A) o con *CDKN1β*, *POLR2A* y *CASC3* (B).

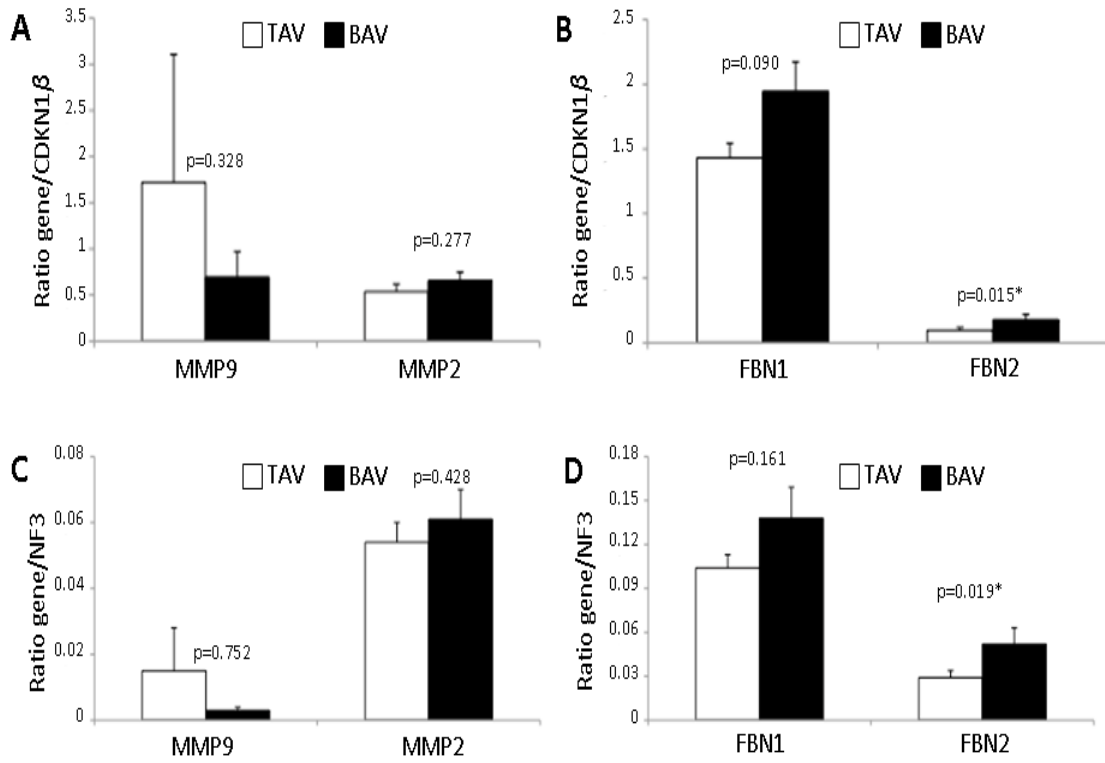


Figura 16: Expresión de los genes *MMP2*, *9* y *FBN1* y *2* normalizados con *CDKN1β* (A y B) o con *CDKN1β*, *POLR2A* y *CASC3* (C y D) en pacientes con VAT comparados con pacientes con VAB

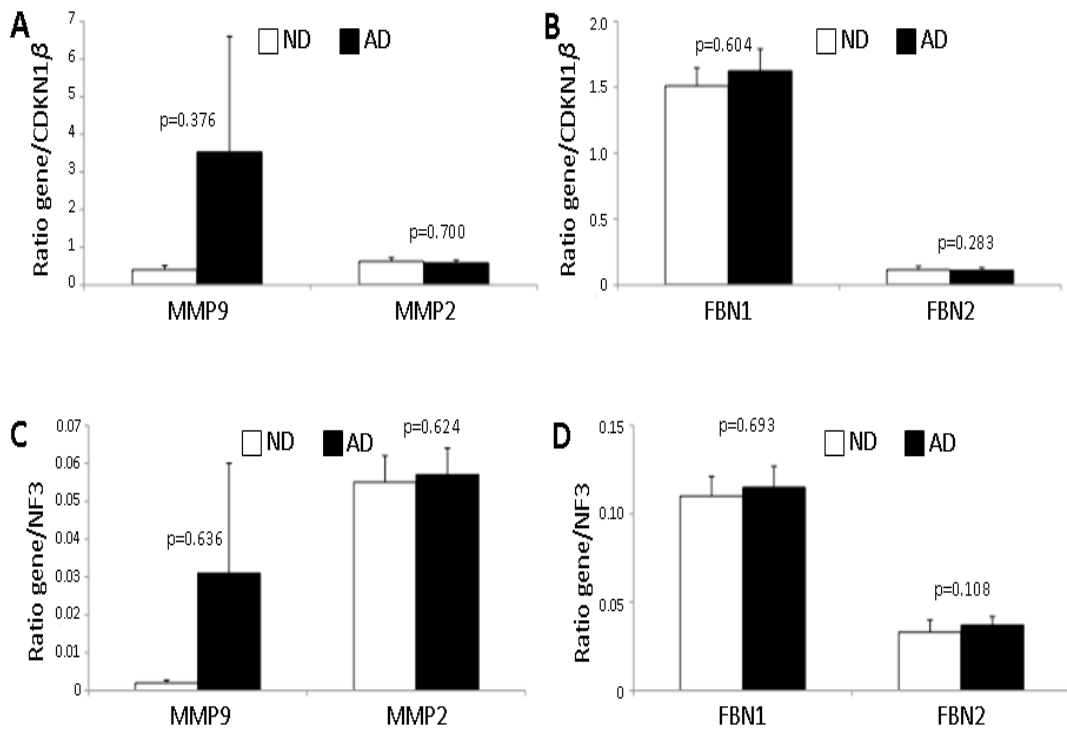


Figura 17: Expresión de los genes *MMP2*, *9* y *FBN1*, *2* normalizados con *CDKN1β* (A, B) o con *CDKN1β*, *POLR2A* y *CASC3* (C, D) en pacientes con DA (AD) comparados con pacientes con aorta normal (ND).

La figura 18 incluye las gráficas que muestran el ratio de expresión de las isoformas de *FBN* en pacientes con VAT y VAB (Fig. 18A), pacientes con (AD) y sin (ND) dilatación aórtica (Fig. 18B) o cuatro grupos de pacientes (NDTAV, DTAV, NDBAV, DBAV; Fig. 18C). El ratio fue mayor en pacientes con VAT y ND, aunque no se alcanzaron diferencias significativas.

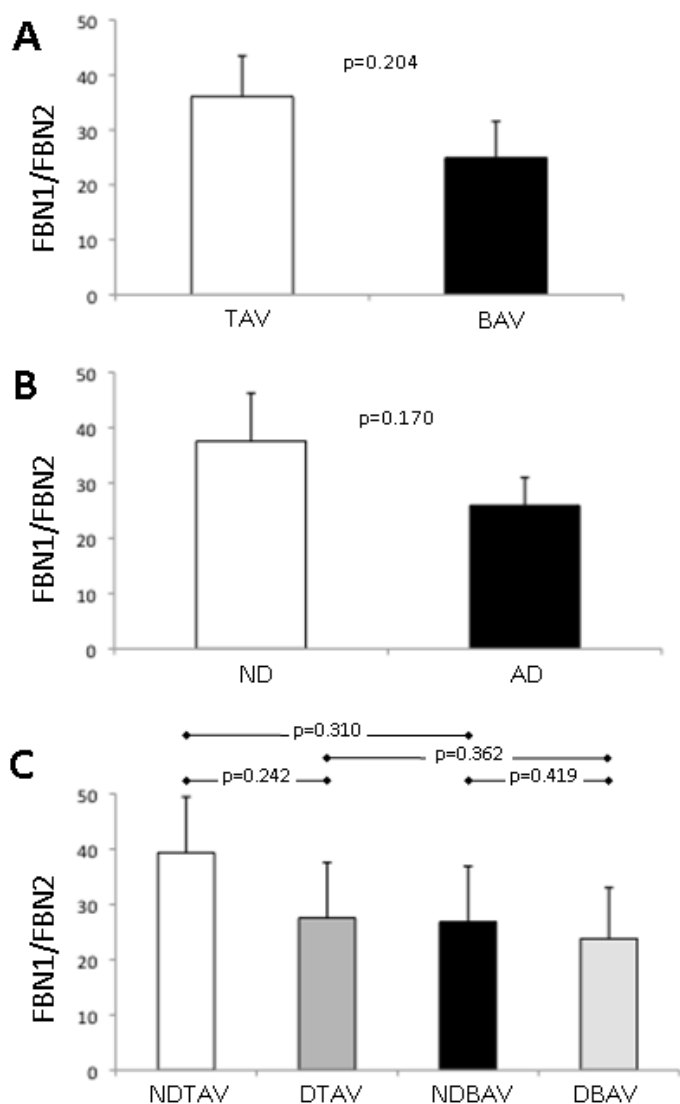


Figura 18: Relación de expresión de las *FBNs*

Publicación 3

Rueda-Martínez C, Fernández MC, Soto-Navarrete MT, Jiménez-Navarro M, Durán AC, Fernández B. Identification of Reference Genes for Quantitative Real Time PCR Assays in Aortic Tissue of Syrian Hamsters with Bicuspid Aortic Valve. PLoS One. 2016 Oct 6;11(10):e0164070. doi: 10.1371/journal.pone.0164070. PubMed PMID: 27711171.

Los animales se agruparon en función de la cepa de origen (H y T), la edad de los animales (adultos: 180-240 días; viejos: 300-440 días) y la morfología de la válvula aórtica (VAT y VAB). La cepa H fue usada como control, ya que todos los animales presentan VAT (Fig. 19). En la cepa T, aproximadamente el 60% de los animales presentan VAT y el 40% VAB (Fig. 19). Los animales con válvulas tricúspides muestran tres valvas, tres senos y tres comisuras y los animales con válvula bicúspide presentan dos de cada uno de estos elementos anatómicos. Todos los animales con VAB mostraron orientación dorso-ventral de las valvas y los senos, correspondiente con el tipo A de valvulopatía bicúspide en humanos. La mayoría de los animales con VAB presentaban un rafe localizado en el centro del seno aórtico ventral.

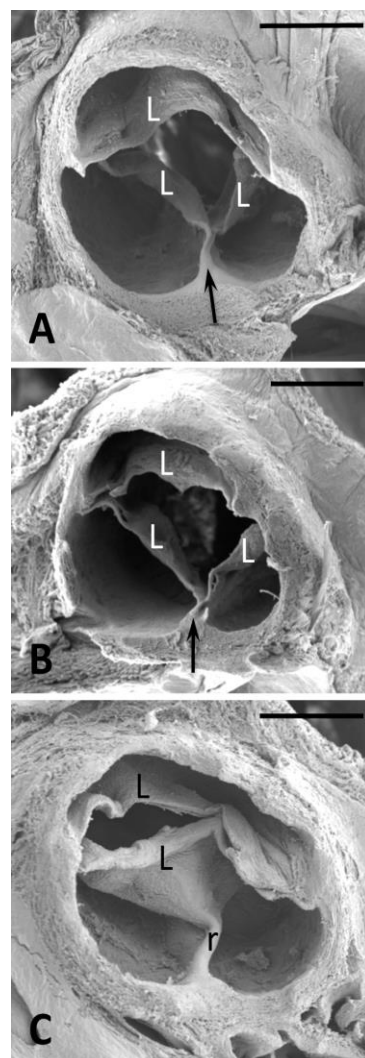


Figura 19: Micrografías electrónicas de barrido de una VAT de un animal de la cepa H (A), una VAT de un animal de la cepa T (B) y una VAB de un animal de la cepa T (C). La flecha marca la comisura ventral. L: valva; r: rafe; barra = 500 μ m

Las técnicas de extracción de ARN fueron las mismas que en el trabajo anterior. En la figura 20 se muestra el aparato del espectrofotómetro nanodrops D-1000 y la gráfica obtenida de este, donde se detallan en rojo el valor del cociente de absorbancia 260/280 de 2,02, indicando la pureza del ARN. También se detalla más abajo en rojo, la concentración (45,2ng/μl) del ARN de unas de las muestras de tejido aórtico.

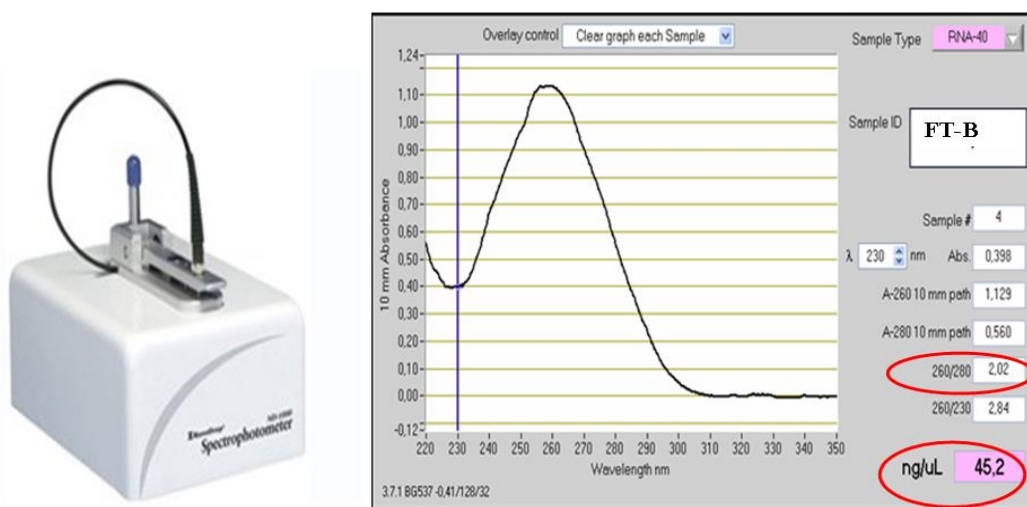


Figura 20: Aparato de espectrofotómetro utilizado e imagen de absorbancia y de concentración de ARN

Para confirmar el estado del ADNc previamente sintetizado, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Las bandas fueron del tamaño molecular esperado y solo se observó una única banda por cada gen, por lo que no se obtuvo ninguna señal de degradación del ADN. En la figura 21 se muestran las bandas obtenidas tras la electroforesis para los genes de referencia candidatos (*G3pdh*, *β2m*, *Hprt*, *Rpl18*, *β-actin*, *γ-actin*, *Pecam-1*, *Cdkn1β*, *Polr2a* y *Casc3*) en los tres grupos de muestras de tejido aórtico de hámster (H-TAV, T-TAV y T-BAV) estudiadas. El primer pocillo se empleó para el marcador molecular y el último pocillo fue empleado para un control negativo (NTC). Se emplearon dos muestras de cada grupo. Todos los tamaños moleculares de los genes candidatos se encontraban entre en tamaño 50 y 100 pares de

bases excepto del gen *Pecam-1*, entre 100 y 300 pb. No se observó ninguna banda degradada.

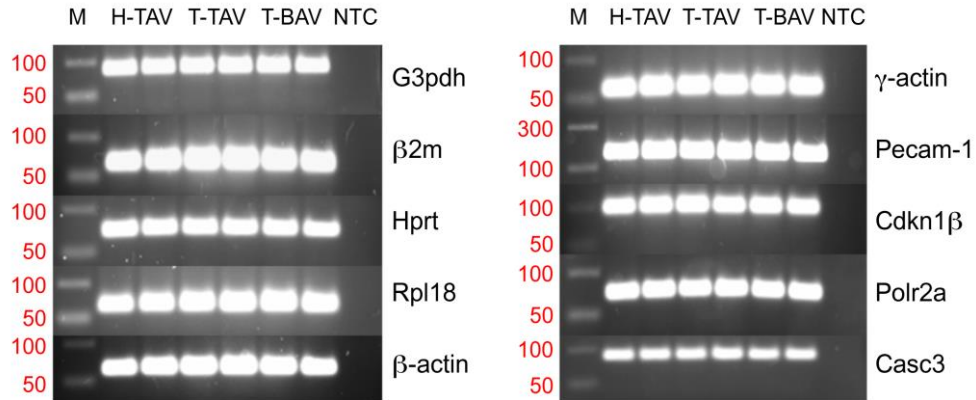


Figura 21: Geles de agarosa de los diferentes genes expresados para cada grupo de animales

Los valores Ct de los diez genes candidatos a genes de referencia, *G3pdh*, *beta2m*, *Hprt*, *Rpl18*, *beta-actin*, *gamma-actin*, *Pecam-1*, *Cdkn1beta*, *Polr2a* y *Casc3* estudiados fueron utilizados para el cálculo de la media de los Ct para cada amplicon, que variaron entre los valores 19 y 28 (Fig. 22)

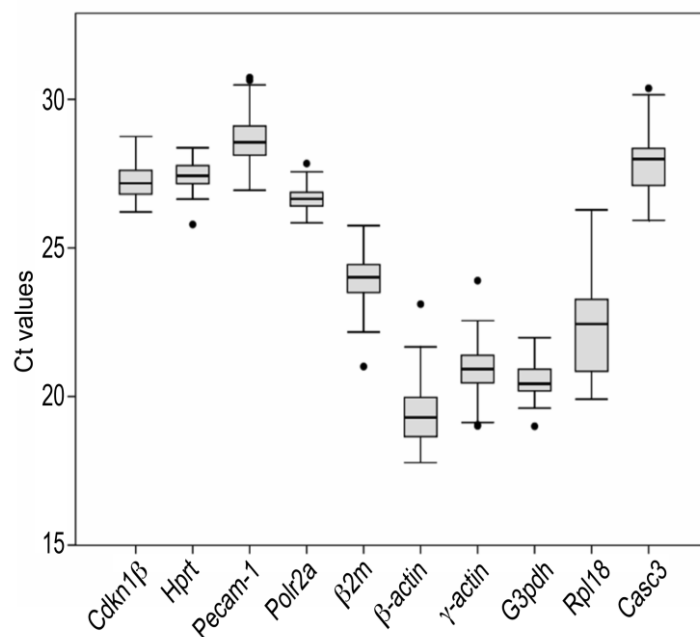


Figura 22: Diagrama de caja donde quedan recogidos los valores de las Ct medias de cada gen

Los análisis de las curvas de melting se realizaron para determinar la identidad y la pureza de los productos amplificados de cada par de cebadores. La figura 23 muestra curvas de fluorescencia representativas para cada uno de los genes estudiados. Un único pico de fluorescencia se observó para cada uno de los genes, indicativo de la ausencia de dímeros, por lo que los productos de la PCR cuantitativa a tiempo real son específicos.

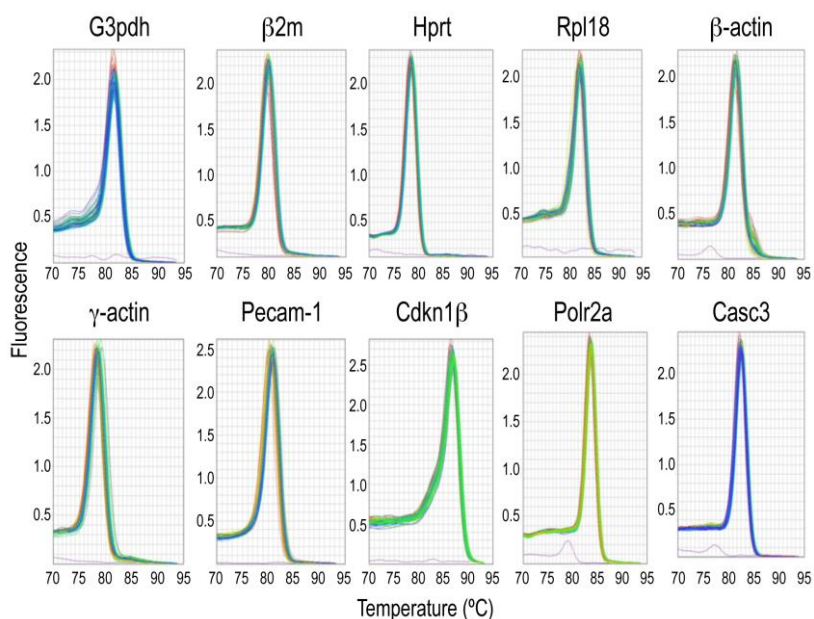
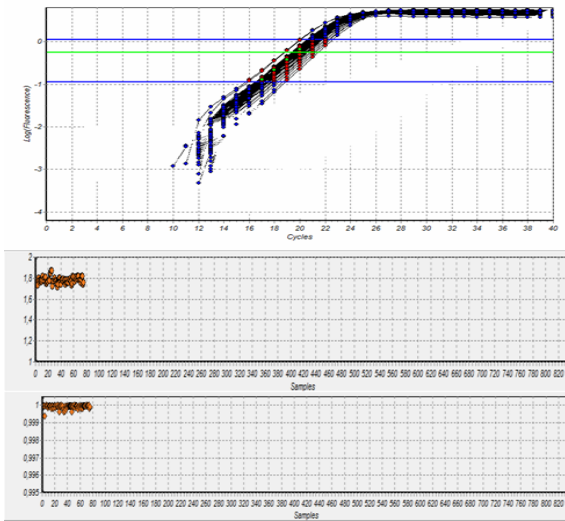


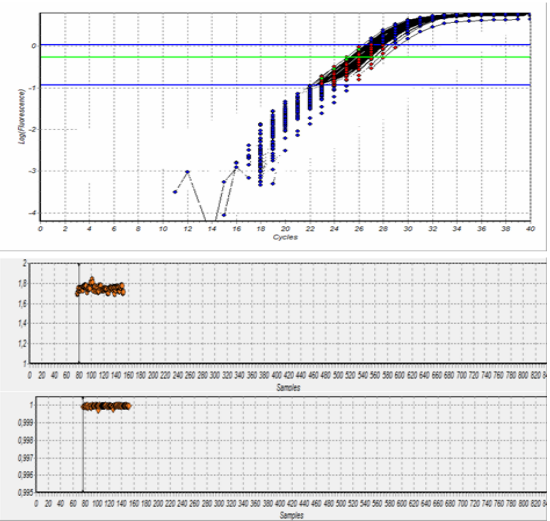
Figura 23: Curvas de Melting de cada amplicon.

La figura 24 incluye las gráficas de fluorescencia donde se recoge el proceso de amplificación de cada uno de los amplicones (*G3pdh*, *β2m*, *Hprt*, *Rpl18*, *β-actin*, *γ-actin*, *Pecam-1*, *Cdkn1β*, *Polr2a* y *Casc3*). La Fase II comprende entre las dos líneas azules y la línea verde corresponde al umbral. En las graficas inferiores a cada curva se muestran las eficiencias de cada muestra que comprende valores desde uno (amplificación nula) a 2 (máximo de amplificación) y los coeficientes de correlación de cada muestra que comprende valores desde 0,995 hasta 1. De estas gráficas se obtuvieron los valores medios de las eficiencias de amplificación y los valores medios de los coeficientes de correlación.

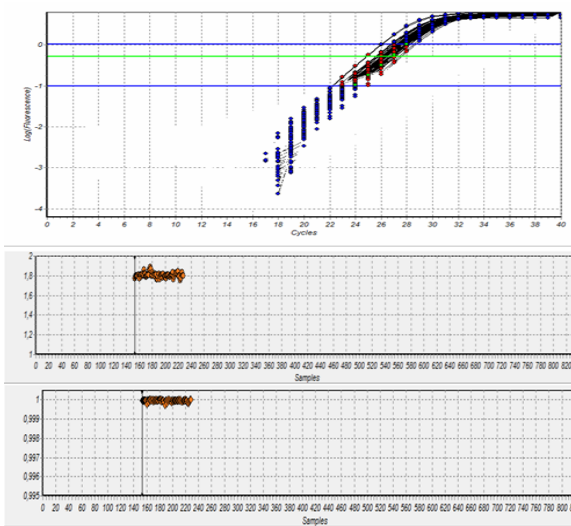
G3pdh



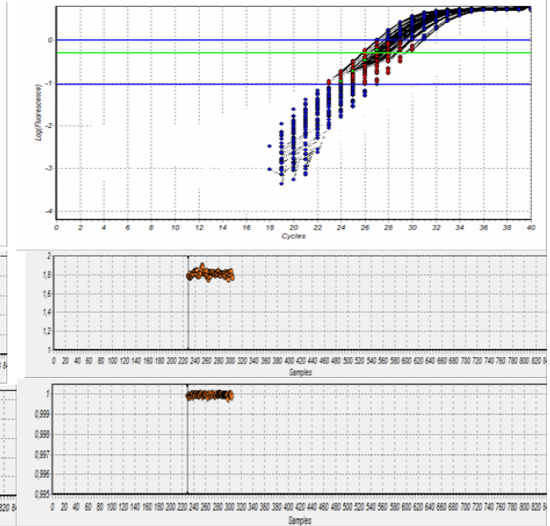
Cdkn1β



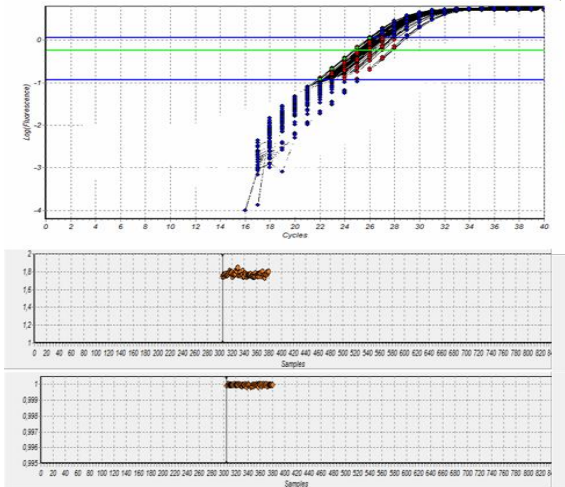
Hprt



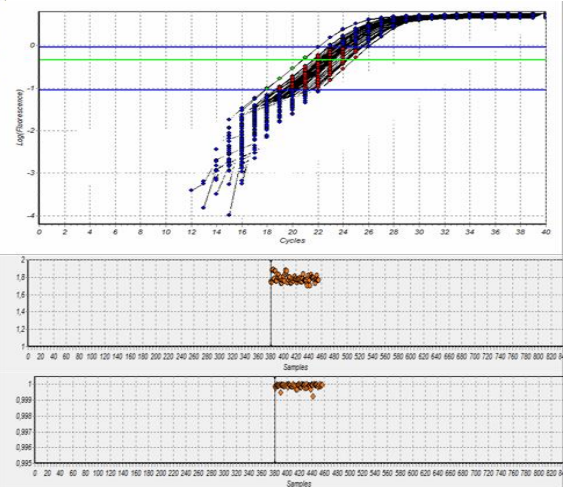
Pecam-1



Polr2a



β2m



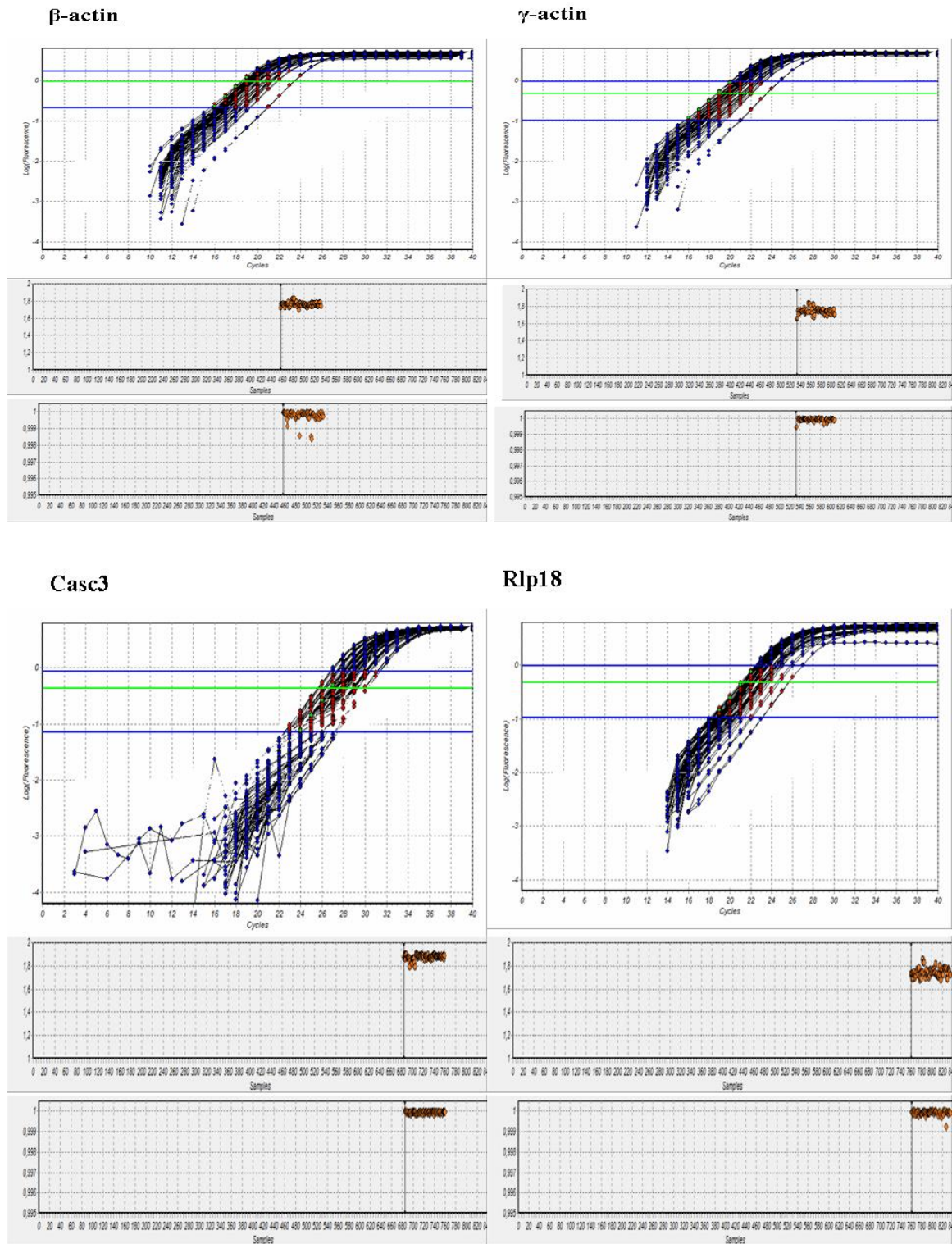


Figura 24: Curvas de Amplificación de los genes candidatos

Los datos obtenidos de la PCR cuantitativa a tiempo real de los genes candidatos fueron sometidos a tres algoritmos (geNorm, NormFinder y Bestkeeper) para la identificación de los genes más estables. Los datos más relevantes, obtenidos a través de estos softwares se citan a continuación.

En la figura 25 se muestran los datos obtenidos del software geNorm. Estos indican que los dos genes más estables por igual son los genes *G3pdh* y el *Cdkn1β* (Fig. 25A) con un valor $M = 0.28$, seguido del gen *Polr2a* con un valor $M = 0.33$. El gen menos estable fue *Rlp18*, con un valor de estabilidad $M = 0.81$. En la segunda gráfica (Fig. 25B), queda reflejado el número óptimo de genes de referencia que son necesarios para calcular el factor de Normalidad. El valor más bajo de variación (0.111) se obtuvo para $V_{(2/3)}$, lo cuál indica que, según este software, para el cálculo del factor de normalización son necesarios al menos dos genes de referencia.

Según el software de NormFinder, cuando se tienen en cuenta todas las muestras (Fig. 26A), el gen más estable es *G3pdh* con un valor $M = 0.052$, seguido del gen *Polr2a* ($M = 0.068$) y del gen *Cdkn1β* ($M = 0.072$). Cuando NormFinder analiza los datos agrupados en función de la cepa y la morfología valvular (H-TAV, T-TAV y T-BAV), el orden de los genes más estables es el mismo que en el caso anterior (Fig. 26B). Cuando se tiene en cuenta los grupos de edad (Fig. 26C), los mismos tres genes aparecen como más estables, aunque el orden de los genes más estables varía, siendo en este caso *Polr2a* y *G3pdh* seguido de *Cdkn1β*.

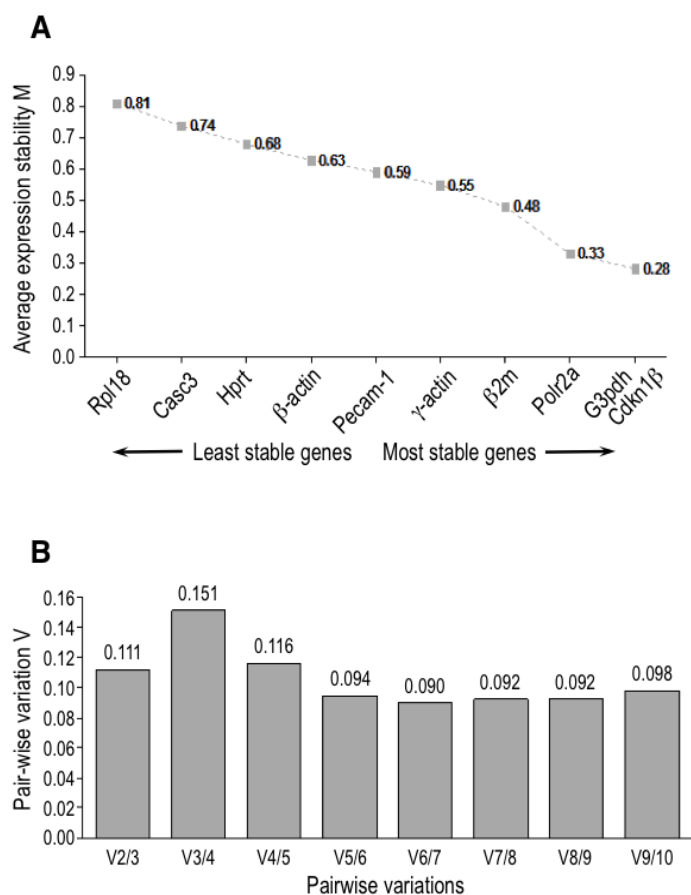


Figura 25: Graficas del software geNorm. (A) valores de estabilidad M. (B) valores V

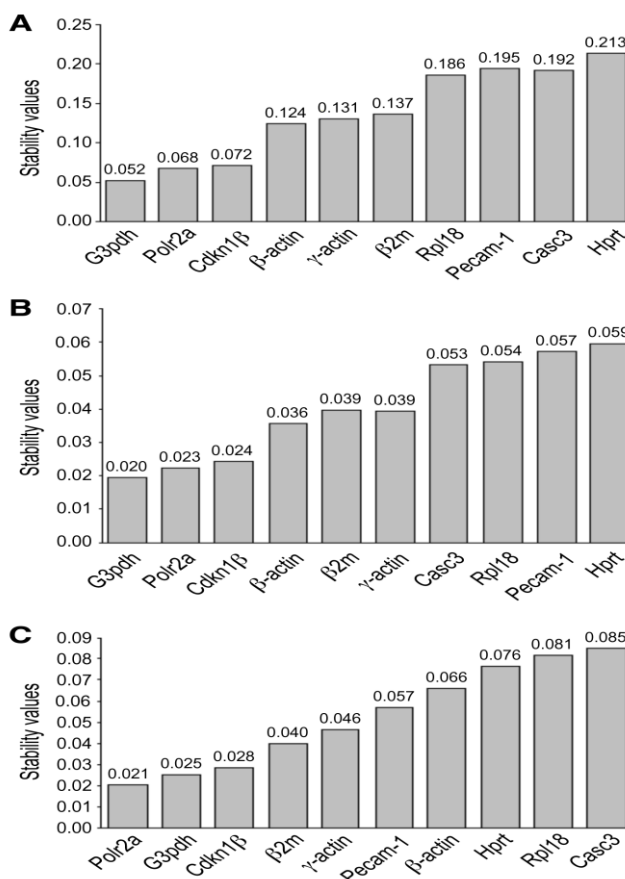
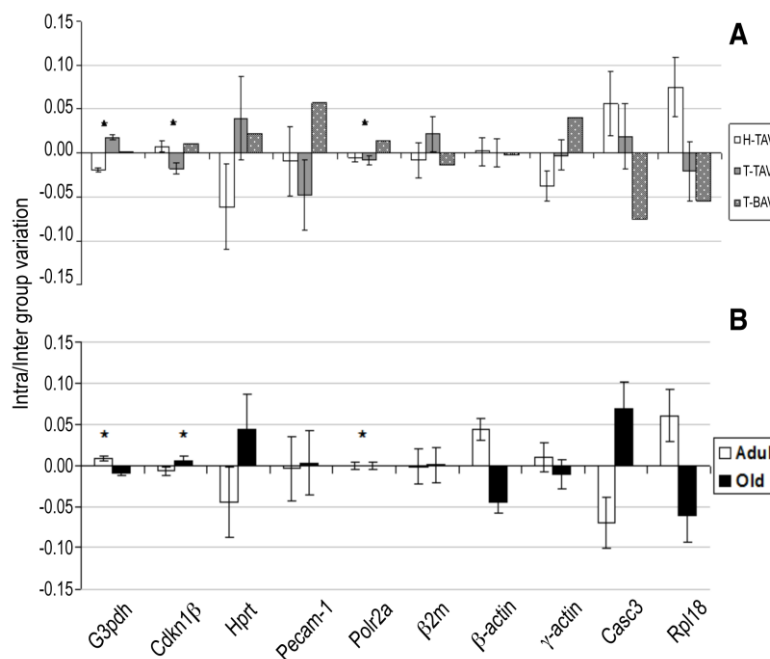


Figura 26: Graficas del programa NorFinder. (A) valores M de todas las muestra sin agrupar. (B) valores M de las muestras agrupadas en función de la cepa y la morfología valvular (H-TAV, T-TAV, T-BAV). (C) valores M cuando se tienen encuentra las edades.

En la figura 27 se muestran las variación intra/intergrupo de los datos de expresión en función de la cepa y la morfología valvular (Fig. 27A) o de la edad de los animales (Fig. 27B). Los genes *Cdkn1 β* , *G3pdh* y *Polr2a* son los que muestran menos variabilidad intra/inter grupo.

Figura 27: Valores intra/inter grupo (A) según cepa y morfología valvular; (B) según edad



El tercer software empleado para la búsqueda de los genes de referencia más estables fue Bestkeeper. Este mostró que los genes más estables eran los que tenía desviaciones estándar más bajas con altos coeficientes de correlación, en este caso *Cdkn1 β* , *Polr2a*, seguido del *G3pdh*. El gen menos estable fue *Rpl18*, ya que la desviación estándar era mayor que 1 (ver tabla3).

Los resultados globales del presente trabajo se resumen en la tabla 4. El mejor gen de referencia para las muestras analizadas es el gen *Cdkn1 β* , cuando solo normalizamos con un gen como control interno. Cuando pretendemos utilizar varios

genes para la normalización de los datos de expresión, los genes de referencia a seleccionar serían *Cdkn1β* y *G3pdh*, ya que geNorm indica que para una correcta normalización de estos datos se requieren al menos 2 genes de referencia.

Genes	GM	Min	Max	Std dev	CV	Std dev (x-fold)	R ²	P-value
β2m	23.95	21.01	25.75	0.65	2.69	1.46	0.771	0.001
Hprt	27.42	25.79	28.37	0.37	1.36	1.25	0.056	0.736
Rpl18	22.21	19.91	26.28	1.27	5.75	2.11	0.758	0.001
β-Actin	19.46	17.78	23.11	0.83	4.28	1.63	0.822	0.001
γ-Actin	20.96	19.01	24.34	0.80	3.82	1.60	0.858	0.001
Pecam-1	28.64	26.94	30.73	0.76	2.64	1.56	0.718	0.001
G3pdh	20.49	19	21.98	0.47	2.27	1.32	0.860	0.001
Cdkn1β	27.24	26.21	28.75	0.41	1.52	1.27	0.800	0.001
Polr2a	26.73	25.84	28.58	0.41	1.53	1.27	0.887	0.001
Casc3	27.87	25.93	30.37	0.77	2.76	1.57	0.601	0.001

Tabla 3: Datos obtenidos del Programa de Bestkeeper. GM: media geometrica (Ct); Min: valor minimo; Max: valor maximo

Ranking	GeNorm	NormFinder	Bestkeeper
1	G3pdh/Cdkn1β	G3pdh/Cdkn1β	Cdkn1β/Polr2a
2	Polr2a	Polr2a	G3pdh
3	β2m	β -Actin	β2m
4	γ-Actin	β2m/γ-Actin	Pecam-1
5	Pecam-1	Casc3	Casc3
6	β -Actin	Rpl18	γ-Actin
7	Hprt	Pecam-1	β -Actin
8	Casc3	Hprt	Hprt
9	Rpl18		Rpl18

Tabla 4: Ranking de estabilidad de los genes estudiados según los tres softwares empleados.

Trabajo 4

*Alteraciones moleculares en la pared de la aorta ascendente en el modelo de hámster con valvular aórtica bicúspide. (En redacción para la revista *Frontiers in Physiology*, con el título: *Aortic wall alterations in the spontaneous hamster model of congenital bicuspid aortic valve*).*

La selección y agrupación de los animales y las técnicas de extracción de ARN fueron las mismas que en el trabajo anterior, ya que este trabajo es una continuación del anterior, para el que se emplearon las mismas muestras

Los niveles de expresión de los seis genes seleccionados, *Nos3*, *Mmp9*, *Mmp2*, *Fbn1*, *Fbn2* y *Tgf- β* , obtenidos de la PCR a tiempo real, se estudiaron en todas las muestras. Para confirmar el estado del ADNc sintetizado, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Los tamaños moleculares de las bandas de los genes experimentales fueron los esperados y solo se observó una única banda por gen, por lo que no se detectó degradación ninguna de ADN. En el control negativo no se observó ninguna banda por lo que no hay incidencia de contaminación.

En la figura 28 se muestran los geles de agarosa en los que aparecen las bandas correspondientes a cada uno de los genes estudiados en la aorta de los tres grupos de especímenes empleados (H-TAV, T-TAV, T-BAV). El primer pocillo se empleó para el marcador molecular y el último pocillo fue empleado para un control negativo (NTC). Se emplearon dos muestras de cada grupo de estudio. Todos los tamaños moleculares de los genes candidatos se encontraban entre 50 y 100 pb excepto del gen *Mmp2*, que estaba entre 100 y 300 pb. No se observó ninguna banda degradada.

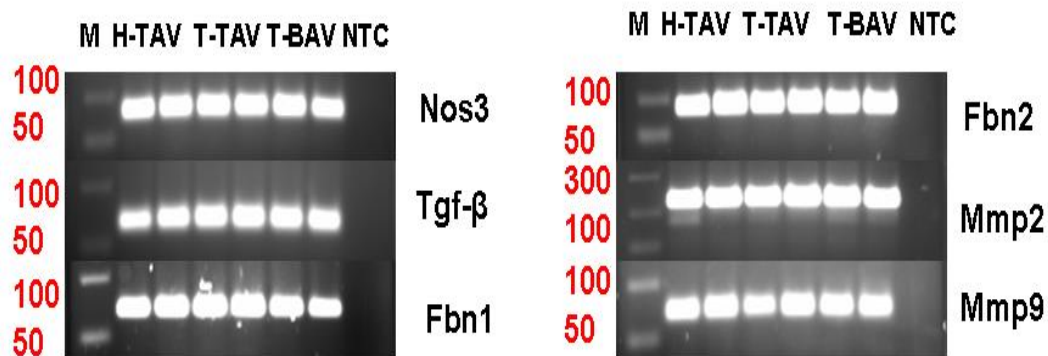


Figura 28: Electroforesis de los productos de amplificación de la RT-qPCR correspondientes a dos individuos de cada grupo analizado (H-TAV, T-TAV, T-VAB). M: marcador del peso molecular; NCT: “no template control”.

Los análisis de las curvas de melting se realizaron para determinar la identidad y la pureza de los productos amplificados de cada par de cebadores. En la figura 29 se detalla las curvas de Melting de las muestras de tejido aórtico para cada uno de los genes experimentales. Un único pico de fluorescencia se observó para cada uno de los genes, indicativo de la ausencia de dímeros, por lo que los productos de la PCR cuantitativa a tiempo real son específicos

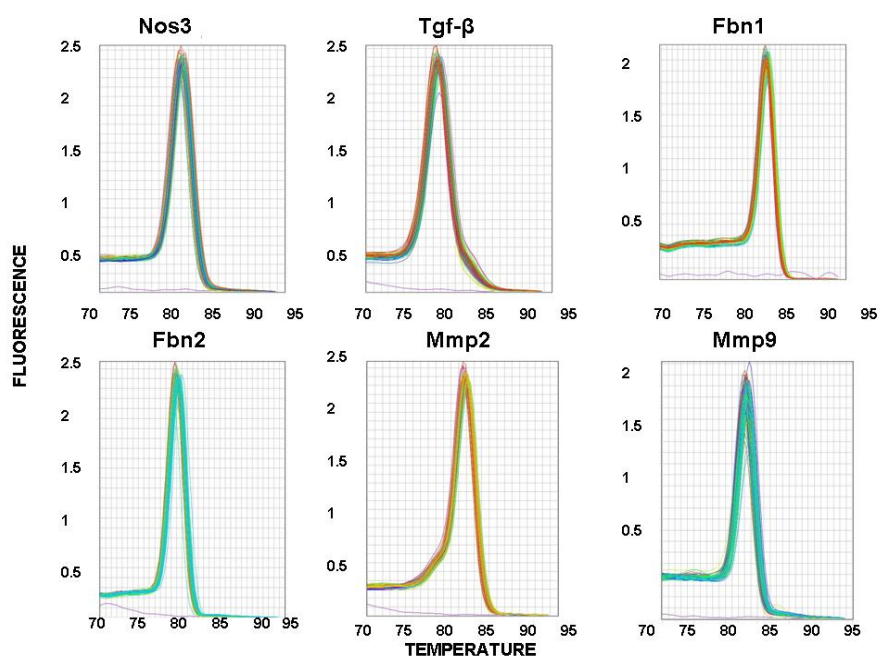
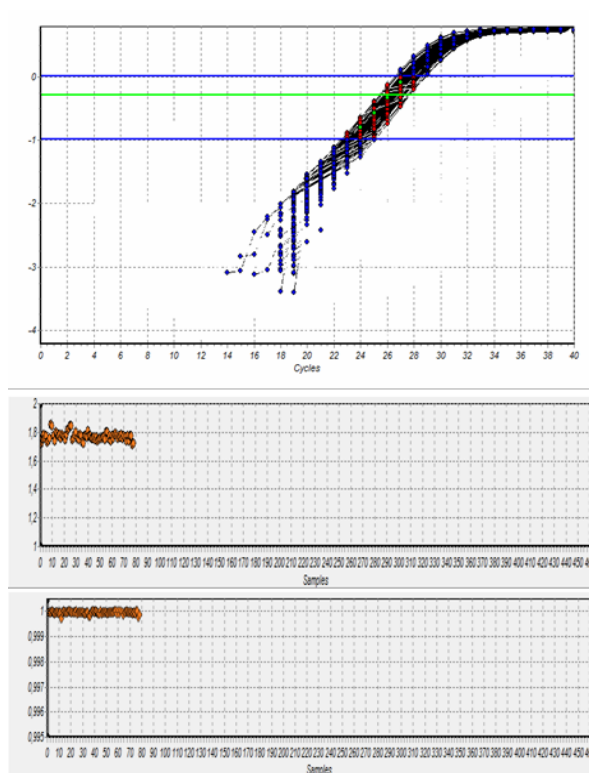


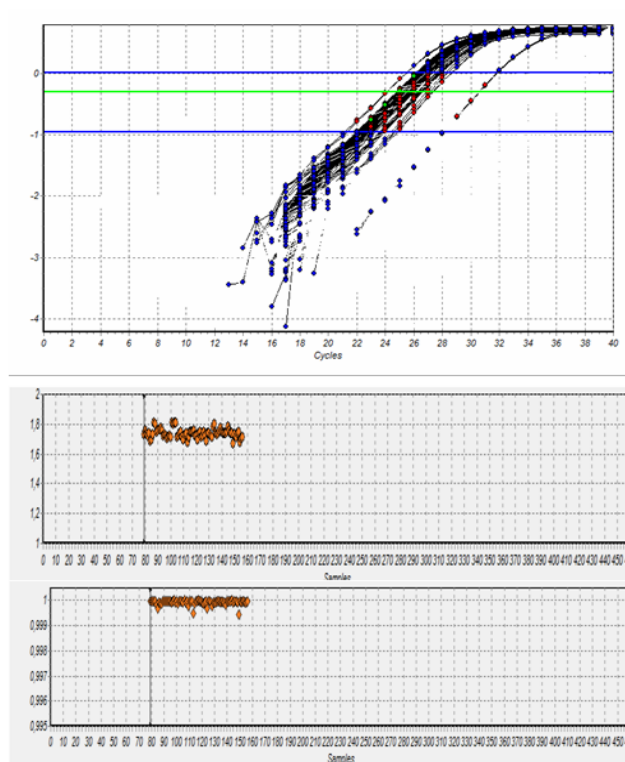
Figura 29: Curvas de Melting de cada amplicon

En la figura 30 se muestran las gráficas de fluorescencia donde se recoge el proceso de amplificación de cada uno de los amplicones (*Nos3*, *Mmp9*, *Mmp2*, *Fbn1* y *Fbn2*, *Tgf- β*). La Fase II comprende entre las dos líneas azules y la línea verde corresponde al umbral. En las graficas inferiores de cada curva se puede observar la eficiencia de amplificación para cada muestra, con valores de uno (amplificación nula) a 2 (máximo de amplificación) y los coeficientes de correlación, de 0,995 hasta 1. De estas gráficas se obtuvieron posteriormente los valores medios de las eficiencias de amplificación y los valores medios de los coeficientes de correlación.

Nos3



Tgf- β



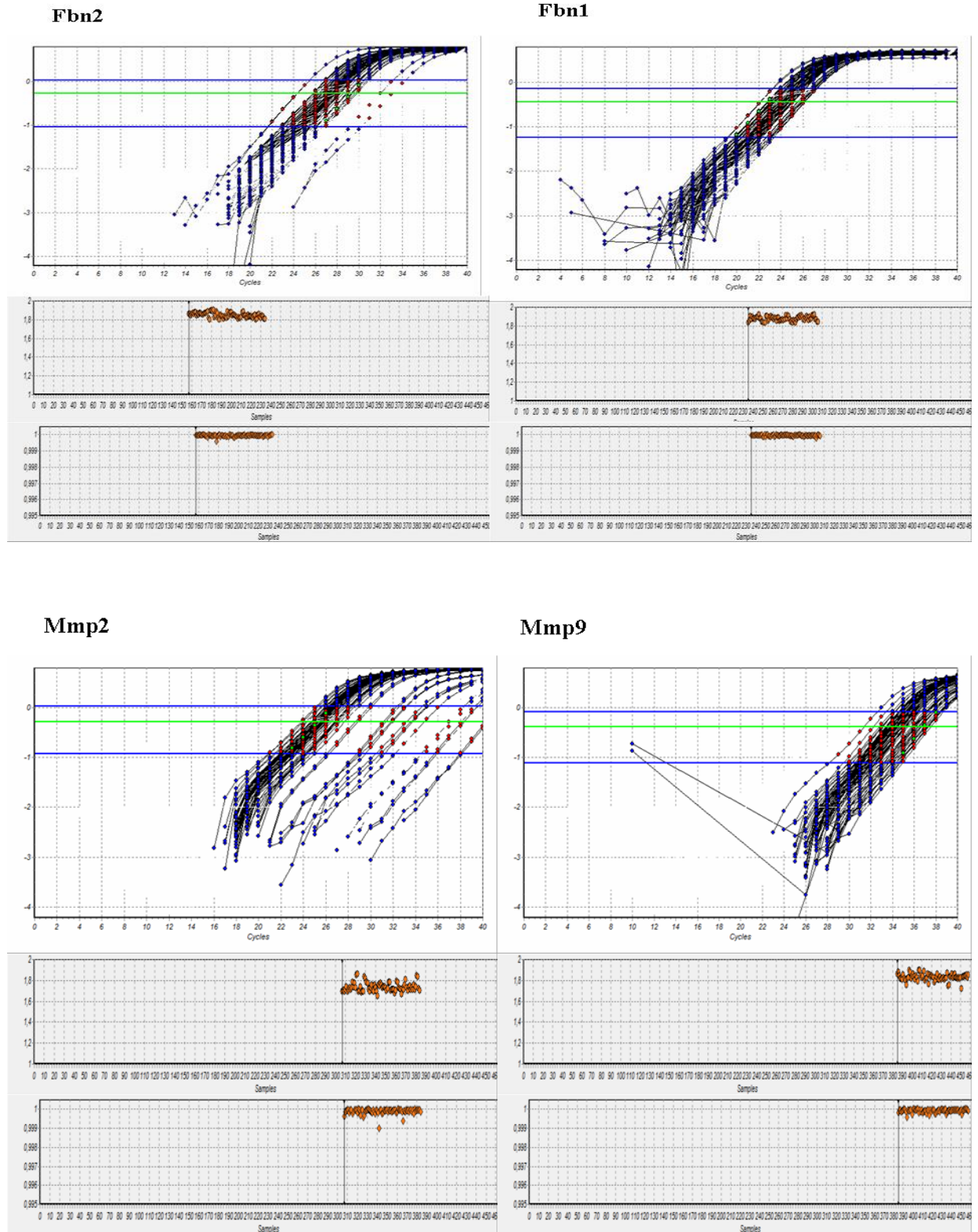


Figura 30: Curvas de Amplificación de los genes estudiados

Las gráficas de la figura 31 muestran la expresión relativa de los genes *Nos3*, *Mmp9*, *Mmp2*, *Fbn1* y *Fbn2*, *Tgf-β* normalizados por el gen de referencia *Cdk1β* en los tres grupos de animales (H, T-TAV, T-BAV) para los dos grupos de edad analizados (adultos y viejos). Para los genes *Mmp2*, *Fbn1*, *Fbn2* y *Tgf-β* no se detectaron diferencias significativas entre animales de distinta edad de ninguno de los tres grupos experimentales (H, T-TAV, T-BAV), por lo que los datos se agruparon sin tener en cuenta la edad (Figs. 32, 33). Los niveles de expresión de estos genes se compararon agrupando los datos en función de la cepa y la morfología valvular (H vs. T-TAV vs. T-BAV), solo de la cepa (H vs. T) o solo de la morfología valvular (TAV vs. BAV). Para los genes *Nos3* y *Mmp9*, los datos de expresión se compararon teniendo en cuenta la cepa, la morfología valvular y la edad (Figs. 31A, F), la cepa y la edad (Figs. 34B, D) o la morfología valvular y la edad (Figs. 34 A, C).

La expresión de *Nos3* aumentaba significativamente con la edad en la aorta de los animales control (cepa H, Figs. 31A, 34B), pero no en la de los animales de la cepa afecta (cepa T), tomados en conjunto (Fig. 34B) o considerando también la morfología valvular (Fig. 31A). Se obtuvieron resultados similares al comparar animales con VAT y VAB (Fig. 34A), es decir, la expresión de *Nos3* aumentaba con la edad en los primeros pero no en los segundos, en los que la expresión era ya elevada en los adultos, aunque la diferencia era menos pronunciada en este caso.

La expresión de *Mmp9* también aumentaba con la edad en todos los grupos estudiados (Figs. 31F, 34C,D), aunque las diferencias fueron significativas solo cuando se agrupaban todos los animales con VAT (Fig. 34C), los animales con VAT de la cepa afecta (Fig. 31F) o todos los animales de la cepa afecta (Figs. 34D).

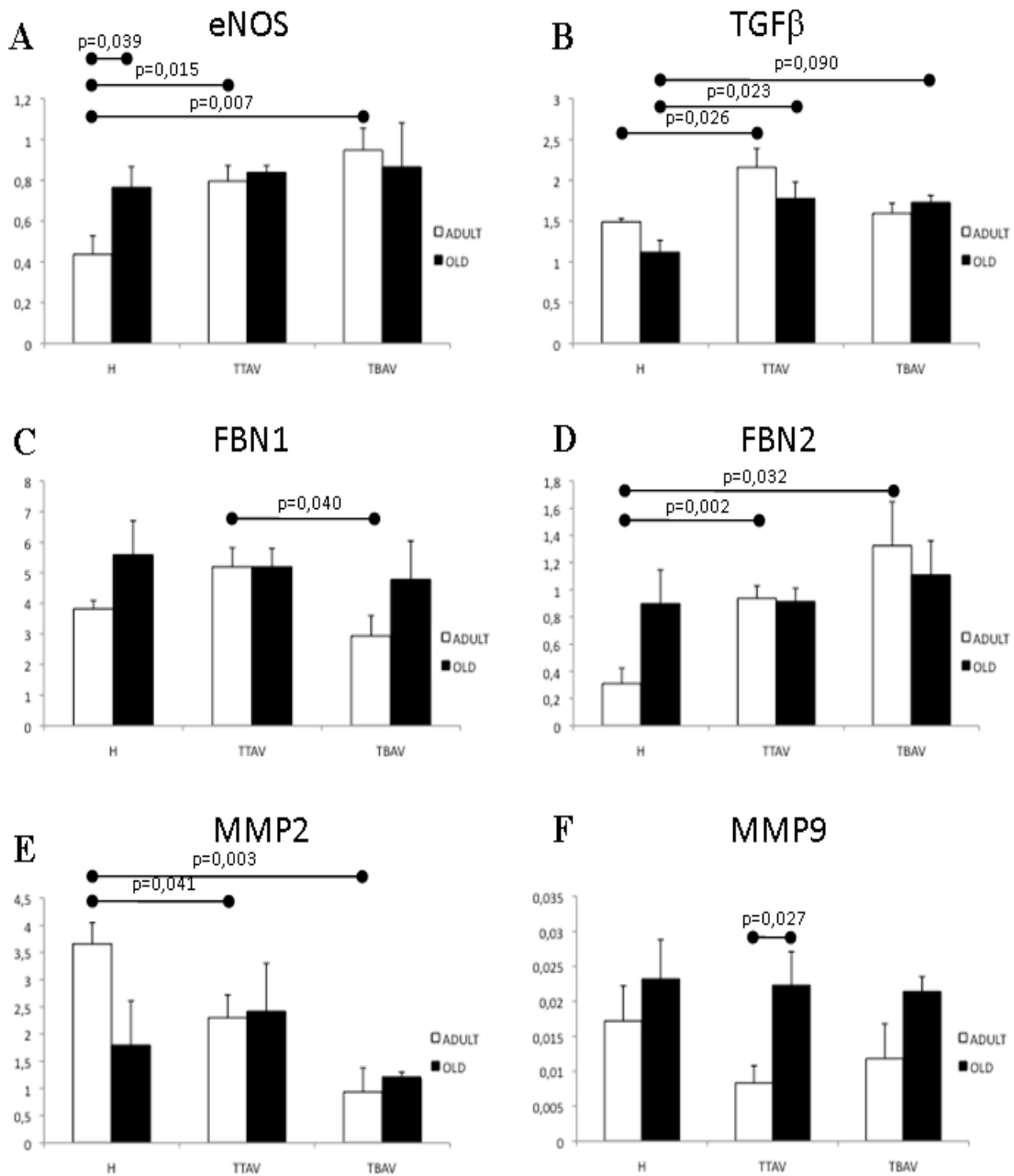


Figura 31: Expresión de los genes *eNOS*, *Tgfβ*, *Fbn1*, *Fbn2*, *Mmp2*, *Mmp9* normalizadas con *Cdkn1β* en los tres grupos de animales H-VAT, T-VAT y T-VAB para los dos intervalos de edad estudiados.

Los niveles de expresión de *Tgfβ* en la aorta eran significativamente mayores en la cepa afecta que en la control, tanto si se consideraba el morfotipo valvular (Fig. 32A) como si no (Figs. 32B). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre animales con VAT y VAB, tanto si se tenía en cuenta la cepa de origen (Fig. 32A) como si no (Fig. 32C).

Los niveles de expresión de *Mmp2* en la aorta eran significativamente mayores en los animales con VAT, tanto si se consideraba la cepa de origen (Fig. 32D) como si no (Fig. 32F). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre animales de las cepas H y T cuando no se tenía en cuenta el morfotipo valvular (Fig. 32E).

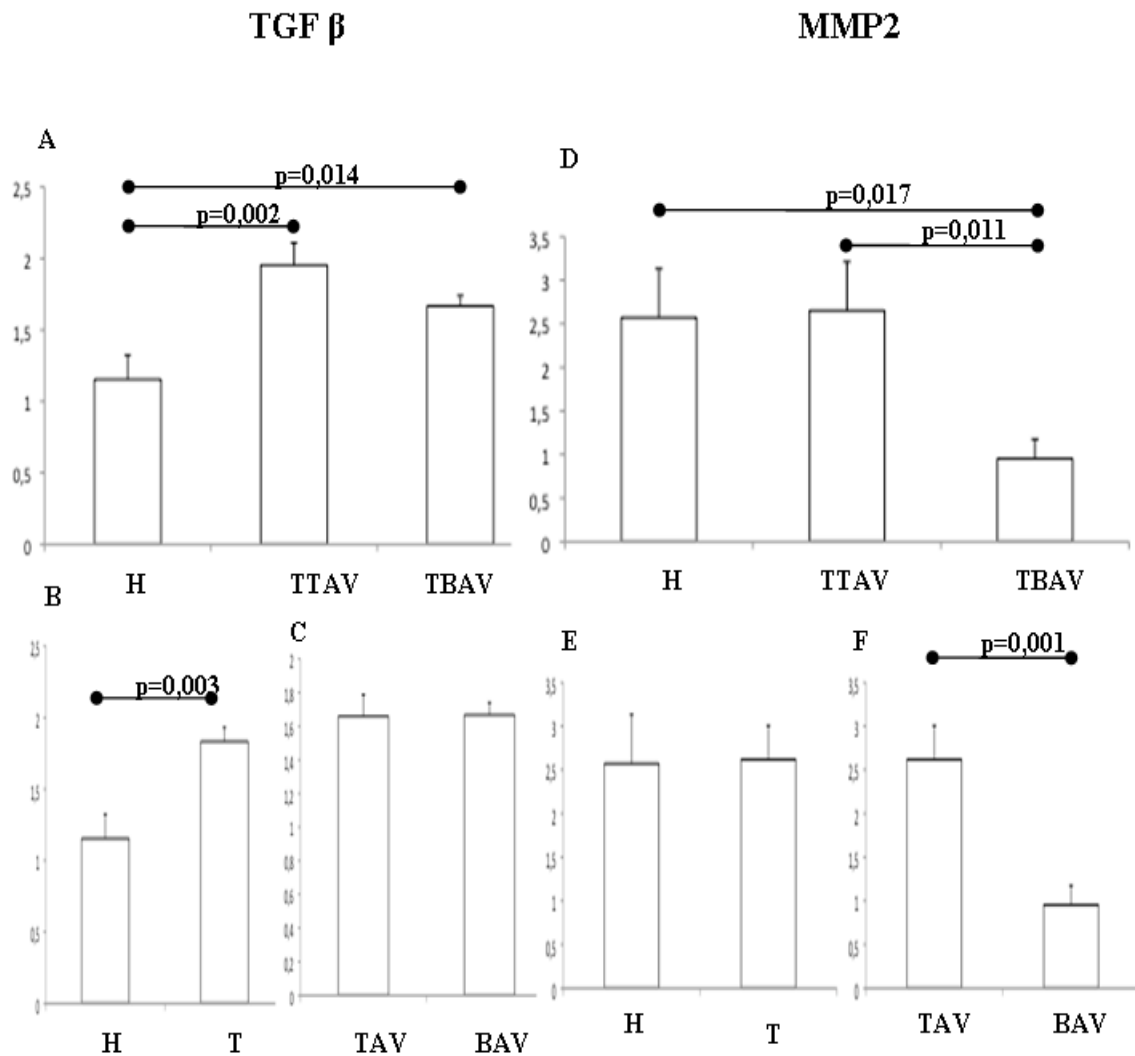


Figura 32: Expresión de *Tgfβ* (A-B) y de *Mmp2* (D-F) con los datos agrupados en función de la cepa y la morfología valvular (H, T-TAV, T-BAV) (A,D), solo de la cepa (H,T) (B,E) o solo de la morfología valvular (TAV, BAV) (C,F).

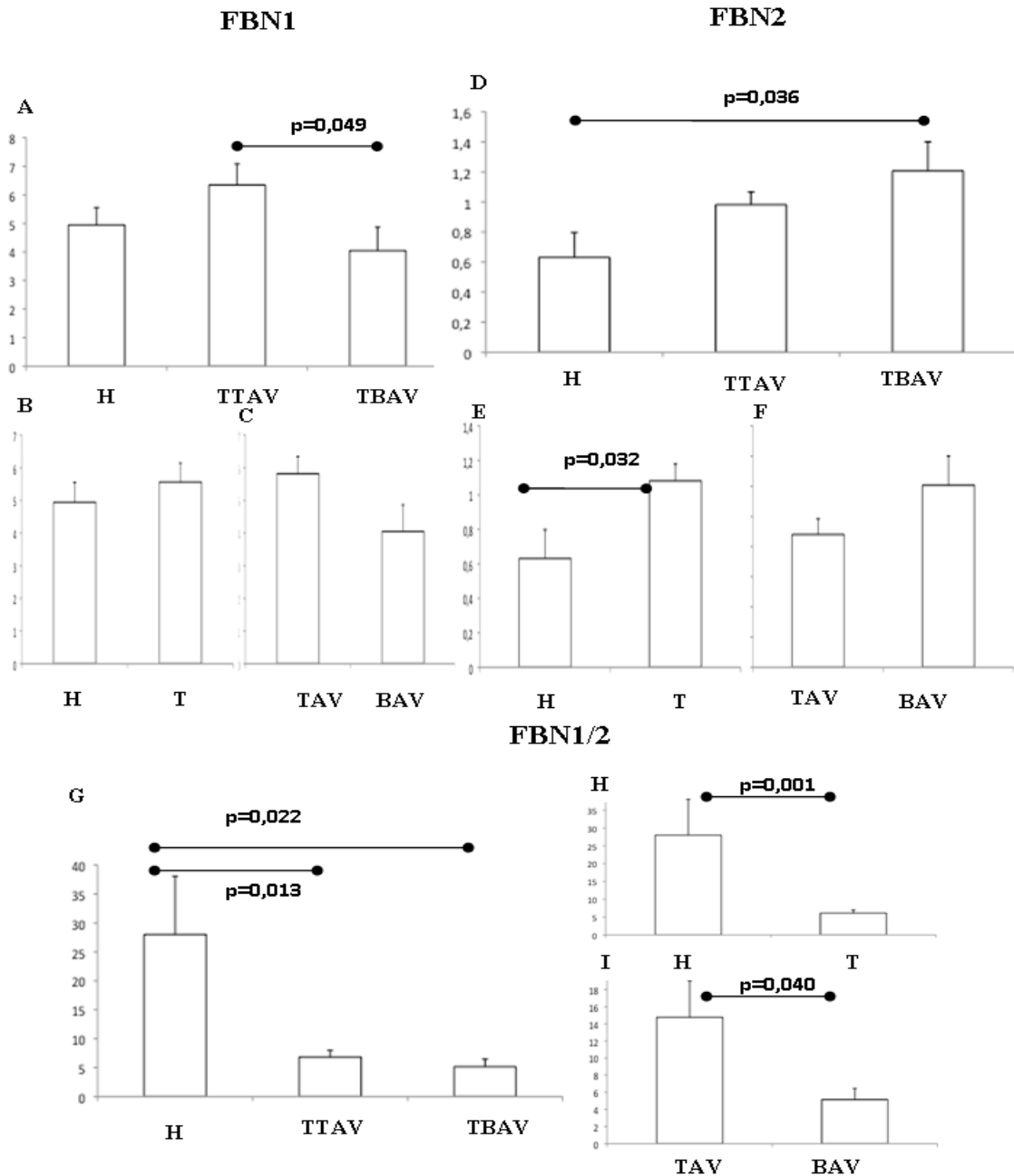


Figura 33: Expresión de *Fbn1* (A-C), de *Fbn2* (D-F) y ratio *Fbn1/2* (G-I) con los datos agrupados en función de la cepa y la morfología valvular (H, T-TAV, T-BAV) (A,D,G), solo de la cepa (H,T) (B,E,H) o solo de la morfología valvular (TAV, BAV) (C,F,I).

Los datos de expresión de *Fbn* fueron diferentes para cada isoforma (Fig. 33). La expresión de *Fbn1* era similar en todos los grupos analizados (Fig. 33A-C). Solo se encontraron diferencias significativas entre los animales con VAT y VAB de la familia afecta, aunque el nivel de significación era muy baja (0,049, Fig. 33A). Sin embargo, sí se detectó un patrón de diferencias consistentes para la *Fbn2* (Fig. 33D-F). La expresión

de esta isoforma era significativamente más elevada en la aorta de los animales de la cepa afecta (Fig. E), especialmente en los especímenes con VAB (Fig. 33D). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre animales con VAT y VAB cuando no se tenía en cuenta la cepa de origen (Fig. 33F).

El ratio de expresión *Fbn1/Fbn2* en cada individuo era acorde con los datos de expresión de cada isoforma. Este ratio era notable y significativamente mayor en la aorta de los animales de la cepa control (Figs. 33 G,H) y también en los animales con VAT cuando no se tenía en cuenta la cepa de origen de los animales (Fig. 33 I). No se observaron diferencias significativas entre animales con VAT y VAB de la cepa T (Fig. 33G).

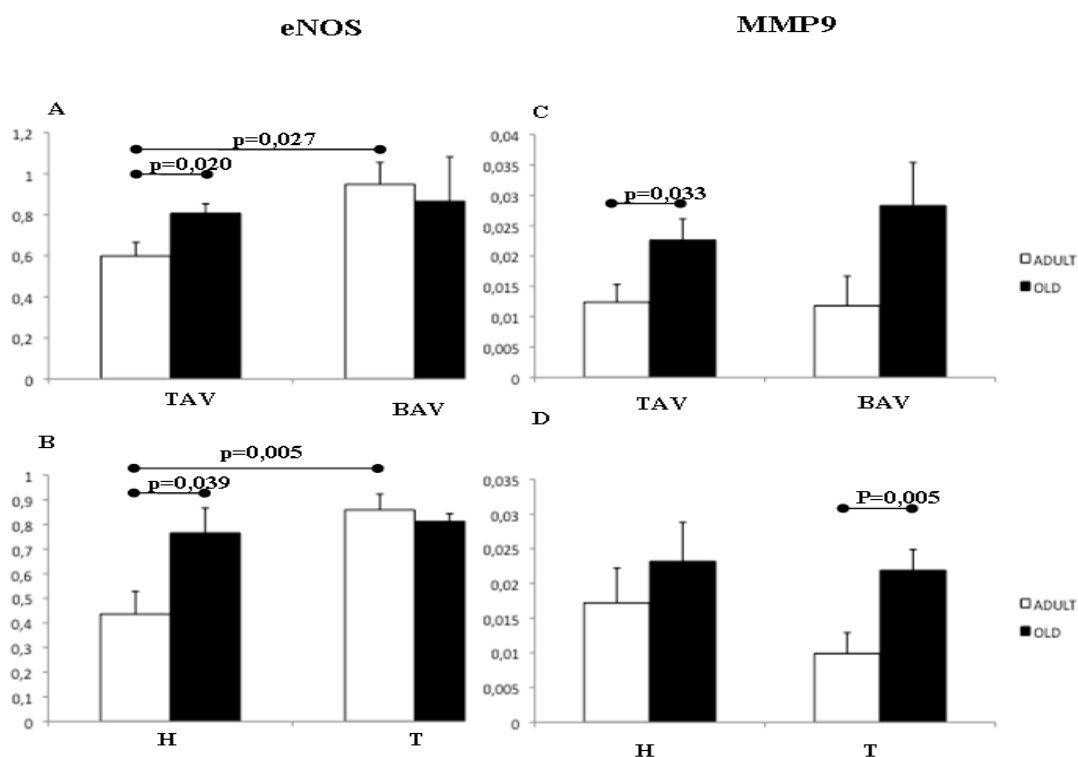


Figura 34: Expresión de los genes *eNOS* y *Mmp9* con los datos agrupados en función de la morfología valvular y la edad (A,C) o de la cepa y la edad (B,D).vs T (B y D)

C. DISCUSIÓN

La identificación de la expresión diferencial de genes en tejidos patológicos mediante el método de la RT-qPCR es una estrategia común para descubrir biomarcadores de enfermedad y vías moleculares implicadas en la progresión o la predisposición a las enfermedades. La dilatación de la aorta ascendente en pacientes con VAB es una patología predominante de la aorta, cuya etiología es poco conocida. Diversos estudios han sido dirigidos a la identificación de los mecanismos moleculares de esta enfermedad y sus biomarcadores, mediante la investigación de la expresión genética diferencial en aortas dilatadas de pacientes con VAB comparadas con individuos con VAT. Sin embargo, la mayoría de estos estudios han usado los genes de referencia clásicos para la normalización, sin validar antes su uso. Sin embargo, se ha demostrado que los genes de referencia clásicos no son adecuados para la normalización de datos de expresión obtenidos de diferentes tipos de tejido humano, incluido el miocardio, válvula aórtica y tejido aórtico (Radonic et al., 2004; Pilbrow et al., 2008; Guo et al., 2007; Yperman et al., 2004; Spanakis et al., 1993; Solanas et al., 2001, Vesentini et al., 2012; Henn et al., 2014).

Sobre la base de estos antecedentes, se han realizado sendos estudios dirigidos a identificar genes de referencia apropiados para la normalización del ARNm, que muestren una expresión estable en la aorta de pacientes y de hámsteres. Para las muestras humanas se han testado seis genes de referencia, *CDKN1 β* , *POLR2A*, *CASC3*, *ABL1*, *HMBS* y *TBP*, ya que previamente fueron validados en estudios de expresión génica para muestras de tejido miocárdico humano y de roedores (Vesentini et al., 2012; Noutsias et al., 2008; Brattelid et al., 2010; Moniotte et al., 2001). Para las muestras de hámster, se han testado 10 genes de referencia, *G3pdh*, *β 2m*, *Hprt*, *Rpl18*, *β -actin*, *γ -*

actin, *Pecam-1*, *Cdkn1 β* , *Polr2a* y *Casc3*, los siete primeros fueron previamente usados como housekeeping en estudios de expresión génica con distintos tipos de tejido de hámster y los otros 3 genes fueron los más estables utilizando aorta ascendente de humanos, identificados previamente en el estudio con pacientes.

Para identificar a los genes de referencia más estables, se emplearon tres softwares, geNorm, NormFinder y Bestkeeper, que son considerados los métodos más fiables para la validación de genes de referencia (Vandesompele et al., 2002; Andersen et al., 2004; Pfaffl et al., 2004). Tanto en los estudios con muestras de pacientes como de animales se obtuvieron pequeñas diferencias en el ranking de estabilidad ofrecido por cada software. Esto posiblemente se debiera a las diferencias de los datos de entrada, los parámetros empleados por cada algoritmo y los modelos matemáticos que emplea cada software (Chen et al., 2013; Zyzynska et al., 2012). Nuestra pretensión fue obtener datos consistentes, refrendados por la coincidencia de tres algoritmos independientes.

Los tres algoritmos empleados para comparar la estabilidad de los seis genes candidatos humanos y los 10 genes candidatos de hámster coincidieron en que el gen más estable en las poblaciones de nuestros estudios era el gen *CDKN1 β* /*Cdkn1 β* , respectivamente. En las muestras de pacientes, los siguientes genes candidatos más estables fueron *POLR2A* y *CASC3*, mientras que en las de hámster fueron *G3pdh* y *Polr2a*. El hecho de que dos de los tres genes más estables coincidan para muestras de aorta de pacientes y hámster refuerza la hipótesis de que la cepa T es un modelo apropiado para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la dilatación aórtica asociada a la VAB en humanos.

Aunque la mayoría de los estudios de RT-qPCR utilizan un solo gen de referencia para la normalización, algunos autores proponen usar dos o más genes de referencia validados para asegurar una buena normalización (Vandesompele et al., 2002). Uno de los algoritmos utilizados en los dos estudios (GeNorm) ofrecía, como resultado, el número de genes de referencia necesarios para normalizar los datos de expresión. Mientras que las muestras de hámster requerían el número mínimo de genes de referencia (GeNorm parte de la base de que el número mínimo es dos), las muestras de los pacientes requerían tres genes de referencia, de acuerdo con este algoritmo, para una correcta normalización.

Utilizando uno (*CDKN1B*) o tres (*CDKN1B*, *POLR2A* y *CASC3*) genes de referencia para la normalización, se analizó la expresión de cuatro genes (*FBN1*, *FBN2*, *MMP2* y *MMP9*) en la aorta de pacientes con VAT o VAB y con aorta dilatada o normal. Los resultados más relevantes fueron los referentes a la *FBNs*. En la población estudiada, se observó que los pacientes con VAB presentaban un incremento en la expresión de las *FBNs*, especialmente de la *FBN2*, en la pared de la aorta ascendente, independientemente de la normalización con uno o tres genes de referencia (Fig. 16). La comparación entre los cuatro grupos (NDVAT, DVAT, NDVAB y DVAB) reflejó diferencias similares, aunque la significación fue menor en algunos casos, probablemente por el limitado tamaño muestral (Fig. 15). El ratio de expresión *FBN1/FBN2* fue mayor en la aorta de los pacientes con VAB y con DA, pero sin alcanzar diferencias significativas (Fig. 18).

El presente estudio es el primero en sugerir que la *FBN2* puede estar implicada en la enfermedad de la VAB. Aunque algunos estudios habían planteado la hipótesis de

que defectos en la deposición de *FBN1* podrían estar implicados en el desarrollo de la DA asociada a la VAB (Fedak et al., 2003), la posible participación de la *FBN2* nunca había sido investigada.

Las proteínas *FBN1* y *FBN2* tienen funciones que se superponen parcialmente en la formación de las microfibrillas de la MEC. *FBN1* es el principal componente de las microfibrillas en adultos, mientras que *FBN2* se expresa principalmente durante la vida embrionaria y postnatal. Además de formar parte estructural de la microfibrillas, *FBN1* y *FBN2* regulan la homeostasis de la matriz vascular mediante la modulación de la actividad de TGF β y BMP, respectivamente. Curiosamente los ratones mutantes, deficientes en *FBN2*, muestran huesos más cortos con sindactilia, mientras que los ratones deficientes en *FBN1* muestran huesos largos, un fenotipo similar al de los pacientes con el síndrome de Marfan.

En base a estos antecedentes, los resultados de nuestro estudio permiten postular que un incremento de la *FBN2* en aorta de pacientes con VAB podría alterar la estructura de las microfibrillas, causando un defecto en la deposición de la elastina o una alteración de la vía de señalización de BMP afectando a la homeostasis del tejido. Sin embargo, nuestros datos no permiten descartar que el incremento de la *FBN2* en la pared vascular sea la consecuencia en lugar de la causa de los defectos de la media aórtica asociada a la VAB. El estudio de las vías modulares asociadas a la expresión de *FBN2* en la aorta podría ayudar a resolver esta cuestión.

Actualmente es ampliamente aceptado que la asociación de la VAB con la DA es consecuencia, al menos en una proporción de los pacientes afectados, de un defecto congénito común (Fedak et al., 2002; Siu et al., 2010; Verma et al., 2014). Sin embargo,

sigue sin conocerse la conexión entre la embriología de la VAB y el desarrollo de los defectos estructurales de la pared de la aorta. Durante el desarrollo embrionario, la *FBN2* esta involucrada no solo en la formación de las microfibrillas elásticas, sino también en el proceso de transformación endocardio-mesenquima responsable de la formación de los cojines endocárdicos del corazón embrionario (Rongish et al., 1998; Waldo et al., 1999). Algunos estudios recientes han demostrado que la formación de la VAB es resultado de anomalías en la formación de los cojines endocárdicos o en la tabicación del tracto de salida embrionario, donde los cojines endocárdicos también participan (Fernandez et al., 2009; Laforest et al., 2011). Estos datos permiten especular sobre la relación etiologica entre la VAB y la DA. Un aumento de la expresión de *FBN2* durante el desarrollo del tracto de salida cardiaco podría alterar la formación de los cojines endocárdicos, induciendo la formación de VAB, mientras que el exceso de *FBN2* en la matriz extracelular aórtica adulta podría influir en el desarrollo de la DA. Aunque son necesarios nuevos datos que sustenten esta idea, el hecho de que la *FBN2* afecte específicamente a la formación de la válvula y a la histoarquitectura de la aorta es lo suficientemente sugerente para proponer esta hipótesis.

Las MMPs juegan un papel significativo en la homeostasis del tejido conectivo (Raffetto et al., 2008). Se ha sugerido que las MMP1, 2 y 9 están implicadas en el desarrollo de DA, ya que su actividad proteica se ve incrementada en las aortas aneurismáticas de pacientes con VAB (Boyum et al., 2004). Sin embargo, algunos estudios no han detectado diferencias de expresión de las MMPs entre aortas normales y dilatadas de pacientes con VAT y VAB (Wilton et al., 2008). Nuestros datos están de acuerdo con esto resultados ya que no se han encontrado diferencias significativas o tendencias en la expresión de MMP2 y MMP9 en la cohorte de pacientes estudiada

(Figs. 15, 17). La actividad de las MMPs se regula a diferentes niveles, siendo los más importantes a nivel fisiológico los inhibidores tisulares que inhiben su actividad (TIMPs) (Zhang et al., 2009). Posiblemente, el incremento de la actividad de las MMPs detectado en la aorta ascendente de pacientes con VAB (Boyum et al., 2004) es consecuencia un cambio en el ratio MMPs/TIMPs (Wilton et al., 2008), en lugar de un incremento de la transcripción de las MMPs.

La cepa T de hámsteres constituye un modelo animal bien establecido de VAB congénita no sindrómica (Fernández et al., 2009; Sans-Coma et al., 2012; Laforest & Nemer., 2012; Prakash et al., 2014; Mathieu et al., 2015). Los animales de esta cepa no muestran dilataciones de la aorta ascendente. Sin embargo, estudios preliminares con este modelo sugerían que los animales de la cepa afecta, tanto portadores como no portadores, presentan alteraciones no patológica en la estructura histológica de la aorta (Fernández et al., 2014).

Aunque aun se desconocen los mecanismos moleculares que conducen a la dilatación de la aorta asociada a la VAB humana, existen numerosas evidencias de la participación de algunos genes, como *Nos3*, *Tgf β* , *Fbn* y *Mmp* en el desarrollo de la aortopatía (Lee et al., 2000; Aicher et al., 2007; Mohamed et al., 2012; Grewal et al., 2014; Henn et al., 2014; Pannu et al., 2005; Matt et al., 2008; Hillebrand et al., 2014; Naito et al., 2016; Fedak et al., 2003; Koullias et al., 2004; Boyum et al., 2004; Wang et al., 2016). Uno de los objetivos principales del presente estudio es comprobar si la expresión de estos genes está alterada en la aorta de los hámsteres de la cepa T. El fin último es determinar si esta cepa constituye un modelo animal apropiado para el estudio del desarrollo, no solo de la VAB, sino de la DA asociada a ésta. Además, de

confirmarse la existencia de alteraciones en la expresión de estos genes en la aorta del modelo hámster, los resultados pueden ayudar a plantear hipótesis sobre los mecanismos que conducen o predisponen al desarrollo de aortopatías y el uso de marcadores moleculares eficaces.

Los datos de expresión de todos los genes analizados se agruparon en función de tres variables, la morfología valvular (VAT y VAB), la cepa (control, H y afecta, T) y la edad (adultos y viejos) y se compararon de manera independiente y también combinada. Conviene recordar que la DA es una patología asociada a la edad en el ser humano. Aunque se han descrito casos de aortopatías asociadas a la VAB en individuos jóvenes, la mayoría de pacientes con VAB y DA desarrollan la aortopatía después de los 50 años de edad, habitualmente antes que los pacientes con VAT. También es preciso incidir en el hecho de que la cepa T es una línea de animales consanguíneos e isogénicos, es decir, todos los individuos tienen la misma composición genética y son homocigotos para la mayoría de sus alelos, por lo que se comportan genéticamente como clones (Festing, 1979, 1993). La variabilidad fenotípica que aparece en esta cepa, por ejemplo diferentes morfotipos valvulares, deriva de factores no genéticos, como el ambiente intrauterino, factores epigenéticos o la denominada variación intangible o “developmental noise” (Sans-Coma et al., 2012).

La expresión de *Nos3* en la aorta era claramente diferente entre animales de las cepas afecta y control. En ésta última, *Nos3* aumentaba significativamente su expresión con la edad, mientras que en la cepa afecta, los niveles de expresión eran ya elevados en los individuos adultos, tanto portadores de VAT como de VAB (Fig. 31A). Los resultados eran los mismos cuando se agrupaban los datos según la morfología valvular

(Fig. 34A) o la cepa (Fig. 34B). Estos datos indican que la cepa T presenta una alteración en los niveles basales de *Nos3* en la aorta ascendente. Se ha demostrado que los pacientes con VAB presentan una sobre-expresión de *Nos3* en áreas concretas de la aorta ascendente (Mohamed et al., 2012; Henn et al., 2014), lo que ha llevado a la hipótesis de que la desregulación de *Nos3* en la aorta induce una cascada de acontecimientos a nivel molecular, que conduce a una desestabilización estructural de la pared aórtica, predisponiendo al desarrollo de la DA (Grewal et al., 2014; Henn et al., 2014).

A diferencia de *Nos3*, los niveles de expresión de *Tgfβ* en la aorta de los hámsteres analizados no variaban con la edad (Fig. 31B). Sin embargo, la expresión de *Tgfβ* era significativamente superior en los animales de la cepa afecta (Fig. 32B), independientemente de la morfología valvular (Figs. 32A, C). Se sabe que diversas mutaciones en el receptor de TGFβ conducen a DA (Pannu H et al., 2005; Loeys et al., 2005). Por otro lado, algunos estudios han mostrado incrementos en la expresión de *TGFβ* en la aorta de pacientes con VAB, asociado al deterioro de la estructura de la media arterial, lo que ha llevado a sugerir que un incremento en la actividad de TGFβ-1 puede contribuir al desarrollo de DA en estos pacientes (Gomez et al., 2009; Hillebrand et al., 2014). Esta serie de datos, junto con el hecho de que TGFβ es una molécula clave en el mantenimiento de la homeostasis de la MEC vascular (Goumans et al., 2009; Kim et al., 2004), permite sugerir que TGFβ es el desencadenante de las alteraciones de la pared aórtica del modelo hámster.

La expresión de las dos isoformas de *Fbn* en la aorta de los hámsteres también mostró variaciones significativas. La *Fbn1* fue la isoforma que menos variaba su

expresión en los distintos grupos experimentales, siendo la diferencia entre los animales con VAT y VAB de la cepa afecta la única significativa y, además, con un nivel de significación bajo (Fig. 33A-C). La *Fbn2*, sin embargo, sí mostró diferencias de expresión significativas, consistentes, principalmente, en un aumento de expresión en la aorta de los animales de la cepa afecta (Fig. 33E) y, especialmente, en los animales con VAB (Fig. 33D). Los cálculos del ratio de expresión *Fbn1/Fbn2* fueron acordes con los datos de expresión de cada isoforma (Figs. 33G-I). Este ratio era muy superior en las aortas de los animales de la cepa control y también en los animales con VAT cuando no se consideraba la cepa de origen. En conjunto, esta serie de datos indica que los animales de la cepa T presentan una sobre-expresión de *Fbn2* en la aorta ascendente, lo que modifica significativamente el ratio de expresión de *Fbn* en la aorta adulta. La *FBNs* es un componente básico de las microfibrillas de la media arterial (Sakai et al., 1986). *FBN2* se expresa principalmente durante el desarrollo embrionario, mientras que la *FBNI* es la principal isoforma en el adulto (Zhang et al., 1994). El hecho de que los hámsteres de la cepa afecta muestren una elevada expresión de la forma embrionaria de la *Fbns* en la aorta es interesante en el contexto de la etiología de la DA. Algunas hipótesis recientes sugieren que la DA asociada a la VAB resulta de un defecto en la maduración de la pared aórtica (Grewal et al., 2014; Jiao et al., 2016).

Por otra parte, la desregulación de la expresión de *Fbn* concuerda con los datos de expresión de *Tgfβ*, que se sobre-expresa, igual que *Fbn2*, en la aorta de los animales de la cepa T. Es conocido que *Tgfβ* está implicado en la regulación de *Fbn* y viceversa (Isogai et al., 2003; Kim et al., 2004). Por último, es interesante resaltar que la sobre-expresión de *Fbn2* coincide con los datos obtenidos en los pacientes, descritos en la publicación 2. Estos datos podrían ser relevantes para explicar la asociación etiológica

entre la VAB y la DA ya que, como se ha comentado anteriormente, *Fbn2* interviene tanto en la formación de los primordios valvulares, como e la histoarquitectura de la aorta.

Mientras que la expresión de *Mmp2* no parecía variar de manera consistente con la edad de los animales (Fig. 31E), los niveles de expresión de *Mmp9* aumentaba con la edad, aunque las diferencias eran significativas solo para el grupo con VAT de la cepa T (Fig. 31F). En cualquier caso, no se detectaron diferencias en la expresión de *Mmp9* entre animales de distintas cepas o con distintos morfotipos valvulares (Figs. 34C, D). Con respecto a *Mmp2*, sí se detectó una reducción significativa de la expresión en la aorta de los animales con VAB (Figs. 32D, F). Estos resultados son difíciles de interpretar, pero parecen indicar diferencias en la homeostasis de la media arterial asociados a la VAB. Por otra parte, el estudio en pacientes descrito en la Publicación 2 sugería que, aunque se tiene claro que la actividad de MMP-2 y -9 juega un papel importante en el desarrollo de la DA asociado a la VAB, los cambio en esta actividad parecen no depender de cambios en la expresión génica, sino, probablemente, en el ratio de proteinasas y sus inhibidore (TIMPs). Los datos obtenidos del estudio con el modelo animal apoyan esta hipótesis.

En resumen, los resultados de este estudio indican que la expresión de *Nos3*, *Tgfb β* y *Fbn2* se encuentra elevada en la aorta de los animales de la cepa T, al igual que en algunos grupos de pacientes con DA asociada a VAB. Se puede concluir que la aorta de los animales de la cepa T presenta alteraciones moleculares similares a las de los pacientes con DA. Proponemos que la cepa T constituye un modelo animal para una población de pacientes con predisposición a DA asociada a VAB.

Aunque los resultados de este estudio no permiten plantear una hipótesis mecanística completa, los datos moleculares junto con los histomorfológicos preliminares sí permiten proponer que defectos en la expresión de *Tgfb* y *Fbn2* en la media aórtica pueden alterar la estructura básica de la lamela elástica y causar un incremento de la necrosis celular asociada a la edad, mediado por la sobre-expresión de *Nos3*.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES FINALES

1.- El gen *CDKN1β* es un gen de referencia apropiado para la normalización de los datos de expresión procedentes de muestras de tejido aórtico humano y de hámster, en el contexto de la aortopatía asociada a la válvula aórtica bicúspide. En caso de que se requiera más de un gen de referencia para la normalización, los genes *POLR2A* y *CASC3* son apropiados para los estudios en humanos, mientras que *G3pdh* es apropiado para el hámster.

2.- Para los estudios de expresión génica mediante el método de la PCR cuantitativa a tiempo real, los genes de referencia clásicos no siempre muestran una estabilidad apropiada para la normalización de los datos. Además, la estabilidad de estos genes varía en función de la población seleccionada para el estudio. Proponemos que para este tipo de estudios, y siempre que se utilice una nueva cohorte de muestras, se apliquen métodos específicos para la identificación de genes de referencia para la correcta normalización de los datos de expresión.

3.- Los pacientes con válvula aórtica bicúspide presentan un incremento en los niveles de expresión de Fibrilinas, especialmente FBN2, en la pared de la aorta ascendente, independientemente de que ésta esté dilatada. La FBN2 puede jugar un papel en la fisiopatología de la dilatación aórtica asociada a la válvula aórtica bicúspide.

4.- En el modelo hámster con válvula aórtica bicúspide, la aorta ascendente muestra alteraciones en la expresión de genes relevantes para el desarrollo de la dilatación aórtica: *Tfgβ*, *Fbns* y *eNOS*. Proponemos que la cepa de animales afecta constituye un

modelo para la enfermedad de la válvula aórtica bicúspide que incluye, además de la valvulopatía, la predisposición a la aortopatía.

5.- Dos de los tres genes de referencia más estables coinciden en la aorta normal y aneurismática, humana y del hámster, lo que refuerza la bondad del hámster como modelo animal para estudios sobre las alteraciones de la pared aórtica asociadas a la válvula aórtica bicúspide.

6.- La cepa de hámster afecta puede servir de modelo para una población de pacientes en los que la asociación entre válvula aórtica bicúspide y dilatación aórtica es consecuencia de una etiología común, basada en la desregulación de la expresión de *Tfgβ* y *Fbn2*. Esta desregulación puede causar 1) alteraciones en los cojines endocárdicos durante la vida embrionaria, que predisponen a la formación de válvula aórtica bicúspide y 2) alteraciones histo-estructurales en la media aórtica, que predisponen al desarrollo de dilatación aórtica.

7.- La alteración en la actividad de las Metaloproteasas MMP-2 y -9 en la aorta aneurismática no resulta de cambios en su expresión génica sino, probablemente, de cambios postranscripcionales relacionados con la actividad de sus inhibidores (TIMP).

COPIA DE LOS TRABAJOS PUBLICADOS

Selection of reference genes for quantitative real time PCR (qPCR) assays in tissue from human ascending aorta.

Rueda-Martínez C, Lamas O, Mataró MJ, Robledo-Carmona J, Sánchez-Espín G, Jiménez-Navarro M, Such-Martínez M, Fernández B. PLoS One. (5) 19;9
2014 May e97449 eCollection 2014. PubMed PMID: 24841551; PubMed Central
PMCID: PMC4026239.

Resumen: Dilatation of the ascending aorta (AAD) is a prevalent aortopathy that occurs frequently associated with bicuspid aortic valve (BAV), the most common human congenital cardiac malformation. The molecular mechanisms leading to AAD associated with BAV are still poorly understood. The search for differentially expressed genes in diseased tissue by quantitative real-time PCR (qPCR) is an invaluable tool to fill this gap. However, studies dedicated to identify reference genes necessary for normalization of mRNA expression in aortic tissue are scarce. In this report, we evaluate the qPCR expression of six candidate reference genes in tissue from the ascending aorta of 52 patients with a variety of clinical and demographic characteristics, normal and dilated aortas, and different morphologies of the aortic valve (normal aorta and normal valve n = 30; dilated aorta and normal valve n = 10; normal aorta and BAV n = 4; dilated aorta and BAV n = 8). The expression stability of the candidate reference genes was determined with three statistical algorithms, GeNorm, NormFinder and Bestkeeper. The expression analyses showed that the most stable genes for the three algorithms employed were CDKN1 β , POLR2A and CASC3, independently of the structure of the aorta and the valve morphology. In conclusion, we propose the use of these three genes as reference genes for mRNA expression analysis in human ascending aorta. However, we suggest searching for specific reference genes when conducting qPCR experiments with new cohort of samples.

DOI: 10.1371/journal.pone.0097449

Fibrillin 2 is upregulated in the ascending aorta of patients with bicuspid aortic valve
Rueda-Martínez C, Lamas O, Mataró MJ, Robledo-Carmona J, Sánchez-Espín G,
Moreno-Santos I, Carrasco-Chinchilla F, Gallego P, Such-Martínez M, de Teresa E,
Jiménez-Navarro M, Fernández B. Eur J Cardiothorac Surg. 51(1):104-111, 2017 Jan.
Epub 2016 Sep 15. PubMed PMID:27634926

Resumen: **OBJETIVE:** Bicuspid aortic valve (BAV) is the most prevalent congenital cardiac malformation, frequently associated with aortic dilatation (AD). The molecular mechanisms involved in AD and its aetiological link with BAV formation are poorly understood. Altered fibrillin-1 (FBN1) and metalloprotease-2, -9 (MMP2,9) protein activities have been suggested to be involved in BAV aortopathy. In addition, FBN2 participates in embryonic valve formation, but its possible involvement in BAV-associated AD has never been explored. In this report, we evaluate the expression levels of MMP2,9 and FBN1,2 in the ascending aorta of patients with normal or dilated aortas and with tricuspid aortic valve (TAV) or BAV, using appropriate tissue-specific reference genes.

METHODS: Gene expression was quantified by real-time quantitative polymerase chain reaction in 52 patients, using one or three reference genes previously validated in the same patient population.

RESULTS: FBN2 expression was significantly increased in the aortas of patients with BAV compared with individuals with TAV (0.178 ± 0.042 vs 0.096 ± 0.021 , $P = 0.015$), whereas differences in FBN1 did not reach statistical significance (1.946 ± 0.228 vs 1.430 ± 0.114 , $P = 0.090$). When four groups of samples were considered, FBN2 expression was significantly higher in patients with BAV and AD compared with patients with TAV and AD (0.164 ± 0.035 vs 0.074 ± 0.027 , $P = 0.040$). No significant differences were found when FBN1/FBN2 ratio, and MMP2 and MMP9 expression levels were analysed. No linear relationship between aortic diameter and gene expression levels were found.

CONCLUSIONS: BAV patients have an increased FBN (especially FBN2) gene expression level in the ascending aorta, irrespective of dilatation, whereas MMP expression does not change significantly. These results add a new piece of information to the pathophysiology of BAV disease and point to FBN2 as a new molecular player.

DOI: 10.1093/ejcts/ezw277

Identification of Reference Genes for Quantitative Real Time PCR Assays in Aortic Tissue of Syrian Hamsters with Bicuspid Aortic Valve.

Rueda-Martínez C, Fernández MC, Soto-Navarrete MT, Jiménez-Navarro M, Durán AC, Fernández B. PLoS One. 6;11(10):e0164070.2016 Oct. eCollection 2016.

PubMed PMID: 27711171; PubMed Central PMCID: PMC5053431

Resumen: Bicuspid aortic valve (BAV) is the most frequent congenital cardiac malformation in humans, and appears frequently associated with dilatation of the ascending aorta. This association is likely the result of a common aetiology. Currently, a Syrian hamster strain with a relatively high (~40%) incidence of BAV constitutes the only spontaneous animal model of BAV disease. The characterization of molecular alterations in the aorta of hamsters with BAV may serve to identify pathophysiological mechanisms and molecular markers of disease in humans. In this report, we evaluate the expression of ten candidate reference genes in aortic tissue of hamsters in order to identify housekeeping genes for normalization using quantitative real time PCR (RT-qPCR) assays. A total of 51 adult (180-240 days old) and 56 old (300-440 days old) animals were used. They belonged to a control strain of hamsters with normal, tricuspid aortic valve (TAV; n = 30), or to the affected strain of hamsters with TAV (n = 45) or BAV (n = 32). The expression stability of the candidate reference genes was determined by RT-qPCR using three statistical algorithms, GeNorm, NormFinder and Bestkeeper. The expression analyses showed that the most stable reference genes for the three algorithms employed were *Cdkn1 β* , *G3pdh* and *Polr2a*. We propose the use of *Cdkn1 β* , or both *Cdkn1 β* and *G3pdh* as reference genes for mRNA expression analyses in Syrian hamster aorta.

DOI: 10.1371/journal.pone.0164070

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abdulkareem N, Smelt J, Jahangiri M (2013) Bicuspid aortic valve aortopathy: genetics, pathophysiology and medical therapy. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 17(3):554-9. doi: 10.1093/icvts/ivt196. Epub 2013 May 31.
- Aicher D, Urbich C, Zeiher A, Dimmeler S, Schäfers HJ. (2007) Endothelial nitric oxide synthase in bicuspid aortic valve disease. *Ann Thorac Surg*. Apr;83(4):1290-4. PubMed PMID: 17383329.
- Akerberg BN, Sarangam ML, Stankunas K (2015) Endocardial Brg1 disruption illustrates the developmental origins of semilunar valve disease. *Dev Biol* 407:158–172.
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64(15): 5245–5250.
- Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci*. 2003 Jan 15;116(Pt 2):217-24. Review. PubMed PMID: 12482908.
- Apte SS, Parks WC. (2015) Metalloproteinases: A parade of functions in matrix biology and an outlook for the future. *Matrix Biol*. May-Jul;44-46:1-6. doi: 10.1016/j.matbio.2015.04.005. Review. PubMed PMID: 25916966
- Barbour JR, Spinale FG, (2007) Ikonomidis JS. Proteinase systems and thoracic aortic aneurysm progression. *J Surg Res*. May 15;139(2):292-307. Review. PubMed PMID: 17292415.
- Basso C, Boschello M, Perrone C, Mecenero A, Cera A, Bicego D, Thiene G, De Dominicis E. (2004) An echocardiographic survey of primary school children for bicuspid aortic valve. *Am J Cardiol*. Mar 1;93(5):661-3. PubMed PMID: 14996606.
- Biben C, Weber R, Kesteven S, Stanley E, McDonald L, Elliott DA, Barnett L, Köentgen F, Robb L, Feneley M, Harvey RP (2000) Cardiac Septal and Valvular Dysmorphogenesis in Mice Heterozygous for Mutations in the Homeobox Gene Nkx2-5. *Circ Res* 87:888-895.
- Bonderman D, Gharehbaghi-Schnell E, Wollenek G, Maurer G, Baumgartner H, Lang IM (1999) Mechanisms underlying aortic dilatation in congenital aortic valve malformation. *Circulation*. Apr 27;99(16):2138-43. PubMed PMID: 10217654.

- Bosse K, Hans CP, Zhao N, Koenig SN, Huang N, Guggilam A, LaHaye S, Tao G, Lucchesi PA, Lincoln J, Lilly B, Garg V (2013) Endothelial nitric oxide signaling regulates Notch1 in aortic valve disease. *J Mol Cell Cardiol* 60: 27-35.
- Boyum J, Fellingner EK, Schmoker JD, Trombley L, McPartland K, Ittleman FP, Howard AB. (2004) Matrix metalloproteinase activity in thoracic aortic aneurysms associated with bicuspid and tricuspid aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg.* Mar;127(3):686-91. PubMed PMID: 15001896.
- Brattelid T, Winer LH, Levy FO, Liestøl K, Sejersted OM, et al. (2010) Reference gene alternatives to Gapdh in rodent and human heart failure gene expression studies. *BMC Mol Biol* 11: 22. doi: 10.1186/1471-2199-11-22.
- Carmeliet P, Moons L, Collen D (1998) Mouse models of angiogenesis, arterial stenosis, atherosclerosis and hemostasis. *Cardiovasc Res* 39(1):8-33.
- Chen G, Zhao L, Feng J, You G, Sun Q, et al. (2013) Validation of reliable reference genes for real-time PCR in human umbilical vein endothelial cells on substrates with different stiffness. *PLoS One* 8(6):e67360. doi: 10.1371/journal.pone.0067360.
- Collins MJ, Butany J, Borger MA, et al. (2008) Implications of a congenitally abnormal valve: a study of 1025 consecutive excised aortic valves. *J Clin Pathol* 61:530–536.
- Cripe L, Andelfinger G, Martin LJ, et al. (2004) Bicuspid aortic valve is heritable. *J Am Coll Cardiol* 44:138-143.
- Della Corte A, Bancone C, Dialetto G, et al. (2014) Towards an individualized approach to bicuspid aortopathy: different valve types have unique determinants of aortic dilatation. *Eur J Cardiothorac Surg* 45:e118–124.
- Dupuis LE, Osinska H, Weinstein MB, Hinton RB, Kern CB (2013) Insufficient versican cleavage and Smad2 phosphorylation results in bicuspid aortic and pulmonary valves. *J Mol Cell Cardiol* 60: 50-59.
- Durán AC, Fernández-Gallego T, Fernández B, Fernández MC, Arqué JM, Sans-Coma V (2006) Anomalous origin of the left coronary artery from the right side of the aortic valve in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J Comp Pathol* 134(4):290-296.
- El-Hamamsy I, Yacoub MH. (2009) Cellular and molecular mechanisms of thoracic aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol.* Dec;6(12):771-86. doi: 10.1038/nrcardio.2009.191. Review. PubMed PMID: 19884902
- Ellison JW, Yagubyan M, Majudmar R, et al. (2007) Evidence of genetic locus heterogeneity for familial bicuspid aortic valve. *J Surg Res* 142:28-31.

- Fedak PW, de Sa MP, Verma S, Nili N, Kazemian P, Butany J et al. (2003) Vascular matrix remodeling in patients with bicuspid aortic valve malformations: implications for aortic dilatation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 126:797–806.
- Fedak PW, Verma S, David TE, Leask RL, Weisel RD, Butany J. (2002) Clinical and pathophysiological implications of a bicuspid aortic valve. *Circulation*. Aug 20;106(8):900-4. PubMed PMID: 12186790
- Fernandes S, Khairy P, Graham DA, et al. (2012) Bicuspid aortic valve and associated aortic dilation in the young. *Heart* 98:1014–9.
- Fernández MC, Durán AC, Fernández B, Arqué JM, Anderson RH, Sans-Coma V (2012) Factors other than genotype account largely for the phenotypic variation of the pulmonary valve in Syrian hamsters. *J Anat* 221(1):30-38.
- Fernández B, Durán AC, Fernández-Gallego T, Fernández MC, Such M, Arqué JM, Sans-Coma V (2009) Bicuspid aortic valves with different spatial orientations of the leaflets are distinct etiological entities. *J Am Coll Cardiol* 54(24):2312-2318.
- Fernández B, Arqué JM, Durán AC, Such M, Sans-Coma V. *Cardiocore* (2010) The different etiologies of bicuspid aortic valves: Genetic, pathological, clinical, and surgical implications 45:68-71 - DOI: 10.1016/j.carcor.2009.12.013.
- Fernández MC, Durán AC, Real R, López D, Fernández B, de Andrés AV, Arqué JM, Gallego A, Sans-Coma V (2000) Coronary artery anomalies and aortic valve morphology in the Syrian hamster. *Lab Anim* 34(2):145-154.
- Fernández B, López-García A, Fernández MC, Ramírez-Aragón A, Márquez-Molina JM, Sans-Coma V, Durán AC (2014) Alteraciones de la aorta ascendente en un modelo animal de válvula aórtica bicúspide. *Rev Esp Cardiol* 67 Supl 1:712.
- Festing MF (1979) Properties of inbred strains and outbred stocks, with special reference to toxicity testing. *J Toxicol Environ Health* 5(1):53-68.
- Festing MF (1993) Genetic variation in outbred rats and mice and its implications for toxicological screening. *J Exp Anim Sci* 35(5-6):210-20.
- Franco D, Durán AC, Cardo M, Fernández B, Arqué JM, Sans-Coma V (1994) Mucoid dysplasia of tricuspid and congenital bicuspid aortic valves in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J Comp Pathol* 111(2):175-183.
- Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, Grossfeld PD, Srivastava D. (2005) Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature*. Sep 8;437(7056):270-4. PubMed PMID: 16025100.

- Gharibeh L, Nemer M (2015) The hereditary basis of bicuspid aortic valve disease: a role for screening? *Advances in Genomics and Genetics* 5:11–17.
- Girdauskas E, Borger MA, Secknus MA, Girdauskas G, Kuntze T (2011) Is aortopathy in bicuspid aortic valve disease a congenital defect or a result of abnormal hemodynamics? A critical reappraisal of a one-sided argument. *Eur J Cardiothorac Surg.* Jun;39(6):809-14. doi: 10.1016/j.ejcts.2011.01.001. Review. PubMed PMID: 21342769.
- Gomez D, Al Haj Zen A, Borges LF, Philippe M, Gutierrez PS, Jondeau G, Michel JB, Vranckx R (2009) Syndromic and non-syndromic aneurysms of the human ascending aorta share activation of the Smad2 pathway. *J Pathol* 218:131-142
- Goumans MJ, Liu Z, ten Dijke P. (2008) TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res.* 2009 Jan;19(1):116-27. doi: 10.1038/cr.326. Review. PubMed PMID: 19114994.
- Grewal N, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC, Klautz RJ, Poelmann RE, Duim S, Lindeman JH, Koenraadt WM, Jongbloed MR, Mohamed SA, Sievers HH, Bogers AJ, Goumans MJ. (2014) Bicuspid aortic valve: phosphorylation of c-Kit and downstream targets are prognostic for future aortopathy. *Eur J Cardiothorac Surg.* 46(5):831-9.
- Grewal N, Gittenberger-de Groot AC, Poelmann RE, Klautz RJ, Lindeman JH, Goumans MJ, et al. (2014) Ascending aorta dilation in association with bicuspid aortic valve: a maturation defect of the aortic wall. *J Thorac Cardiovasc Surg* 148(4):1583-90.
- Guo DC, Pannu H, Tran-Fadulu V, Papke CL, Yu RK, Avidan N, Bourgeois S, Estrera AL, Safi HJ, Sparks E, Amor D, Ades L, McConnell V, Willoughby CE, Abuelo D, Willing M, Lewis RA, Kim DH, Scherer S, Tung PP, Ahn C, Buja LM, Raman CS, Shete SS, Milewicz DM. (2007) Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections. *Nat Genet.* Dec;39(12):1488-93. Erratum in: *Nat Genet.* 2008 Feb;40(2):255. PubMed PMID: 17994018.
- Henn D, Perttunen H, Gauer S, Schmied W, Porras C, Such M, Schäfers HJ. (2014) GATA5 and endothelial nitric oxide synthase expression in the ascending aorta is related to aortic size and valve morphology. *Ann Thorac Surg.* Jun;97(6):2019-25. doi: 10.1016/j.athoracsur.2014.02.050. PubMed PMID: 24766859.
- Hillebrand M, Millot N, Sheikhzadeh S, Rybczynski M, Gerth S, Kölbel T, Keyser B, Kutsche K, Robinson PN, Berger J, Mir TS, Zeller T, Blankenberg S, von Kodolitsch Y, Goldmann B. (2014) Total serum transforming growth factor- β 1 is elevated in the entire spectrum of genetic aortic syndromes. *Clin Cardiol.*

Nov;37(11):672-9. doi: 10.1002/clc.22320. PubMed PMID: 25113270.

Hinton RB (2012) Bicuspid aortic valve and thoracic aortic aneurysm: three patients populations, two disease phenotypes, and one shared genotype. *Cardiol Res Pract.* 2012;926975. doi: 10.1155/2012/926975. PubMed PMID: 22970404; PubMedCentralPMCID: PMC3434382.

Huntington K, Hunter AG, Chan KL (1997) A prospective study to assess the frequency of familial clustering of bicuspid aortic valve. *J Am Coll Cardiol* 30:1809-1812.

Ikonomidis JS, Ivey CR, Wheeler JB, Akerman AW, Rice A, Patel RK, Stroud RE, Shah AA, Hughes CG, Ferrari G, Mukherjee R, Jones JA. (2013) Plasma biomarkers for distinguishing etiologic subtypes of thoracic aortic aneurysm disease. *J Thorac Cardiovasc Surg.* May;145(5):1326-33. doi: 10.1016/j.jtcvs.2012.12.027. PubMed PMID: 23312977; PubMed Central PMCID: PMC4057430.

Ikonomidis JS, Jones JA, Barbour JR, Stroud RE, Clark LL, Kaplan BS, Zeeshan A, Bavaria JE, Gorman JH 3rd, Spinale FG, Gorman RC. (2007) Expression of matrix metalloproteinases and endogenous inhibitors within ascending aortic aneurysms of patients with bicuspid or tricuspid aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg.* Apr;133(4):1028-36. PubMed PMID: 17382648.

Isogai Z, Ono RN, Ushiro S, Keene DR, Chen Y, Mazzieri R, Charbonneau NL, Reinhardt DP, Rifkin DB, Sakai LY. (2003) Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *J Biol Chem.* Jan 24;278(4):2750-7. PubMed PMID: 12429738.

Jiao J, Xiong W, Wang L, Yang J, Qiu P, Hirai H, Shao L, Milewicz D, Chen YE, Yang B (2016) Differentiation defect in neural crest-derived smooth muscle cells in patients with aortopathy associated with bicuspid aortic valves. *EBioMedicine* 10:282-90.

Kim ES, Kim MS, Moon A. (2004) TGF-beta-induced upregulation of MMP-2 and MMP-9 depends on p38 MAPK, but not ERK signaling in MCF10A human breast epithelial cells. *Int J Oncol.* Nov;25(5):1375-82. PubMed PMID: 15492828.

Koullias GJ, Korkolis DP, Ravichandran P, Psyrris A, Hatzaras I, Elefteriades JA. (2004) Tissue microarray detection of matrix metalloproteinases, in diseased tricuspid and bicuspid aortic valves with or without pathology of the ascending aorta. *Eur J Cardiothorac Surg.* Dec;26(6):1098-103. PubMed PMID: 15541969.

Laforest B, Andelfinger G, Nemer M (2011) Loss of Gata5 in mice leads to bicuspid aortic valve. *J Clin Invest* 121(7):2876-87.

- Laforest B, Nemer M (2012) Genetic Insights into Bicuspid Aortic Valve Formation. *Cardiol Res Pract.* doi: 10.1155/2012/180297.
- Lee TC, Zhao YD, Courtman DW, Stewart DJ (2000) Abnormal aortic valve development in mice Licking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 101:2345-8.
- Lockhart M, Wirrig E, Phelps A, Wessels A. Extracellular matrix and heart development. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2011 Jun;91(6):535-50. doi: 10.1002/bdra.20810. Review. PubMed PMID: 21618406; PubMed Central PMCID: PMC3144859.
- Loeys BL, Chen J, Neptune ER, Judge DP, Podowski M, Holm T, Meyers J, Leitch CC, Katsanis N, Sharifi N, Xu FL, Myers LA, Spevak PJ, Cameron DE, De Backer J, Hellems J, Chen Y, Davis EC, Webb CL, Kress W, Coucke P, Rifkin DB, De Paepe AM, Dietz HC (2005) A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet* 37:275-281
- Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. (2002) Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest.* Sep;110(5):625-32. PubMed PMID: 12208863; PubMed Central PMCID: PMC151106.
- Loscalzo ML, Goh DL, Loeys B, et al. (2007) Familial thoracic aortic dilation and bicommissural aortic valve: a prospective analysis of natural history and inheritance. *Am J Med Genet A* 143A:1960-1967.
- Losenno KL, Goodman RL, Chu MW. (2012) Bicuspid aortic valve disease and ascending aortic aneurysms: gaps in knowledge. *Cardiol Res Pract.* 2012:145202. doi:10.1155/2012/145202. PubMed PMID: 23198270; PubMed Central PMCID: PMC3503270.
- Macatee TL, Hammond BP, Arenkiel BR, Francis L, Frank DU, Moon AM (2003) Ablation of specific expression domains reveals discrete functions of ectoderm- and endoderm-derived FGF8 during cardiovascular and pharyngeal development. *Development* 130:6361-6374.
- Makki N, Capecchi MR (2012) Cardiovascular defects in a mouse model of HOXA1 syndrome. *Human Molecular Genetics* 21(1):26-31.
- Mangini A, Lemma M, Contino M, et al. (2010) Bicuspid aortic valve: differences in the phenotypic continuum affect the repair techniques. *Eur J Cardiothorac Surg* 37:1015–1020.

- Mathieu P, Bossé Y, Huggins GS, Corte AD, Pibarot P, Michelena HI, et al. (2015) The pathology and pathobiology of bicuspid aortic valve: State of the art and novel research perspectives. *J Pathol Clin Res* 1(4):195-206.
- Matt P, Habashi J, Carrel T, Cameron DE, Van Eyk JE, Dietz HC. (2008) Recent advances in understanding Marfan syndrome: should we now treat surgical patients with losartan? *J Thorac Cardiovasc Surg.* Feb;135(2):389-94. doi: 10.1016/j.jtcvs.2007.08.047. Review. PubMed PMID: 18242274.
- McBride KL, Garg V (2011) Heredity of bicuspid aortic valve: is familial screening indicated? *Heart* 97:1193-1195.
- McKellar SH, Tester DJ, Yagubyan M, Majumdar R, Ackerman MJ, Sundt TM 3rd. (2007) Novel NOTCH1 mutations in patients with bicuspid aortic valve disease and thoracic aortic aneurysms. *J Thorac Cardiovasc Surg.* Aug;134(2):290-6. PubMed PMID: 17662764.
- Michelena HI, Prakash SK, Della Corte A, Bissell MM, Anavekar N, Mathieu P, Bossé Y, Limongelli G, Bossone E, Benson DW, Lancellotti P, Isselbacher EM, Enriquez-Sarano M, Sundt TM 3rd, Pibarot P, Evangelista A, Milewicz DM, Body SC (2014) Bicuspid aortic valve: identifying knowledge gaps and rising to the challenge from the International Bicuspid Aortic Valve Consortium (BAVCon). *Circulation* 129(25):2691-704.
- Mohamed SA, Aherrahrou Z, Liptau H, Erasmi AW, Hagemann C, Wrobel S, Borzym K, Schunkert H, Sievers HH, Erdmann J. (2006) Novel missense mutations (p.T596M and p.P1797H) in NOTCH1 in patients with bicuspid aortic valve. *Biochem Biophys Res Commun.* Jul 14;345(4):1460-5. PubMed PMID: 16729972
- Mohamed SA, Noack F, Schoellermann K, Karluss A, Radtke A, Schult-Badusche D, Radke PW, Wenzel BE, Sievers HH. (2012) Elevation of matrix metalloproteinases in different areas of ascending aortic aneurysms in patients with bicuspid and tricuspid aortic valves. *ScientificWorldJournal.* 2012:806261. doi: 10.1100/2012/806261. PubMed PMID: 22645456; PubMed Central PMCID: PMC3356741.
- Moniotte S, Vaerman JL, Kockx MM, Larrouy D, Langin D, et al. (2001) Realtime RT-PCR for the detection of beta-adrenoceptor messenger RNAs in small human endomyocardial biopsies. *J Mol Cell Cardiol* 33(12): 2121-2133.
- Naito S, Hillebrand M, Bernhardt AM, Jagodzinski A, Conradi L, Detter C, Sydow

- K, Reichenspurner H, Kodolitsch YV, Girdauskas E. (2016) The Value of Circulating Biomarkers in Bicuspid Aortic Valve-Associated Aortopathy. *Thorac Cardiovasc Surg.* May 5. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27148933.
- Nistri S, Basso C, Marzari C, Mormino P, Thiene G. (2005) Frequency of bicuspid aortic valve in young male conscripts by echocardiogram. *Am J Cardiol.* Sep 1;96(5):718-21. PubMed PMID: 16125502.
- Noutsias M, Rohde M, Block A, Klippert K, Lettau O, et al. (2008) Pre-amplification techniques for real-time RT-PCR analyses of endomyocardial biopsies. *BMC Mol Biol* 9: 3. doi: 10.1186/1471-2199-9-3.
- Padang R, Bagnall RD, Semsarian C (2012) Genetic basis of familial valvular heart disease. *Circ Cardiovasc Genet* 5(5):569-80.
- Pannu H, Fadulu VT, Chang J, Lafont A, Hasham SN, Sparks E, Giampietro PF, Zaleski C, Estrera AL, Safi HJ, Shete S, Willing MC, Raman CS, Milewicz DM. (2005) Mutations in transforming growth factor-beta receptor type II cause familial thoracic aortic aneurysms and dissections. *Circulation.* Jul 26;112(4):513-20. PubMed PMID: 16027248.
- Phillips HM, Mahendra P, Singh E, Anderson RH, Chaudhry B, Henderson DJ (2013) Neural crest cells are required for correct positioning of the developing outflow cushions and pattern the arterial valve leaflets. *Cardiovasc Res* 99(3):452-460.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol-Lett* 26(6): 509–515.
- Pilbrow AP, Ellmers LJ, Black MA, Moravec CS, Sweet WE, et al. (2008) Genomic selection of reference genes for real-time PCR in human myocardium. *BMC Med Genomics* 1: 64. doi:10.1186/1755-8794-1-64.
- Prakash SK, Bossé Y, Muehlschlegel JD, Michelena HI, Limongelli G, Della Corte A, et al. (2014) A Roadmap to Investigate the Genetic Basis of Bicuspid Aortic Valve and its Complications. Insights From the International BAVCon (Bicuspid Aortic Valve Consortium). *J Am Coll Cardiol* 64(8):832-839.
- Putnam, E. A., Milewicz, D. M. (1995) A mutation in the FBN2 gene in dermal fibroblasts from a congenital contractural arachnodactyly patient. (Abstract) *Am. J. Hum. Genet.* 57: A225.

- Quintero-Rivera F, Xi QJ, Keppler-Noreuil KM, Lee JH, Higgins AW, Anchan RM, Roberts AE, Seong IS, Fan X, Lage K, Lu LY, Tao J, Hu X, Berezney R, Gelb BD, Kamp A, Moskowitz IP, Lacro RV, Lu W, Morton CC, Gusella JF, Maas RL (2015) MATR3 disruption in human and mouse associated with bicuspid aortic valve, aortic coarctation and patent ductus arteriosus. *Hum Mol Genet* 24(8):2375-2389.
- Radonic´ A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, et al. (2004) Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 313(4): 856–862.
- Raffetto JD, Khalil RA. (2008) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol.* Jan15;75(2):346-59. Review. PubMed PMID: 17678629; PubMed Central PMCID: PMC2254
- Ramirez F, Sakai LY, Dietz HC, Rifkin DB (2004) Fibrillin microfibrils: multipurpose extracellular networks in organismal physiology. *Physiol Genomics.* Oct4;19(2):151-4. Review. PubMed PMID: 15466717.
- Ratnapriya, R., Zhan, X., Fariss, R. N., Branham, K. E., Zipprer, D., Chakarova, C. F., Sergeev, Y. V., Campos, M. M., Othman, M., Friedman, J. S., Maminishkis, A., Waseem, N. H., and 55 others. Rare and common variants in extracellular matrix gene fibrillin 2 (FBN2) are associated with macular degeneration. *Hum. Molec. Genet.* 23: 5827-5837, 2014. [PubMed: 24899048] [Full Text]
- Robinson PN, Godfrey M (2000) The molecular genetics of Marfan syndrome and related microfibrilopathies. *J Med Genet* Jan;37(1):9-25. Review. PubMed PMID:10633129; PubMed Central PMCID: PMC1734449.
- Robledo-Carmona J, Rodríguez-Bailón I, Carrasco-Chinchilla F, Fernández B, et al. (2013) Hereditary patterns of bicuspid aortic valve in a hundred families. *Int J Cardiol* 168(4):3443-3449.
- Rongish BJ, Drake CJ, Argraves WS, Little CD. (1998) Identification of the developmental marker, JB3-antigen, as fibrillin-2 and its de novo organization into embryonic microfibrillar arrays. *Anal Biochem* 288(1): 99–102. *Dev Dyn*;212: 461–71.
- Russo CF, Cannata A, Lanfranconi M, Vitali E, Garatti A, Bonacita E (2008) Is aortic wall degeneration related to bicuspid aortic valve anatomy with valvular disease? *J Thorac Cardiovasc Surg* 136:937-942.
- Ruzmetov M, Shah JJ, Fortuna RS, Welke KF (2015) The Association Between Aortic Valve Leaflet Morphology and Patterns of Aortic Dilation in Patients With Bicuspid Aortic Valves. *Ann Thorac Surg* 99:2101–8.

- Sakai LY, Keene DR, Engvall E. (1986) Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J Cell Biol.* Dec;103(6 Pt 1):2499-509. PubMed PMID: 3536967; PubMed Central PMCID: PMC2114568.
- Sans-Coma V, Arqué JM, Durán AC, Cardo M, Fernández B (1991) Coronary artery anomalies and bicuspid aortic valves in the Syrian hamster. *Basic Res Cardiol* 86(2):148-153.
- Sans-Coma V, Cardo M, Durán AC, Franco D, Fernández B, Arqué JM (1993) Evidence for quantitative genetic influence on the formation of aortic valves with two leaflets in the Syrian hamster. *Cardiol Young* 3:132-140.
- Sans-Coma V, Cardo M, Thiene G, Fernández B, Arqué JM, Durán AC (1992) Bicuspid aortic and pulmonary valves in the Syrian hamster. *Int J Cardiol* 34(3):249-254.
- Sans-Coma V, Fernández B, Durán AC, Thiene G, Arqué JM, Muñoz-Chápuli R, Cardo M (1996) Fusion of valve cushions as a key factor in the formation of congenital bicuspid aortic valves in Syrian hamsters. *Anat Rec* 244(4):490-498.
- Sans-Coma V, Fernández MC, Fernández B, Durán AC, Anderson RH, Arqué JM (2012) Genetically alike Syrian hamsters display both bifoliate and trifoliate aortic valves. *J Anat* 220(1):92-101.
- Sans-Coma V, Franco D, Durán AC, Arqué JM, Cardo M, Fernández B (1994) Cartilage in the aortic valve and its relationship with the aortic valve morphology in Syrian hamsters. *Acta Anat* 149(4):255-263.
- Sans-Coma V, López D, Durán AC, Guerrero A, Fernández-Gallego T, Fernández MC, Arqué JM (2005) Formation of cartilage in congenital bicuspid aortic valves of Syrian hamsters (*mesocricetus auratus*). *J Comp Pathol* 133(1):53-63.
- Schaefer BM, Lewin MB, Stout KK, et al. (2008) The bicuspid aortic valve: an integrated phenotypic classification of leaflet morphology and aortic root shape. *Heart* 94:1634–8.
- Schmoker JD, McPartland KJ, Fellingner EK, Boyum J, Trombley L, Ittleman FP, Terrien C 3rd, Stanley A, Howard A. (2007) Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor expression in atherosclerotic and nonatherosclerotic thoracic aortic aneurysms. *J Thorac Cardiovasc Surg.* Jan;133(1):155-61. PubMed PMID: 17198804.
- Sievers HH, Schmidtke CA (2007) A classification system for the bicuspid aortic valve from 304 surgical specimens. *J Thorac Cardiovasc Surg* 133:1226–1233.
- Siu SC, Silversides CK. (2010) Bicuspid aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol.* Jun 22;55(25):2789-800. doi: 10.1016/j.jacc.2009.12.068. Review. PubMed PMID: 20579534.

- Solanas M, Moral R, Escrich E (2001) Unsuitability of using ribosomal RNA as loading control for Northern blot analyses related to the imbalance between messenger and ribosomal RNA content in rat mammary tumors.
- Spanakis E (1993) Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls. *Nucleic Acids Res* 21(16): 3809–3819.
- Sperling JS, Lubat E (2015) Forme fruste or 'Incomplete' bicuspid aortic valves with very small raphe: The prevalence of bicuspid valve and its significance may be underestimated. *Int J Cardiol* 184:1-5.
- Tadros TM, Klein MD, Shapira OM. (2009) Ascending aortic dilatation associated with bicuspid aortic valve: pathophysiology, molecular biology, and clinical implications. *Circulation*. Feb 17;119(6):880-90. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.795401. Review. PubMed PMID: 19221231.
- Thomas PS, Sridurongrit S, Ruiz-Lozano P, Kaartinen V (2012) Deficient Signaling via Alk2 (Acvr1) Leads to Bicuspid Aortic Valve Development. *PLoS ONE* 7(4): e35539. doi:10.1371/journal.pone.0035539.
- Tutar E, Ekici F, Atalay S, Nacar N. (2005) The prevalence of bicuspid aortic valve in newborns by echocardiographic screening. *Am Heart J*. Sep;150(3):513-5. PubMed PMID: 16169333.
- Tzemos N, Lyseggen E, Silversides C, Jamorski M, Tong JH, Harvey P, Floras J, Siu S. (2010) Endothelial function, carotid-femoral stiffness, and plasma matrix metalloproteinase-2 in men with bicuspid aortic valve and dilated aorta. *J Am Coll Cardiol*. Feb 16;55(7):660-8. doi: 10.1016/j.jacc.2009.08.080. PubMed PMID: 20170792.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, et al. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3(7): RESEARCH0034.
- Verma S, Siu SC. (2014) Aortic dilatation in patients with bicuspid aortic valve. *N Engl J Med*. May 15;370(20):1920-9. doi: 10.1056/NEJMra1207059. Review. PubMed PMID: 24827036.
- Vesentini N, Barsanti C, Martino A, Kusmic C, Ripoli A, et al. (2012) Selection of reference genes in different myocardial regions of an in vivo ischemia/reperfusion rat model for normalization of antioxidant gene expression. *BMC Res Notes* 5: 124. doi: 10.1186/1756-0500-5-124.

- Waldo K, Zdanowicz M, Burch J, Kumiski DH, Stadt HA, Godt RE, et al. A (1999) novel role for cardiac neural crest in heart development. *J Clin Invest* 103:1499–507.
- Waller BF, Carter JB, Williams HJ, et al. (1973) Bicuspid aortic valve. Comparison of congenital and acquired types. *Circulation* 48:1140–1150.
- Wang, M, Tsiouras, P, Godfrey, M (1995) Fibrillin-2 (FBN2) mutation in congenital contractural arachnodactyly. (Abstract) *Am. J. Hum. Genet.* 57: A231.
- Wang Y, Wu B, Dong L, Wang C, Wang X, Shu X. (2016) Circulating matrix metalloproteinase patterns in association with aortic dilatation in bicuspid aortic valve patients with isolated severe aortic stenosis. *Heart Vessels.* Feb;31(2):189-97. doi: 10.1007/s00380-014-0593-5. PubMed PMID: 25325992.
- Wang Y, Wu B, Farrar E, Lui W, Lu P, Zhang D, et al. (2015) Notch-Tnf signalling is required for development and homeostasis of arterial valves. *Eur Heart J* doi:10.1093/eurheartj/ehv520.
- Ward C. (2000) Clinical significance of the bicuspid aortic valve. *Heart* Jan;83(1):81-5 Review. PubMed PMID: 10618341; PubMed Central PMCID: PMC172926.
- Wilton E, Bland M, Thompson M, Jahangiri M. (2008) Matrix metalloproteinase expression in the ascending aorta and aortic valve. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*;7:37–40.
- Yasuda H, Nakatani S, Stugaard M, Tsujita-Kuroda Y, Bando K, Kobayashi J, Yamagishi M, Kitakaze M, Kitamura S, Miyatake K. (2003) Failure to prevent progressive dilation of ascending aorta by aortic valve replacement in patients with bicuspid aortic valve: comparison with tricuspid aortic valve. *Circulation.* Sep 9;108 Suppl 1:II291-4. PubMed PMID: 12970248.
- Yperman J, De Visscher G, Holvoet P, Flameng W (2004) Beta-actin cannot be used as a control for gene expression in ovine interstitial cells derived from heart valves. *J Heart Valve Dis* 13(5): 848–853.
- Zhang H, Apfelroth SD, Hu W, Davis EC, Sanguineti C, Bonadio J, Mecham RP, Ramirez F. (1994) Structure and expression of fibrillin-2, a novel microfibrillar component preferentially located in elastic matrices. *J Cell Biol.* Mar;124(5):855-63. PubMed PMID: 8120105; PubMed Central PMCID: PMC2119952.
- Zhang, H, Hu, W, Ramirez, F (1995) Developmental expression of fibrillin genes suggests heterogeneity of extracellular microfibrils. *J. Cell Biol.* 129: 1165-1176. [PubMed:7744963] [Full Text]
- Zhang X, Shen YH, LeMaire SA. (2009) Thoracic aortic dissection: are matrix metalloproteinases involved? *Vascular*;17:147–57.

- Zhu L, Vranckx R, Khau Van Kien P, Lalande A, Boisset N, Mathieu F, Wegman M, Glancy L, Gasc JM, Brunotte F, Bruneval P, Wolf JE, Michel JB, Jeunemaitre X. (2006) Mutations in myosin heavy chain 11 cause a syndrome associating thoracic aortic aneurysm/aortic dissection and patent ductus arteriosus. *Nat Genet.* Mar;38(3):343-9. PubMed PMID: 16444274.
- Żyżyńska-Granica B, Koziak K (2012) Identification of suitable reference genes for real-time PCR analysis of statin-treated human umbilical vein endothelial cells. *PLoS One* 7(12):e51547. doi: 10.1371/journal.pone.0051547.