



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Mecanismos de remodelado y calcificación cardiovascular: papel del receptor nuclear NOR-1 y la LOX

Carme Ballester Servera

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación

**MECANISMOS DE REMODELADO Y
CALCIFICACIÓN CARDIOVASCULAR: PAPEL
DEL RECEPTOR NUCLEAR NOR-1 Y LA LOX**

Carme Ballester Servera

2023

**MECANISMOS DE REMODELADO Y CALCIFICACIÓN
CARDIOVASCULAR: PAPEL DEL RECEPTOR NUCLEAR NOR-1 Y
LA LOX**



**UNIVERSITAT DE
BARCELONA**

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación

Programa de Doctorado en Biomedicina

Memoria presentada por

Carne Ballester Servera

para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona.

Este trabajo ha sido realizado bajo la supervisión de los directores: Dr. José Martínez González, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB)-CSIC) y la Dra. M^a Cristina Rodríguez Sinovas, del Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (IRHSCSP) y del tutor Dr. Albert Tauler Girona, de la Facultad de Farmacia.

Los directores,

El tutor,

Dr. José Martínez González Dra. M^a Cristina Rodríguez Sinovas Dr. Albert Tauler Girona

La doctoranda,

Als meus padrins

Als meus pares

A la meva germana i al meu germà

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la beca FPU19/05257 financiada por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades a través de la convocatoria de Formación de Profesorado Universitario (FPU) 2019.

Se agradece también la financiación recibida por el grupo que ha permitido la realización de los estudios que se presentan en este trabajo:

- Proyecto RTI-2018-094727-B-100 financiado por MCIN/AEI/ /10.13039/501100011033/ y por FEDER Una manera de hacer Europa (2019-2021).
- Proyecto PID2021-122509OB-I00 financiado por MCIN/AEI/ /10.13039/501100011033/ y por FEDER Una manera de hacer Europa (2022-2025).

Marie Curie afirmó que “Debemos tener perseverancia y, sobre todo, confianza en nosotros mismos”. ¡Y cuánta razón tenía! Sin la perseverancia y sin la confianza en mí misma durante estos cuatro años no hubiera podido llegar al final de esta meta llamada tesis doctoral. No todo ha sido fácil ni tampoco simple, pero de eso trata el doctorado, de creerte frente a las adversidades que se topan en el camino y al final, después de todo el esfuerzo, llega la recompensa y ves la meta como esa luz al final del túnel. Durante este largo camino aprendes, aprendes más que nunca porque no paras de cuestionarte constantemente nuevas cosas, agudizas tu creatividad para intentar alcanzar los objetivos planteados y poco a poco vas avanzando en el conocimiento de aquello que pensabas que nunca entenderías. En este camino que más bien ha sido una montaña rusa de sentimientos buenos y no tan buenos, no me he sentido para nada sola sino todo lo contrario, me he sentido más acompañada que nunca y por ello quería agradecer a todos y cada uno de los que me habéis llenado el “cora” durante este tiempo.

En primer lugar, quería agradecer a mis directores la oportunidad de realizar esta tesis doctoral, sin vuestra confianza en mí no hubiera sido posible. Gracias Pepe por guiarme en este camino, por instruirme en el pensamiento científico y crítico, por tu apoyo en todo momento y, sobre todo, por tu paciencia en esta última etapa de escritura de tesis. Gracias Cristina por tus ideas, por estar siempre disponible para lo que necesitara y por depositar tu confianza en mí en todo momento. Gracias a los dos por ser un claro ejemplo de constancia, superación y perseverancia.

Gracias a mi segunda familia, nuestro Lab 110, porque habéis conseguido que me sienta como en casa. Primero agradecer a esas personas que estuvieron cuando me incorporé a la familia 110. Saraaaaaaaaaay!!!! Muchas gracias por tus consejos, por liarla pollito a veces y por estar siempre disponible para cualquier cosa que he necesitado. Laia, la meva mentora, infinites gràcies per tot! Des de que vaig entrar al lab em vares agafar de la mà per ensenyar-me tot el que sabies i per convertir-me en una gran científica. Gràcies per la teva incansable predisposició a fer el que calgués, per la teva paciència i per el teu suport en tot el que he necessitat. Vam aconseguir formar un gran equip i gairebé amb una mirada ens enteníem. Ara, des d’Alemania, continues estant disposada a ajudar i a donar-me suport amb el que necessiti. GRÀCIES! María Galán, muchas gracias por ayudarnos en lo que hemos necesitado!

A los que estáis ahora en esta familia, también INFINITAS GRACIAS! Gràcies Lúdia per brindar-me la teva ajuda sempre que ho he necessitat, gràcies per confiar en jo no només a nivell científic sinó a nivell personal, gràcies per donar el teu “toque” d’humor que tanta gràcia me fa i, sobre tot, gràcies per ser la millor parella que es pot tenir als congressos perquè el que hem pogut riure i els

“shows” que hem presenciat en directe domés els sabem tu i jo. Gràcies també per mantenir-me informada de les novetats musicals de J Balvin i per recordar-me que Antònia Font sempre és una opció musical acertada sigui quin sigui l'estat d'ànim! Gracias Judith por toda la ayuda brindada durante estos cuatro años, porque tú y yo sabemos que cada paso se puede convertir en una escalera de caracol difícil de subir pero que al final conseguimos alcanzar y disfrutar de las vistas que esperan al llegar arriba. Gracias por tus consejos, por tu experiencia y por tu apoyo en todo momento. Gracias Rafael Antonio por llegar al laboratorio con esa energía tan positiva, tan risueña y tan reconfortante. Eres pura vitamina A, B y C! Gracias por mantenernos informados a todos de los cotilleos y por hacernos risoterapia siempre que lo hemos necesitado. Gracias por instruirnos en la cultura culinaria mexicana y gracias también por enseñarnos lo que es un buen PENDEJO!! Gracias por pendejear y que sigas pendejando por mucho tiempo! Pauliñaanaa, aii mi Pauliñaanaa!!! La última en llegar pero con una personalidad arrolladora. Gracias por hacernos el camino fácil, por tu predisposición y por tu incansable constancia! Estoy segura de que llegarás tan lejos como te propongas, porque reúnes todas las cualidades necesarias para conseguirlo! Aunque estás en el principio de la tesis y todo parece imposible, no lo es!! Continua así y ya verás como los resultados empiezan a aparecer y al final estoy segura que saldrá una tesis espectacular! Gracias también por enseñarme cosiñas gallegas y aún da que chova os xoves sempre estás listo para rir (espero que Google traductor no me haya fallado)! Finalmente, INIFINITAS GRACIAS al pilar fundamental del Lab 110! GRACIAS SILVIA, sí en mayúsculas, porque eres la integrante clave para que el laboratorio funcione tan bien y se mantenga el buen rollo que le caracteriza. Gracias por tus consejos, por tu apoyo técnico y por estar siempre ahí sin necesidad de venir a preguntar! Gracias por tanto, vales oro! Gracias también a la Paulita por ser tan simpática y alegrarme más de una tarde con su “Canme”!

También agradecer a nuestros vecinos del Lab 111 la ayuda brindada dejándonos gradillas, centrífugas, termobloques o termocicladores. Gracias a todos!!! Especialmente gracias Aleyda por siempre tener una sonrisa que nos alegra el día y gracias a ti Edu por tu ayuda siempre que te la hemos pedido. Y sobre todo, gracias por ser el integrante del grupo “Ángeles del 110” porque sin ti seguramente no hubiéramos ganado la medalla de plata. Eres un crack!! Por cierto, me debes algún que otro consejo como buen emprendedor que eres, estoy segura que llegarás bien lejos!

Gracias infinitas a Leonie, muchas gracias por estar siempre que lo he necesitado, por tu ayuda brindada y por tus consejos! Gracias por ser un ejemplo de profesionalidad y gracias por tu eterna sinceridad, se agradece y mucho! Gracis Sebastià per estar disposat a fer dos jijis jajas, per ser còmplice de dites mallorquines i per acompanyar-mos a mejar panades amb sobrasada! Gràcies per

recordar-me s'accent mallorquí i per no fer-me sentir tan enfora de cameva! Gràcies Anna Civit per la teva ajuda sempre que ho hem necessitat, sé que podem comptar amb tu amb el que necessitem! Gracias Lisi por siempre brindarme siempre una sonrisa! Gràcies Esther pels teus consells a cultius! Gràcies Olaya per la teva ajuda quan ho he necessitat! Gracias Sonia Huertas por siempre sacarme una sonrisa. Gràcies Sergi López pels teus consells sobretot en tema de rates o ratolins! Sempre tens una bona idea per solucionar els problemes. Gràcies Laura Casaní per tots els teus consells i la teva ajuda. Gràcies Sergi Florit per la paciència que has tingut per solucionar-nos els problemes amb l'Anibio! Gracias Fanny, Àngel, Eli y Lorena por estar tan pendientes siempre de nuestros ratones y cuidarlos tan bien. Gràcies Rosa Aledo pels teus consells en temes de clonació. Gràcies Nia per estar sempre disposada a ajudar. Gràcies Javi per tenir aquest sentit de l'humor tan propi que et caracteritza. Gràcies Oriol per donar-me consells sempre que t'ho he demanat, per la teva experiència i per intentar prenr-te les coses en sentit de l'humor.

Gràcies també al laboratori 212 per estar sempre disposats a ajudar amb el que calgui. Gracias Vero por tu ayuda cuando la he necesitado. Gràcies Sergi Casabella per fer-mos més conscients que mai del canvi climàtic. Gràcies per escoltar-me i el teu suport sempre que ho he necessitat. Molts d'ànims en aquest últim sprint que et queda, ja no et queda res! Gracias Cristina por tu simpatía y por tu ayuda.

El grau de bioquímica em va regalar una gran amiga, gràcies Marian per estar al meu costat sempre! Has estat un suport incondicional a Barcelona, gràcies pels berenars "deluxe" i gràcies per escoltar-me quan ho he necessitat. Gràcies a les meves amigues de tota la vida, les de SonSer, sou lo millor per fer sempre dos jijis jajas i dos shows. Gràcies Marga pes teu sentit de l'humor, ets única! Gràcies Mmar per mantenir-me informada encara que estigués a Barcelona. Gracias Sara por todo! Gràcies Aina per alguna visita barcelonina que m'ha alegrat el cap de setmana. Gracias Dani y Ana por estar siempre dispuestos a organizar una tardebueno o una noche vieja. Gràcies Salvador per estar sempre allà. Gràcies Pilar per tot, per considerar-me part de la teva família i pel teu suport incondicional sobre tot en aquesta darrera etapa de la tesi, que ha estat durilla! Gràcies Estrella (@estrella.carmona.art) per aquest dibuix que has fet amb tant d'amor.

I gràcies sobre tot a la meva família perquè sempre ha apostat per jo i m'ha donat tot el suport, confiança i valor que necessitava en tot moment. Gràcies Cati, Miquel, Xisca i Maria per estar sempre allà i per venir a fer-me alguna visita a Barcelona, que s'agraeix molt! Gràcies Tio Jaume, Madrina, Juan, Enrique i MBel pel vostre incondicional suport i sobretot gràcies Jaumet perquè encara no ets conscient de l'alegria que ens has aportat a la família. Gràcies padrí Botó i padrina

Morey per confiar sempre amb jo i preocupar-vos per jo perquè estic a Barcelona. Encara que estigui enfora cada setmana heu estat presents amb la vostra telefonada setmanal. Gràcies Padrí Joan i Nana per ser un exemple a seguir, per ensenyar-me que la peresa no existeix i per mantenir sempre actiu l'esperit d'aprendre. Especialment tu Nana ets la persona més treballadora, servicial i familiar que conec. Estic segura que si haguessis tingut les mateixes oportunitats que jo haguessis arribat molt enfora, perquè més d'un cop m'has afirmat que de haver pogut estudiar, haguessis estudiat alguna cosa científica.

Gràcies Jj per ajudar-me amb el teu suport i els teus consells. En l'àmbit d'economia ets un crack! Gràcies per les teves recomanacions i per la teva calderilla, que m'ha salvat alguna vegada que ho he necessitat! Gràcies Pupis, sa meva pupis, per estar SEMPRE incondicionalment present, per ajudar-me sense necessitat de demanar-t'ho i sobre tot per escoltar-me i donar-me suport SEMPRE. Gràcies per no amollar-me de la mà durant aquests anys i per consolar-me si era necessari, la distància es feia més curta amb una videollamada, una telefonada o una visita a Barcelona. Gràcies als dos per ser uns germans exemplars, sé que puc comptar amb vosaltres amb el que necessiti. GRÀCIES! Vos estim <3!

Gràcies infinites també als meus pares, no tenc paraules per agrair tot el que heu fet per jo perquè pugui aconseguir tot el que em proposi. Sempre m'heu ajudat en totes les decisions que he pres, sense qüestionar-les i heu estat al meu costat per celebrar amb jo les meves victòries i consolar-me quan m'he equivocat. Que hagi arribat aquí i hagi aconseguit acabar la meva tesi doctoral, és gràcies a vosaltres! Mamà, segur que ja t'has emocionat, que sapis que ets un exemple a seguir i mai podré agrair-te tot el que m'has ensenyat, tots els valors que tenc són gràcies a tu! Vos estim <3!

Finalmente, gracias a mi Ángel por todo! Gracias por escucharme, por apoyarme, por confiar en mí, por ayudarme y por no soltarme de la mano en estos cuatro años. Has sido pieza clave y fundamental durante este largo y duro camino y aún así nunca he dejado de sentir tu apoyo y tu confianza en mí. Gracias por acompañarme a descubrir las ciudades europeas, los dos sabemos que formamos un buen equipo. Gracias por compartir el gusto por los grupos musicales y disfrutar conmigo conciertos! Gracias por inculcarme el gusto por la montaña! En definitiva, gracias por hacerme sentir tan bien y por estar siempre a mi lado. Te quiero. Gracias también a la familia murciana por recibirme tan bien y hacerme sentir como en casa. Encarna, Julio, Maria del Mar, Mari Huertas, Tomás, Bule y Tomasín ...¡GRACIAS! Siempre me habéis considerado una más, me habéis apoyado cuando lo he necesitado y habéis celebrado conmigo las victorias.

;;GRACIAS / GRÀCIES !!

RESUMEN

La calcificación cardiovascular (CCV) afecta a arterias y válvulas comprometiendo su normal funcionamiento y aumentando el riesgo de sufrir accidentes cardiovasculares y de desarrollar hipertrofia cardíaca e insuficiencia cardíaca, entre otros. Actualmente no existen tratamientos eficaces que prevengan o reduzcan la CCV. Nuestro grupo había descrito la sobreexpresión del receptor nuclear NOR-1 en lesiones ateroscleróticas humanas y su inducción en células endoteliales y células musculares lisas vasculares (CMLVs) por estímulos que promueven disfunción endotelial y potencian la migración y proliferación de ambos tipos celulares. La Lisil Oxidasa (LOX) es una enzima que cataliza el entrecruzamiento de las fibras de colágeno y elastina en el proceso de maduración de la matriz extracelular (MEX). Nuestro grupo había caracterizado la implicación de LOX en la disfunción endotelial y el remodelado vascular, y cómo la actividad LOX contribuye al estrés oxidativo y a la rigidez vascular. En el presente trabajo hemos profundizado en el estudio de los mecanismos celulares y moleculares por los que NOR-1 y LOX participan en la CCV. Detectamos aumento de los niveles de expresión de NOR-1 tanto en válvulas aórticas como en lesiones ateroscleróticas humanas calcificadas, en las que colocalizó con marcadores de calcificación como RUNX2 (*Runt-related transcription factor 2*) y osteopontina (OPN). La expresión endógena de NOR-1 aumentó al incubar células intersticiales de válvula aórtica (VICs) o CMLVs humanas con un medio con alto contenido en fosfato que indujo calcificación. La sobreexpresión de NOR-1 en VICs expuestas a este medio limitó la inducción de los marcadores de diferenciación osteoblástica/calcificación y la mineralización de la MEX. Además, al exponer a medio osteogénico CMLVs o anillos aórticos de ratones que sobreexpresan NOR-1 en las CMLVs (TgNOR-1^{CMLV}) la expresión de los marcadores de calcificación y la mineralización de la MEX fue menor que en células o anillos aórticos de animales control. Finalmente, al inducir hiperlipidemia y aterosclerosis experimental (mediante la administración de AAV-PCSK9^{D374Y} y dieta aterogénica) observamos que la transgénesis de NOR-1 disminuye el desarrollo de aterosclerosis a nivel de la aorta y la calcificación de las lesiones ateroscleróticas. Las lesiones ateroscleróticas de animales TgNOR-1^{CMLV} eran de menor tamaño y tenían menor infiltrado inflamatorio; además, estaban menos calcificadas y presentaban menor expresión de marcadores osteogénicos, menor grado de entrecruzamiento del colágeno y menor contenido de glucosaminoglicanos que las de los animales control. Por lo tanto, NOR-1 reduce la calcificación de células en cultivo y la calcificación de la íntima asociada a la aterosclerosis. En relación al impacto de LOX en la CCV, observamos una mayor expresión de esta enzima tanto en válvulas aórticas calcificadas como en placas ateroscleróticas humanas en las que colocalizaba con RUNX2. Al inducir la calcificación de VICs con un medio rico en fosfato observamos un aumento de

Resumen

la secreción de la LOX que promovió la maduración de la MEX y su mineralización de forma dependiente de su actividad catalítica. Al inducir aterosclerosis mediante la administración de AAV-PCSK9^{D374Y} y dieta aterogénica, los ratones que sobreexpresan LOX en las CMLVs de la pared vascular (TgLOX^{CMLV}) presentaron mayor desarrollo de aterosclerosis en la aorta y mayor calcificación de las lesiones. Las lesiones ateroscleróticas de ratones TgLOX^{CMLV} tenían más infiltrado inflamatorio y una cubierta fibrosa más rica en CMLVs y más engrosada. El análisis de la calcificación evidenció que las placas de ratones TgLOX^{CMLV} estaban más calcificadas y presentaban mayor expresión de marcadores osteogénicos, mayor grado de entrecruzamiento de colágeno y mayor contenido de glucosaminoglicanos que las de los animales control. Por lo tanto, nuestro estudio proporciona evidencias tanto *in vitro* como *in vivo* del papel clave de la LOX en la CCV.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	9
RESUMEN.....	15
ABREVIATURAS.....	25
INTRODUCCIÓN.....	31
1. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES	33
1.1. ATEROSCLEROSIS	33
1.1.1. Anatomía de la arteria.....	33
1.1.2. Patología de la aterosclerosis	34
1.2. CALCIFICACIÓN CARDIOVASCULAR.....	38
1.2.1. Factores de riesgo de la CCV	38
1.2.2. Proceso de biomineralización.....	40
1.2.3. Patogénesis y calcificación ectópica.....	41
1.2.4. Clasificación de la CCV	42
1.2.5. Diagnóstico y manejo clínico de la CCV	45
1.2.6. Tratamientos actuales de la CCV	48
2. RECEPTORES NUCLEARES (NRs)	49
2.1. CLASIFICACIÓN DE LOS NRs	50
2.2. ESTRUCTURA DE LOS NRs	50
2.2.1. Dominio A/B	50
2.2.2. Dominio C.....	51
2.2.3. Dominio D.....	51
2.2.4. Dominio E.....	51
2.2.4. Dominio F.....	51
2.3. MECANISMOS DE ACCIÓN.....	52
2.4. SUBFAMILIA NR4A.....	54
2.4.1. Unión al ADN.....	57
2.4.2. Estructura genética y proteica de los NR4A	58
2.4.3. Papel de los receptores NR4A a nivel cardiovascular.....	58
3. LISIL OXIDASA	65
3.1. PROCESAMIENTO PROTEOLÍTICO DE LA LOX	67
3.2. PATOLOGÍAS RELACIONADAS CON ALTERACIONES EN LA ACTIVIDAD LOX.....	69
3.2.1. LOX en el sistema cardiovascular	70
OBJETIVOS.....	75
MATERIAL Y MÉTODOS.....	79
1. MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL	81

1.1. MODELO DE RATÓN TRANSGÉNICO QUE SOBREEXPRESA NOR-1 HUMANO DIRIGIDO A CMLVs.....	81
1.2. MODELO DE RATÓN TRANSGÉNICO QUE SOBREEXPRESA LOX HUMANA DIRIGIDA A CMLVs.....	82
1.3. PROCEDIMIENTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL	83
1.3.1. <i>Inducción de aterosclerosis e hiperlipidemia mediante inyección de AAV-PCSK9^{D374Y} y dieta rica en grasa y colesterol.....</i>	83
1.3.2. <i>Ultrasonografía de los arcos aórticos</i>	84
1.3.3. <i>Extracción sanguínea</i>	85
1.3.4. <i>Tratamiento farmacológico de los animales</i>	85
1.3.5. <i>Tinción Oil Red O (O.R.O.) en aortas en face</i>	86
1.3.6. <i>Análisis de la calcificación microscópica mediante NIRF (Near-Infrared Fluorescence).....</i>	86
2. MUESTRAS HUMANAS	87
3. CULTIVOS CELULARES.....	87
3.1. OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CMLVs DE AORTA Y CORONARIAS HUMANA	87
3.2. OBTENCIÓN Y CULTIVO DE CMLVs DE AORTA MURINA	88
3.3. OBTENCIÓN Y CULTIVO PRIMARIO DE VICs HUMANAS.....	89
3.4. CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES.....	90
3.5. INDUCCIÓN DE CALCIFICACIÓN <i>IN VITRO</i>	90
3.6. ANÁLISIS DE LA CALCIFICACIÓN DE CÉLULAS EN CULTIVO.....	90
3.7. DESCELULARIZACIÓN DE VICs PARA GENERAR SCAFFOLDS DE MEX	91
4. ANÁLISIS DE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR EX VIVO	91
5. SOBREEXPRESIÓN GÉNICA EN CÉLULAS EN CULTIVO MEDIANTE TRANSDUCCIÓN LENTIVIRAL	92
5.1. CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN LENTIVIRAL	92
5.2. PRODUCCIÓN DE LENTIVIRUS	93
5.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PUROMICINA Y POLIBRENO	94
5.4. DETERMINACIÓN DEL TÍTULO VIRAL.....	94
5.5. TRANSDUCCIÓN DE VICs	94
6. SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE SIRNA.....	95
7. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE ARNm	95
7.1. EXTRACCIÓN DE ARN	95
7.1.1. <i>Extracción de ARN mediante solventes orgánicos</i>	95
7.1.2. <i>Extracción mediante columnas de afinidad</i>	96
7.2. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DE ARN.....	96
7.3. PCR A TIEMPO REAL	97
7.3.1. <i>PCR a tiempo real con sistema TaqMan®.....</i>	97
7.3.2. <i>PCR a tiempo real con el sistema SYBR-Green.....</i>	98

8. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA	99
8.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS.....	99
8.1.1. <i>Extractos celulares totales</i>	99
8.1.2. <i>Extractos proteicos de sobrenadante</i>	99
8.1.3. <i>Extractos proteicos de tejido</i>	99
8.1.4. <i>Extractos nucleares de células en cultivo</i>	100
8.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA POR BCA.....	100
8.3. WESTERN BLOT	101
8.4. INMUNOCITOQUÍMICA.....	101
8.4.1. <i>Detección fluorescente</i>	102
8.4.2. <i>Detección con diaminobenzidina (DAB)</i>	102
8.5. ELISA.....	103
9. HISTOLOGÍA	103
9.1. PROCESADO DE LAS MUESTRAS	103
9.2. TINCIONES E INMUNOHISTOQUÍMICAS	104
9.2.1. <i>Tinción de hematoxilina-eosina</i>	104
9.2.2. <i>Tinción de rojo sirio</i>	104
9.2.3. <i>Tinción de von Kossa</i>	104
9.2.4. <i>Tinción fluorescente OsteoSense™ 680 EX</i>	105
9.2.5. <i>Tinción de lípidos con Oil Red O (O.R.O.)</i>	105
9.2.6. <i>Tinción de pentacrómico de Movat</i>	106
9.2.7. <i>Inmunohistoquímica</i>	106
10. ANÁLISIS DEL ESTRÉS OXIDATIVO	107
10.1. TINCIÓN HISTOLÓGICA CON DHE	107
11. ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS DE LAS TINCIONES, INMUNOHISTOQUÍMICAS E INMUNOCITOQUÍMICAS	108
12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	108
RESULTADOS.....	111
1. IMPLICACIÓN DEL RECEPTOR NOR-1 EN LA ATEROSCLEROSIS Y LA CALCIFICACIÓN CARDIOVASCULAR.....	113
1.1. MAYORES NIVELES DE NOR-1 EN VÁLVULAS Y ARTERIAS HUMANAS CALCIFICADAS .113	
1.1.1. <i>Caracterización de válvulas aórticas humanas calcificadas y variables clínicas de la cohorte del HSCSP</i>	113
1.1.2. <i>Niveles aumentados de NOR-1 en válvulas humanas con mayor grado de calcificación</i>	115
1.1.3. <i>Mayores niveles de NOR-1 en arterias femorales humanas calcificadas</i>	118
1.2. IMPACTO DE NOR-1 EN LA TRANSDIFERENCIACIÓN OSTEABLÁSTICA DE CÉLULAS EN CULTIVO.....	118
1.2.1. <i>NOR-1 atenúa la calcificación de VICs en cultivo</i>	118

1.2.2. <i>El silenciamiento de NOR-1 agrava la calcificación de las VICs</i>	120
1.2.3. <i>La sobreexpresión de NOR-1 en VICs previene la mineralización de la MEX</i>	122
1.2.4. <i>Análisis del papel de NOR-1 en el proceso de transdiferenciación osteogénica de las CMLVs</i>	124
1.3. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE NOR-1 EN CMLVs EN LA CALCIFICACIÓN VASCULAR EX VIVO E IN VIVO	126
1.3.1. <i>La sobreexpresión de NOR-1 en CMLVs reduce la calcificación in vitro</i>	126
1.3.2. <i>La sobreexpresión de NOR-1 reduce la mineralización ex vivo en anillos aórticos</i>	128
1.3.3. <i>La transgénesis de NOR-1 reduce el desarrollo de aterosclerosis y la calcificación</i>	128
2. ANÁLISIS DE LOS MECANISMOS QUE VINCULAN A LA LOX CON LA ATROSCLEROSIS Y LA CALCIFICACIÓN CARDIOVASCULAR	143
2.1. LA LOX Y OTRAS ISOENZIMAS ESTÁN INDUCIDAS EN VÁLVULAS Y ARTERIAS HUMANAS CALCIFICADAS.....	143
2.1.1. <i>La expresión de LOX está aumentada en válvulas humanas calcificadas</i>	143
2.1.2. <i>Mayor expresión de LOX en arterias ateroscleróticas humanas</i>	149
2.2. EFECTO DE LA MADURACIÓN DE LA MEX DEPENDIENTE DE LA ACTIVIDAD LOX EN LA CALCIFICACIÓN ECTÓPICA.....	150
2.2.1. <i>La LOX se induce y aumenta la deposición de colágeno I en la calcificación de VICs en cultivo</i>	150
2.2.2. <i>La inhibición de la actividad LOX reduce la calcificación de las VICs</i>	152
2.2.3. <i>La sobreexpresión de LOX exacerba la calcificación de las VICs</i>	153
2.3. LA TRANSGÉNESIS DE LOX DIRIGIDA A CMLVs POTENCIÓ EL DESARROLLO DE ATROSCLEROSIS Y CALCIFICACIÓN VASCULAR.....	155
2.3.1. <i>La transgénesis de LOX potenció el desarrollo de aterosclerosis</i>	157
2.3.2. <i>La transgénesis de LOX aumentó la mineralización de las lesiones ateroscleróticas</i>	163
DISCUSIÓN	171
1. IMPLICACIÓN DEL RECEPTOR NUCLEAR NOR-1 EN LA ATROSCLEROSIS Y LA CALCIFICACIÓN CARDIOVASCULAR	173
2. MECANISMOS QUE INVOLUCRAN A LA LOX CON LA ATROSCLEROSIS Y LA CALCIFICACIÓN CARDIOVASCULAR	180
CONCLUSIONES	187
BIBLIOGRAFÍA	191
APÉNDICE	223

ABREVIATURAS

8-oxo-dG	8-oxo-2' deoxiguanosina
A.B.	Arteria braquiocefálica
A.R.	Rojo de alizarina
A.U.	Unidades arbitrarias
A2M	Alfa-2-macroglobulina
AAV	Virus adenoasociados
ACEI	Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina
ADMTS	<i>ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AF-1	Región activadora de función 1
AF-2	Región activadora de función 2
AGEs	Productos de glicación avanzada
ALPL	Fosfatasa alcalina
AngII	Angiotensina II
AP-1	Proteína activadora 1
ARB	Bloqueadores de los receptores de angiotensina II
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP7A	<i>ATPase copper transporting alpha</i>
BAPN	β -aminopropionitrilo
BCA	Ácido bicinconínico
BGLAP	Osteocalcina
BMP-1	<i>Bone morphogenic protein 1</i>
BMP-2	<i>Bone morphogenic protein 2</i>
BSA	Albúmina de suero bovino
CAC	Calcificación de la arteria coronaria
CCL20	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 20</i>
CCV	Calcificación cardiovascular
CD68	<i>Cluster of differentiation 68</i>
Cfu	<i>Colony forming units</i>
cIAP2	<i>Cellular inhibitor apoptosis 2</i>
CMLVs	Células musculares lisas vasculares
Col1a1	Colágeno 1 α 1
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
CRL	<i>Cytokine Receptor Like</i>
CUA	Arteriopatía urémica calcificante
DAB	Diaminobenzidina

Abreviaturas

DBD	Dominio de unión al ADN
DHE	Dihidroetidio
DKK-1	<i>Dickkopf-verwandtes-1</i>
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
ECVs	Enfermedades cardiovasculares
EF	Fracción de eyección
ER	Retículo endoplasmático
ET-1	Endotelina 1
FBS	Suero fetal bovino
FGF-2	Factor de crecimiento de fibroblastos 2
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
g-ApoA-IV	Apolipoproteína A-IV glicada
GCNF	<i>Germ Cell Nuclear Factor</i>
HBMEC	<i>Human brain micro endothelial cells</i>
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible factor 1</i>
HPA	Hipertensión pulmonar arterial
HREs	Elementos de respuesta a hormonas
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSCSP	Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
HTA	Hipertensión arterial
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IFN γ	Interferón γ
IL-1 β	Interleuquina 1 beta
IL-4	Interleuquina 4
IL-6	Interleuquina 6
IL-8	Interleuquina 8
IMC	Índice de masa corporal
IP6	Mioinositol hexafosfato
IRHSCSP	Institut de Recerca de l'HSCSP
LBD	Dominio de unión a ligando
LDLox	LDLs oxidadas
LDLR	Receptor de las LDLs
LDLs	Lipoproteínas de baja densidad
lncRNA	<i>Long coding RNA</i>
LOX	Lisil oxidasa
LOXL	<i>LOX-like</i>
LPS	Lipopolisacáridos
LTQ	Lisina tirosil quinona
LTR	<i>Long terminal repeats</i>

LXR	<i>Liver X Receptor</i>
MC	Muy calcificadas
MCP1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
MESA	Estudio multiétnico de aterosclerosis
MEX	Matriz extracelular
MGP	Proteína gla de matriz
MMPs	Metaloproteinasas
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MSX-2	<i>Msh homeobox homolog 2</i>
NBRE	<i>NGFI-B response element</i>
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NIRF	<i>Near-infrared fluorescence</i>
NOR-1	<i>Neuron-derived nuclear orphan receptor 1</i>
NOX1	NADPH oxidasa I
NR4A	<i>Nuclear receptor subfamily 4A</i>
NRs	Receptores nucleares
NTD	Dominio N-terminal
Nur77	<i>Nerve growth factor-induced B alpha</i>
Nurr1	<i>Nuclear receptor related 1</i>
NurRE	<i>Nur-response element</i>
NYHA	Clasificación de la <i>New York Heart Association</i>
O.R.O.	<i>Oil Red O</i>
OCT	<i>Optimum cutting temperature</i>
OM	Medio osteogénico
OMS	Organización mundial de la salud
OPG	Osteoprotegerina
OPN	Osteopontina
PAH	Eje hipotalámico-pituitario-adrenal
PBS	Tampón fosfato salino
PC	Poco calcificadas
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCSK9	Proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PDGFRβ	<i>Platelet-derived growth factor receptor beta</i>
PESA	<i>Progression of Early Subclincial herosclerosis</i>
PIT-1	<i>Sodium-dependent phosphate transporter 1</i>
PKA	Proteína quinasa A
Plod	<i>Procollagen lysyl hydroxylase</i>

Abreviaturas

pNPP	p-nitrofenilfosfato
POMC	Proiomelanocortina
RAR	Receptor del ácido retinoico
RIP3	<i>Receptor-Interacting Protein Kinase 3</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RUNX2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
RXR	<i>Retinoid X receptor</i>
SCRC	<i>Scavenger receptor cysteine-rich</i>
SD	Desviación estándar
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	Error estándar de la media
SF1	Factor esteroideogénico 1
SFCA	Acetato de celulosa libre de tensioactivos
siRNA	ARN de interferencia
SMA	α -actina de músculo liso
SMemb	<i>Embryonic Smooth Muscle Myosin Heavy Chain</i>
SR-A	<i>Scavenger receptor type A</i>
TBP	Proteína de unión a TATA
TC	Tomografía computerizada
TCR	<i>T cell receptor</i>
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TgLOX ^{CMLV}	Ratón transgénico que sobreexpresa la LOX humana dirigida a CMLVs
TgNOR-1 ^{CMLV}	Ratón transgénico que sobreexpresa NOR-1 humano dirigido a CMLVs
TIMPs	Inhibidores de tejido de las metaloproteinasas
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNAP	Fosfatasa alcalina inespecífica de tejido
TNF α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
TNFR2	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor 2</i>
Treg	Linfocitos T reguladores
UCP-1	<i>Uncoupling protein 1</i>
VCAM-1	Molécula de adhesión de célula vascular 1
VDR	Receptor de la vitamina D
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEs	Vesículas extracelulares
VICs	Células valvulares intersticiales
VTN	Vitronectina
WT	<i>Wild type</i>

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) son la principal causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, suponen una importante carga económica para el sistema nacional de salud y se encuentran entre las principales causas que provocan la pérdida de productividad a nivel global (1). La prevalencia de estas enfermedades casi se duplicó entre 1990 y 2019 pasando de 271 a 523 millones de casos. Además, el número de muertes por ECVs aumentó de manera continua (de 12,1 millones en 1990 a 18,6 millones en 2019) (2). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que las ECVs representan el 32% de las muertes que se producen en todo el mundo.

Entre las enfermedades cardiovasculares más frecuentes destaca la aterosclerosis que es la causa subyacente de gran parte de las patologías cardiovasculares de origen isquémico (3).

1.1. Aterosclerosis

La aterosclerosis es el denominador común de las ECVs de componente isquémico y el sustrato patológico de complicaciones clínicas como el infarto de miocardio y el accidente cerebrovascular (4–6). No es una enfermedad moderna puesto que se describió hace más de 4.000 años. En 1904, Felix Marchand propuso el término aterosclerosis para referirse a esta enfermedad vascular que consideró responsable de los procesos obstructivos de las arterias (5). El término aterosclerosis deriva del prefijo “atero” que en griego significa papilla para indicar el depósito de lípidos en la pared arterial y el sufijo “esclerosis” que se refiere al endurecimiento (5,7,8).

La aterosclerosis es una patología multifactorial en la que influyen factores genéticos y ambientales (9). Aunque la aparición de lesiones ateroscleróticas puede remontarse a la infancia, tienen que pasar varias décadas hasta que la patología de lugar al desarrollo de complicaciones clínicas (5).

1.1.1. Anatomía de la arteria

El sistema arterial está formado por arterias elásticas de gran calibre y arterias musculares periféricas de menor diámetro. La pared arterial se compone de tres capas: la túnica adventicia, la túnica media y la túnica íntima (Figura 1). La capa más interna, en contacto con la sangre, es la íntima formada por una monocapa de células endoteliales y una lámina de fibras elásticas (lamina elástica interna) (10). En un individuo sano, la íntima es una capa muy fina compuesta fundamentalmente por matriz extracelular (MEX), sobre todo colágeno y proteoglicanos. La media está conformada por células musculares lisas vasculares (CMLVs) y MEX bien organizada compuesta fundamentalmente por

Introducción

colágeno y elastina (7). Las fibras de elastina juegan un papel clave en la resistencia mecánica de los vasos a bajas presiones mientras que las fibras de colágeno juegan un papel más importante a presiones altas (11). La capa más periférica es la adventicia que se compone por tejido conectivo con fibroblastos y CMLVs (9). En esta capa se encuentran también las terminaciones nerviosas, los mastocitos y los *vasa vasorum* (7).

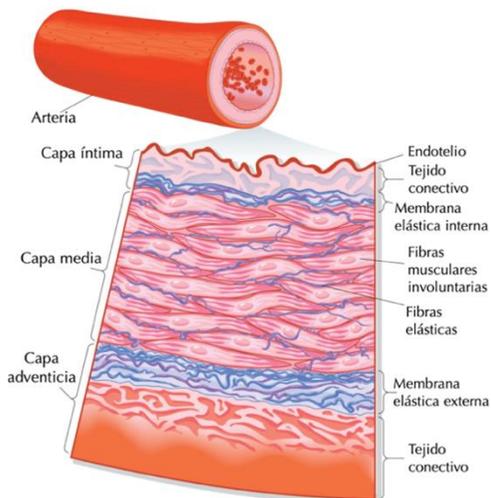


Figura 1. Representación de la anatomía de una arteria sana. La arteria se compone de tres capas: íntima, media y adventicia. Imagen adaptada de *The Editors of Encyclopedia Britannica* (12).

1.1.2. Patología de la aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad crónica de progresión lenta caracterizada por la acumulación de lípidos y células inflamatorias que conducen a la formación de las placas de ateroma en la íntima de las arterias (3,4,6,9,10). Tradicionalmente se consideraba que era el resultado de la acumulación pasiva de lípidos en la pared vascular. Sin embargo, la visión actual de su patogénesis es más compleja ya que se entiende como un proceso en el cual participan el sistema inmune y la inflamación en conjunción con factores de riesgo potenciadores como la hiperlipidemia, en especial las lipoproteínas de baja densidad (LDLs) (3,7,13,14).

1.1.2.1. Factores de riesgo

Estudios clínicos y epidemiológicos han permitido asociar ciertos factores genéticos y ambientales con la aterosclerosis. Se ha descrito que concentraciones elevadas de LDLs favorecen el desarrollo de lesiones ateroscleróticas. De hecho, algunos autores como Peter Libby *et al* sugieren que el desarrollo de éstas probablemente no ocurriría si las concentraciones de LDLs no estuvieran por encima de las necesidades fisiológicas (7). Sin embargo, el estilo de vida de la población tiende a excederlas, exponiendo de manera continua el vaso a niveles

elevados de LDLs lo que favorece su desarrollo (7). Otros factores de riesgo asociados a la aterosclerosis y a sus complicaciones trombóticas son la hipertensión, el tabaquismo y los factores que engloba el síndrome metabólico que incluye la presión arterial elevada, la grasa visceral y los niveles altos de lipoproteínas ricas en triglicéridos, la resistencia a la insulina y el desarrollo de diabetes *mellitus* (7).

También se ha atribuido un importante papel al sistema inmunológico en el desarrollo de la aterosclerosis (6). La inflamación y la hematopoyesis clonal se han descrito como factores de riesgo emergentes (7). Además, estudios recientes proponen otros factores de riesgo como la alteración del sueño, la inactividad física, el microbioma, la contaminación del aire y el estrés ambiental (15).

Por lo tanto, entre los factores de riesgo modificables debe subrayarse la importancia de hacer una dieta saludable, practicar ejercicio físico de manera regular y no fumar para prevenir la patología aterosclerótica.

1.1.2.2. El progreso de la aterosclerosis

El endotelio vascular actúa como una primera barrera física frente a moléculas y células que circulan por el torrente sanguíneo (6). Sin embargo, la exposición continua a factores de riesgo ateroscleróticos produce alteraciones en la monocapa endotelial, activándola y disminuyendo sus funciones ateroprotectoras (6,7). Todo ello favorece que moléculas circulantes penetren en la íntima, desencadenen el inicio y favorezcan la progresión de las lesiones ateroscleróticas (Figura 2).

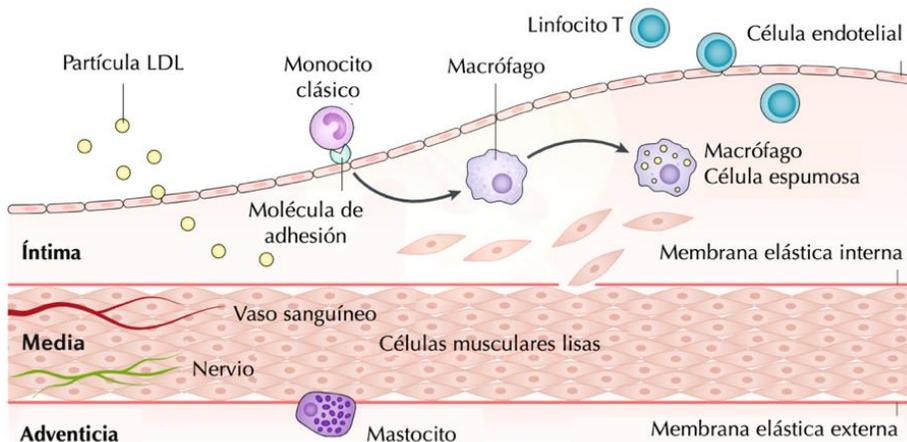


Figura 2. Inicio y progresión de la aterosclerosis. La imagen muestra como penetran LDLs, monocitos y linfocitos a través de la monocapa de células endoteliales activadas hacia la íntima de la pared vascular lo que desencadena la formación de la lesión aterosclerótica. Además, se representa la migración de CMLVs de la media y la transformación de los monocitos a macrófagos

Introducción

que al captar LDLs modificadas se convierten en células espumosas. Figura adaptada de *Libby et al* (7).

La presencia crónica de niveles elevados de LDLs circulantes promueve el inicio de la aterosclerosis ya que penetran y se acumulan en la íntima (6,9,15,16), donde experimentan oxidaciones y otras modificaciones que las convierten en partículas más proinflamatorias e inmunogénicas (15,17). Los monocitos circulantes interactúan con las moléculas de adhesión expresadas por las células endoteliales activadas y se infiltran en la íntima (6). Diferentes quimiocinas y citoquinas pueden promover la migración de los monocitos a la íntima donde se convierten en macrófagos (10). Estos macrófagos expresan receptores *scavenger* que tienen capacidad para unir y captar lipoproteínas modificadas transformándose en células espumosas. Otras células del sistema inmunitario adaptativo como los linfocitos T también pueden migrar a la íntima donde ejercerán funciones reguladoras sobre el sistema inmunitario innato, las células endoteliales y las CMLVs (6). Además, las CMLVs de la media pueden migrar hacia la íntima en respuesta a la acumulación de leucocitos y al efecto quimiotáctico de diferentes moléculas como MCP1 o PDGF (*Platelet derived growth factor*) (7,18). En la íntima, las CMLVs también pueden internalizar LDL oxidadas a través de receptores *scavenger* para convertirse en células espumosas (6).

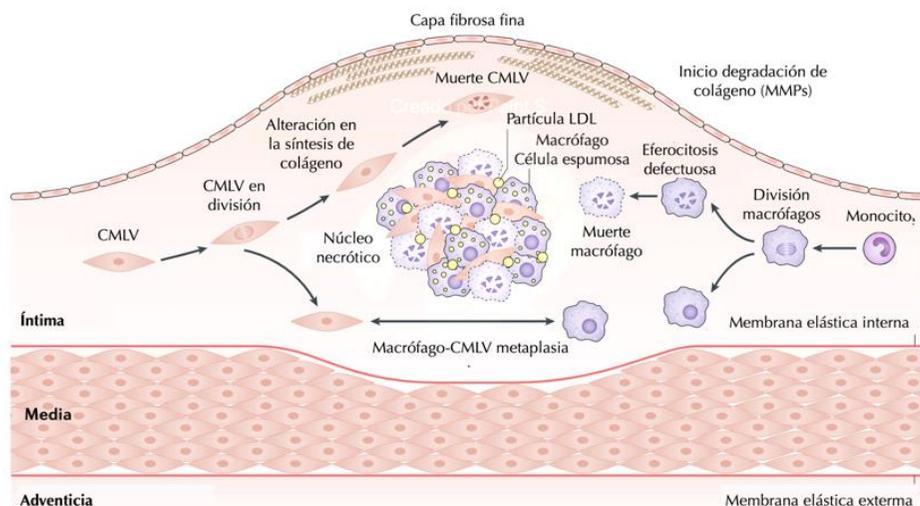


Figura 3. Progresión de la aterosclerosis. La imagen muestra como las CMLVs y las células espumosas pueden sufrir muerte celular generando restos celulares que junto con las LDLs forman el núcleo necrótico. Además, se forma la cubierta fibrosa a partir de la síntesis de colágeno por parte de las CMLVs. Al progresar la enfermedad se puede producir degradación de la cubierta fibrosa por la acción de las enzimas metaloproteinasas (MMPs). Figura adaptada de *Libby et al* (7).

En la progresión de la placa aterosclerótica, las CMLVs que han migrado a la íntima producen MEX (colágeno, elastina, proteoglicanos y

glucosaminoglicanos) que contribuyen a su engrosamiento y forman lo que se conoce como cubierta fibrosa (Figura 3) (6,19). Esta capa tiene un importante papel estructural ya que evita la exposición del material protrombótico presente en el núcleo de la lesión (6). Sin embargo, mediadores como interferón γ (IFN γ) liberados por células como los linfocitos T pueden inhibir la producción de colágeno y la capacidad de las CMLVs de mantener esta cubierta fibrosa (7). Además, los macrófagos activados producen también MMPs, proteasas capaces de degradar el colágeno de la cubierta. Este debilitamiento estructural de la cubierta fibrosa aumenta la susceptibilidad de la placa a romperse (7,20).

A medida que avanza la lesión, las CMLVs y los macrófagos pueden sufrir muerte celular, de manera que los restos celulares se acumulan formando el núcleo necrótico de la placa aterosclerótica (7,19). Durante la evolución de la placa, este núcleo va aumentando de tamaño debido a la muerte celular y a una eliminación deficiente de restos celulares por eferocitosis. Ambos eventos junto con la inflamación y el estrés oxidativo incrementan la vulnerabilidad de la placa y aumentan su trombogenicidad (6).

1.1.2.3. Complicaciones de la aterosclerosis

En fases iniciales de la aterosclerosis, el crecimiento de las lesiones no compromete la luz arterial. Sin embargo, la placa aterosclerótica en crecimiento continuo puede empezar a invadir el lumen arterial y conducir a la formación de lesiones que limitan el flujo sanguíneo. Cuando la oclusión afecta a la arteria coronaria, en situaciones en las que el miocardio demanda más oxígeno como sucede al realizar ejercicio físico, puede desencadenar isquemia y síntomas típicos de *angina pectoris* (7,9,10).

La rotura de la cubierta fibrosa es la complicación más frecuente por la cual la sangre entra en contacto con el núcleo lipídico protrombótico. Como consecuencia, sustancias procoagulantes, como el factor tisular, pueden desencadenar una trombosis que puede causar la oclusión del vaso y conducir a un evento isquémico agudo (7,9). Muchos trombos murales pueden no ocluir totalmente el vaso o bien sufrir lisis debido a las defensas fibrinolíticas endógenas (7). En el proceso de reorganización del trombo, el factor de crecimiento transformante β (TGF β) y el PDGF pueden estimular la migración y la proliferación de las CMLVs que, junto a la producción descontrolada de MEX, conducen a un aumento del volumen de la lesión que invade la luz arterial (7). De hecho, estudios de lesiones ateroscleróticas humanas avanzadas muestran la presencia de “capas enterradas” lo que proporciona evidencia de procesos anteriores de rotura y remodelado.

1.2. Calcificación cardiovascular

La calcificación cardiovascular (CCV) se caracteriza por la deposición de complejos de fosfato cálcico (hidroxiapatita) en la vasculatura (21–23). Según su localización anatómica puede clasificarse en diferentes tipos: calcificación de la íntima, calcificación de la media, calcificación de las válvulas cardíacas y calcifilaxis o arteriopatía urémica calcificante (CUA) cuyas características se explicarán en mayor detalle en la sección 1.2.4.

Inicialmente, la calcificación se consideraba un proceso pasivo y degenerativo relacionado con lesiones ateroscleróticas en estados muy avanzados. Sin embargo, evidencias más recientes sugieren que la CCV es un proceso activo y complejo en el cual participan múltiples vías y mecanismos responsables de la deposición de calcio en la pared vascular análogos a los que intervienen en la formación del hueso (24,25). La CCV también puede producirse en la media especialmente en pacientes diabéticos y pacientes con insuficiencia renal crónica (25,26).

Los resultados de diversos estudios clínicos indican que la CCV presagia un mal pronóstico y augura futuros eventos cardiovasculares graves en los pacientes. De hecho, la presencia de calcio en las arterias coronarias es un marcador para calcular el riesgo de sufrir un evento coronario agudo a corto plazo, y en este sentido se ha usado desde 1940 (27–29). Además, se ha descrito que el riesgo de padecer un evento cardiovascular grave, definido como infarto de miocardio o muerte provocada por enfermedad coronaria, es significativamente mayor en aquellos pacientes que tienen un valor de *coronary artery calcium score* superior a 300 en comparación a aquellos cuyo valor oscila entre 1 y 100 (30).

En el estudio Multi-étnico de aterosclerosis (MESA), se describió que la prevalencia de calcificación de las arterias coronarias se veía afectada por el género y la etnia ya que en hombres caucásicos era del 70% mientras que, en hombres afroamericanos, hispanos y asiáticos era aproximadamente del 52%, 56% y 59%, respectivamente. En el caso de las mujeres la incidencia era sólo del 45%, 37%, 35% y 42% respectivamente (30). La prevalencia también se veía afectada por la edad ya que en mayores de 70 años se producía calcificación en más del 90% de hombres y del 67% de mujeres (28,31).

1.2.1. Factores de riesgo de la CCV

La calcificación vascular incrementa el riesgo de mortalidad y por lo tanto se encuentra dentro de los factores de riesgo “Framingham” tradicionales. Diferentes estudios clínicos han investigado los factores de riesgo que se asocian con la calcificación de las arterias coronarias y arterias periféricas (32).

La hipertensión, que está muy relacionada con el remodelado cardiovascular y la aterosclerosis, es un factor de riesgo de la CCV (21,33). De hecho, se ha descrito la relación entre el sistema renina-angiotensina y la patogénesis de la CCV a través de su impacto en la apoptosis, el crecimiento y la diferenciación de las CMLVs (33). Además, se ha descrito un incremento del receptor de angiotensina 1 en regiones calcificadas y que su bloqueo farmacológico previene la CCV en animales de experimentación (34).

La diabetes *mellitus* es otro factor de riesgo de la CCV. La CCV en los pacientes diabéticos es muy superior a los no diabéticos (24,35). Este incremento de la CCV se acompaña de una mayor expresión de marcadores de calcificación como osteopontina (OPN), colágeno y fosfatasa alcalina (ALPL) en la media de las arterias (36). Varios estudios sugieren que el incremento de CCV en estos pacientes se debe a la hiperglucemia que promueve la transformación osteoblástica de las CMLVs (32). Aunque no está muy clara la relación entre la dislipemia y la CCV, se conoce que durante la diferenciación osteogénica las células vasculares calcificantes no solo depositan hidroxapatita sino también lípidos como triglicéridos (21,25,32). Por ello, se considera que la dislipemia, más que los niveles elevados de LDL, participa en el proceso de la CCV.

Uno de los factores no tradicionales asociado con la CCV en modelos animales es la inflamación ya que se ha descrito que durante la osteogénesis se produce inflamación local e infiltración de macrófagos en las lesiones ateroscleróticas (37). El estrés oxidativo es otro de los factores no tradicionales relacionado con el desarrollo de CCV (38). Así, se ha descrito que la presencia de ROS (*Reactive Oxygen Species*) como el H_2O_2 favorece la diferenciación osteoblástica (39,40). El estrés oxidativo podría explicar la relación entre la calcificación de las arterias coronarias y la osteoporosis descrita en la población general (32,41). Algunas proteínas pueden verse modificadas de manera indirecta mediante compuestos reactivos de carbonilo formando los productos de glicación avanzada (AGEs) que se localizan en zonas de calcificación y realizan modificaciones en la elastina que pueden favorecer el proceso de mineralización (42).

Alteraciones en los mecanismos que mantienen la homeostasis mineral, como sucede en el caso de la hiperfosfatemia, se han relacionado con una mayor propensión al desarrollo y progresión de la CCV(23,32). En este sentido, los pacientes con niveles de fosfato en el cuartil superior presentan mayor riesgo de CCV y de muerte (43,44). También existe una asociación entre la hipercalcemia y la presencia de CCV(45,46). En general, se ha descrito un efecto sinérgico del calcio y del fosfato sobre la CCV(45).

Introducción

1.2.2. Proceso de biomineralización

Las concentraciones de calcio y fosfato presentes en el suero y los fluidos tisulares en condiciones fisiológicas resultan suficientes para la mineralización y la formación de cristales de hidroxapatita (23,25). De hecho, la biomineralización de los tejidos duros se produce de forma fisiológica, como el caso del hueso o la dentina (47). Sin embargo, cuando esta acumulación de minerales inorgánicos ocurre en los tejidos blandos (como vasos sanguíneos, músculo, hígado o cerebro) es patológica y hablamos de biomineralización ectópica (23,48).

Se han descrito dos procesos que conducen a la biomineralización vascular: un proceso pasivo, independiente de actividad celular, y un proceso activo.

1.2.2.1. Biomineralización pasiva

Tradicionalmente, la CCV se consideró un proceso pasivo en el que se producía deposición de iones fosfato y calcio sobre la elastina y el colágeno según la teoría de neutralización de cargas (23). De acuerdo con ésta, el elevado contenido de glicinas de la elastina y el colágeno favorece la formación de giros beta que interactúan con iones calcio, para neutralizar cargas, lo que inicia el proceso de mineralización. Esta interacción permite la formación de cristales de hidroxapatita a nivel extracelular que normalmente, precipitan de forma amorfa (23). La hidroxapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})$) es el producto final de la reacción entre iones calcio y fosfato y es conocida también como resultado de la agregación de *clusters* de Posner (23). La deposición de estas sales ocurre sobre las proteínas de MEX (23). En la pared de la aorta, la deposición se produce sobre la elastina, principal componente de las fibras elásticas de la media (23).

1.2.2.2. Biomineralización activa

En la actualidad, la biomineralización activa es la teoría más aceptada que entiende la calcificación como un proceso dinámico y regulado que depende de la actividad celular (49,50). En este proceso participan diferentes tipos de células que secretan vesículas extracelulares (VEs) y diferentes mediadores como colágenos, fosfoproteínas, glicoproteínas, proteolípidos, pirofosfatos, iones magnesio y carbonato (25,44,51,52).

El inicio del proceso de biomineralización requiere la presencia de nucleadores de cristalización, que desencadenan la formación del núcleo cristalino primario, y la ausencia de los inhibidores de la mineralización (25). De manera fisiológica, las VEs secretadas por las CMLVs, VICs o macrófagos contienen inhibidores de la mineralización como fetuína A o proteína gla de matriz (MGP) que protegen a las arterias de la deposición de cristales de fosfato cálcico (53). Sin embargo, bajo estímulos procalcificantes, las VEs contienen inductores de la mineralización que interactúan con el colágeno de la MEX lo

que permite formar un foco nucleador de la mineralización (44,51,54). Estas VEs secretadas contienen ALPL, miembros de la familia de las anexinas, MMPs, pirofosfatasa, ATPasa, 5'-AMPasa, glucosa-6-fosfatasa y fosfolipasa A₂ que permiten liberar sustratos y formar intermediarios que facilitan la precipitación del fosfato cálcico (44). La ALPL aumenta los niveles de fosfatos inorgánicos en las vesículas y degrada el pirofosfato, inhibidor de la precipitación de fosfato cálcico y del crecimiento de cristales de hidroxapatita (51). Además, las VEs contienen grandes cantidades de colesterol libre, fosfolípidos y fosfatidilserina (51). La anexina V, en presencia de iones de fosfato y de calcio, se une a la fosfatidilserina para formar un complejo lípido-fosfato-calcio dentro de la vesícula extracelular (44). Estos complejos nucleadores, que se originan a partir de soluciones inestables de calcio y fosfato, forman los centros primarios de los cristales hidroxapatita (44). Una vez generados estos focos de inicio de la calcificación, los componentes procalcificantes de las VEs podrán interactuar con ellos promoviendo el crecimiento, la progresión y la extensión de la calcificación.

1.2.3. Patogénesis y calcificación ectópica

Las consecuencias a nivel funcional de la calcificación pueden resultar muy graves y comprometer el correcto funcionamiento de los vasos sanguíneos. De manera fisiológica las fibras elásticas confieren elasticidad a las arterias permitiendo que éstas puedan estirarse durante la sístole almacenando energía y contraerse durante la diástole (25). Sin embargo, la capacidad contráctil de las fibras se ve comprometida por la rigidez arterial que ocasiona la CCV (40,46,53,55). Esta rigidez favorece el desarrollo de hipertensión sistólica, hipertrofia del ventrículo izquierdo, disfunción diastólica e incompetencia valvular (25,46). Además, la disminución de la elasticidad debido a la calcificación tiene una estrecha relación con el daño de órganos ya que provoca la relajación alterada del músculo liso y la disfunción endotelial (23,25). En la media, la calcificación avanzada, está estrechamente relacionada con un mayor riesgo de muerte súbita cardíaca y de amputación de miembros inferiores en pacientes con enfermedad arterial periférica (25).

Respecto a la calcificación asociada a la aterosclerosis, no hay consenso claro sobre cómo afecta a la estabilidad de la placa (40,56). Algunos investigadores relacionan la calcificación con la presencia de placas ateroscleróticas más estables mientras que otros autores destacan la fragilidad y el mayor riesgo de rotura que éstas presentan cuando están calcificadas (21,56). En efecto, se ha propuesto un riesgo bifásico de la calcificación en estas lesiones. Inicialmente, la calcificación suele ser irregular y se relaciona con la desestabilización de la placa y con una mayor propensión a la rotura (56). Sin

Introducción

embargo, a medida que ésta evoluciona puede ser más estable y por lo tanto presenta un menor riesgo de rotura (40). Se requiere continuar investigando para conocer de forma más precisa en que contextos la calcificación estabiliza o no las lesiones ateroscleróticas.

Finalmente, la calcificación de las válvulas cardíacas, válvula aórtica y mitral, es la principal causa de insuficiencia cardíaca y la primera de reemplazo valvular en Europa y América del Norte (40,57). Cuando la calcificación valvular es grave produce un estrechamiento de la válvula aórtica (estenosis aórtica) puede llegar a requerir cirugía de reemplazo. Esta calcificación puede interpretarse como un signo temprano de enfermedad cardíaca (21). De hecho, este tipo de calcificación se relaciona con una mayor incidencia de infarto, fibrilación auricular y muerte súbita (40).

1.2.4. Clasificación de la CCV

La clasificación ampliamente utilizada para la CCV se basa en su localización anatómica. Así, se definen diferentes tipos de calcificación dependiendo de la capa de la pared vascular o la válvula en la que se depositan los cristales de hidroxapatita.

1.2.4.1 Calcificación de la capa íntima

Se trata del tipo de calcificación habitual en pacientes que tienen placas ateroscleróticas (25). En este caso, participan los mecanismos comunes en la aterosclerosis como la acumulación de lípidos, la invasión de macrófagos, la proliferación de CMVLs, la alteración de proteínas de la MEX en respuesta a la inflamación crónica arterial y la transdiferenciación osteoblástica de diferentes tipos celulares que liberan las VEs (21,27,31,40). Múltiples estudios han demostrado que las citoquinas proinflamatorias, las LDLs oxidadas (LDLox) y otros productos de liberación de monocitos/macrófagos promueven la osteogénesis y la acumulación de depósitos de calcio (25).

En la íntima aterosclerótica, la calcificación se inicia en forma de microcalcificaciones. Éstas se definen como pequeños depósitos de calcio ($< 5 \mu\text{m}$), cerca de los focos necróticos o apoptóticos del núcleo lipídico (21,25,58). Este tipo de calcificación es típico de placas de alto riesgo de rotura (27). Se ha hipotetizado que en este proceso juega un papel clave la apoptosis de CMLVs y las VEs liberadas por estas células en las proximidades de la lámina elástica interna (21,59). El aumento de sitios de nucleación puede facilitar la precipitación de sales de calcio a escala micrométrica y estas microcalcificaciones juegan un papel patológico en el inicio y progresión de la enfermedad vascular (21). En cambio, en el caso de reorganización de la placa tras un episodio trombótico se produce la cicatrización del núcleo necrótico y la formación de macrocalcificaciones ($> 5 \mu\text{m}$), que puede favorecer la estabilidad de la placa.

Factores antioxidantes como los ácidos grasos omega 3 y las lipoproteínas de alta densidad (HDL) promueven una disminución de la mineralización ya que reducen la expresión de ALPL y previenen la inducción de la calcificación mediada por IL-1, IL-6 y LDLox (25).

1.2.4.2. Calcificación de la capa media arterial (Calcificación media de Mönckeberg)

La calcificación de la media está estrechamente relacionada con la edad, la diabetes, la enfermedad renal crónica, la hipertensión y la osteoporosis (21,25,27,30). La acumulación de fosfato cálcico en la media provoca rigidez vascular (21,25,60). Este proceso resulta posible debido a la disminución de los inhibidores de la calcificación, al incremento del estrés oxidativo y del estrés del retículo endoplasmático, a la apoptosis, al daño en el ADN promovido por el desequilibrio en la homeostasis del calcio y fosfato y a una regulación anormal del sistema hormonal (21,30).

En la calcificación de la media, en el contexto de la diabetes, participa la vía BMP2/MSX-2/WNT, típica de la formación del hueso. En pacientes diabéticos, los radicales libres inducen inflamación en la adventicia con infiltración de macrófagos y linfocitos T. Además, la hiperglucemia y los AGEs incrementan la producción de TNF α (*Tumor Necrosis Factor α*), BMP-2 (*Bone Morphogenic Protein 2*), OPN y la expresión de MSX-2 (*Msh homeobox homolog 2*). Los mediadores de la inflamación estimulan la proliferación, la diferenciación osteogénica y la migración de miofibroblastos a la media dando lugar a su engrosamiento, remodelado y calcificación (25). Las MMPs, secretadas por las células inflamatorias en la adventicia y la media, tienen un importante papel en la calcificación ya que incrementan los metabolitos de elastina los cuales activan monocitos e intensifican el proceso inflamatorio. Asimismo, los productos de degradación de la elastina pueden convertirse en nucleadores de la cristalización. De hecho, la inhibición de MMPs rompe el círculo vicioso de la activación de monocitos y restringe la CCV (25).

En etapas finales de la enfermedad renal, los niveles anormalmente altos de calcio y fosfato estimulan la diferenciación osteogénica mediada por RUNX2 (*Runt-related transcription factor 2*) (25). Los niveles elevados de fosfato promueven la transición de CMLVs a CMLVs de fenotipo osteoblástico activando el transportador PiT-1 (*Sodium-dependent phosphate transporter 1*) y la subsiguiente cascada de la vía RUNX2 (25).

En el contexto de la hipertensión se produce un remodelado de la MEX que acelera la acumulación de colágeno tipo I, fibronectina y proteoglicanos en la media. Además, se acumulan productos anómalos de elastina. Esta cascada promueve un cambio fenotípico de las CMLVs y favorece la mineralización.

Introducción

Todo ello acelera aún más la rigidez vascular y el aumento de la presión arterial. En comparación con pacientes normotensos, los pacientes con hipertensión manifiestan un aumento de la calcificación en la aorta abdominal y la torácica descendente (21).

1.2.4.3. Calcificación valvular

El continuo estrés mecánico al que están sometidas las válvulas del corazón y la inflamación exacerbada son los responsables de la calcificación distrófica de las válvulas cardíacas (25,27,40). Las válvulas más afectadas son la válvula aórtica y la mitral. Entre los factores de riesgo asociados a este tipo de calcificación encontramos la edad, la predisposición genética, el sexo masculino, la insuficiencia renal, la hipertensión arterial, la aterosclerosis, la dislipemia y la diabetes (21,27). El tejido conjuntivo del estroma de la válvula aórtica calcificado presenta una alteración en la organización de la elastina, depósitos de lípidos, inflamación crónica, fibrosis, depósitos de calcio e infiltración de macrófagos y linfocitos T (25,61).

En el proceso de la calcificación valvular, se produce osteoblastogénesis, inducción crónica de marcadores de inflamación e incremento de marcadores de calcificación que conducen a la formación de tejido óseo maduro (25,27). El estímulo inflamatorio impulsa también el remodelado de la MEX mediante la modulación de la expresión de MMPs y sus inhibidores (TIMPs). Este remodelado de la MEX influye en las propiedades mecánicas, la proliferación, la motilidad de diferentes tipos celulares y la diferenciación osteogénica de las VICs (27). En concreto, los depósitos de fosfato cálcico de las válvulas aórticas se localizan predominantemente en la superficie aórtica más que en la ventricular lo que sugiere que las fuerzas hemodinámicas pueden contribuir al proceso de diferenciación fenotípico de las células endoteliales (27). Además, la alteración de las fuerzas hemodinámicas y/o los cambios inducidos por la presión determinan una expresión alterada de moléculas de adhesión (VCAM1 [*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*] e ICAM1 [*Intercellular Adhesion Molecule 1*]), citoquinas proinflamatorias y proteasas. Por lo tanto, la calcificación valvular no es un proceso pasivo, sino que conlleva la combinación de la actividad y secreción de las células junto con señales mecánicas y hemodinámicas (27,61).

Asimismo, se ha descrito la presencia de depósitos de calcio en la válvula mitral sobre todo en el contexto de la metaplasia cartilaginosa del anillo valvular (25). Esta calcificación se ha relacionado con el incremento en la incidencia de enfermedades de la válvula mitral y arritmias (62).

1.2.4.4. Calcifilaxis

La arteriopatía urémica calcificante es un tipo de calcificación que afecta a la capa media de pequeñas arteriolas (diámetro < 0,6 mm). Los factores de riesgo

descritos con este tipo de calcificación son niveles elevados de fosfato y calcio, niveles elevados de hormona paratiroidea, hipoalbuminemia, diabetes, sexo femenino, obesidad y sobredosis de warfarina (21).

Esta patología afecta principalmente a pacientes dializados con enfermedad renal crónica, en particular a aquellos que se les administra warfarina (21,25). La warfarina bloquea la γ -carboxilación dependiente de vitamina K de proteínas inhibitoras de la calcificación como MGP (63). Así, la concentración de MGP se ve disminuida y junto al exceso de fosfato y calcio circulantes que presentan estos pacientes se favorece la mineralización. Se trata de un tipo de calcificación rara pero con graves consecuencias ya que la tasa de mortalidad es excepcionalmente alta y la de curación muy baja, incluso si se diagnostica en una etapa temprana (21). La causa exacta del desarrollo de calcifilaxis se desconoce, pero se puede describir como una calcificación de la media combinada con la proliferación de la íntima, la fibrosis, la oclusión trombotica y en consecuencia provoca isquemia y necrosis de la piel, tejido subcutáneo, órganos internos y músculos (21,25).

1.2.5. Diagnóstico y manejo clínico de la CCV

A pesar de que la CCV se considera un indicador robusto de morbilidad y mortalidad cardiovascular, en la práctica clínica el diagnóstico de CCV no está bien establecido y no existe un consenso de cómo aplicar las diferentes técnicas (64). En la actualidad la Sociedad Americana del Corazón y la Sociedad Europea conjunta de Cardiología recomiendan determinar la presencia de calcificación en la arteria coronaria sólo en aquellos individuos que presenten un riesgo medio (riesgo evento cardiovascular grave del 10-20% en 10 años) y el resultado determinaría si realizar un seguimiento más activo y frecuente para prevenir eventos cardiovasculares futuros (64,65).

Existe una amplia gama de técnicas invasivas y no invasivas para determinar cualitativa y cuantitativamente la presencia de CCV (Tabla 1). Las pruebas diagnósticas ideales para la CCV tienen que cumplir los siguientes requisitos: (I) ser específicas para minerales de fosfato cálcico, (II) no invasivas, (III) completamente cuantitativas, (IV) reproducibles, (V) estandarizadas, (VI) con suficiente resolución para distinguir la calcificación de la media y de la íntima, y (VII) suficientemente sensibles como para detectar microcalcificaciones o mineralización activa (64).

Tabla 1. Pruebas preclínicas y clínicas para la detección de la CCV. Tabla adaptada de Smith et al (64).

Método	Utilidad Clínica	¿Invasivo?	¿Estandarizado y cuantitativo?	¿Puede distinguir entre lesiones íntimas y medias?	¿Macro-calificación?	¿Micro-calificación?	Observaciones
Ex vivo							
Tinción rojo alizarina	No usado en la rutina clínica	Si	No	Si	Si	Si	Este colorante se une a los depósitos de mineral y otros iones divalentes. No es muy sensible frente a la enfermedad calcificante temprana y pequeños microdepósitos.
Tinción von Kossa	Si, en la biopsia de piel de la enfermedad CUA	Si	No	Si	Si	Si	Este colorante se une a los depósitos minerales de fosfato. Además, reacciona con pigmentos de los melanocitos. No es suficientemente sensible para detectar la enfermedad en sus fases tempranas.
Colorimetría cresolftaleína	Sólo investigación	Si	Si	No	No	No	Mide el calcio total. Necesita extracción de calcio a partir del tejido y además se ve interferido por la presencia de magnesio.
Colorimetría de molibdato	Sólo investigación	Si	Si	No	No	No	Mide el fosfato inorgánico total. Necesita ser extraído a partir del tejido y pueden interferir la presencia de anticoagulantes como EDTA, citrato y oxalato
Fluorescencia próxima al infra-rojo (NIRF)	Sólo investigación	Si	No	No	Si	Si	Técnica de potencial aplicabilidad en humanos a través de catéter, pero necesita validarse. Conjugados bisfosfato fluorescentes (como OsteoSense) tienen mayor afinidad por las fases minerales cristalinas que por las amorfías
In vivo							
Radiografía simple	Si, radiografía lumbar en AAC	No	Semi	No	Si	No	Simple y disponible ampliamente. Menor exposición a la radiación pero menor sensibilidad a la TC. Se describen sistemas de puntuación semicuantitativos pero carecen de validación biológica.
TC	Si, valor CAC	No	Si	No	Si	No	Permite una cuantificación rápida de la macro calcificación (>300 µm). los índices de volumen y densidad pueden ofrecer información complementaria. Resolución espacial baja, exposición a radiación ionizante y puntuaciones de calcificación validadas pero reproducibilidad subóptima y artefactos posteriores de adquisición.
TUS	Ocasional en carótida o femoral	No	No	Algunos	Si	No	Resolución espacial máxima ~100-200µm. Algunos permiten diferenciar entre calcificación íntima y media debido a los diferentes patrones de las lesiones avanzadas.
MRI	No usado de manera rutinaria	No	Si	No	Si	No	Resolución superior en el tejido con exposición a la radiación pero adquisición prolongada y susceptibilidad a los efectos del movimiento.
CCTA	Si	No	No	No	Algunos	No	Resolución espaciotemporal superior a la TC sin contraste pero los agentes de contraste de yodo dificultan la identificación de depósitos minerales.
IVUS	Si	Si	No	Algunos	Algunos	No	Buena resolución espacial (100-200µm) pero resolución axial limitada (150µm). Dificultad para identificar los componentes de la placa.
OCT	Si	Si	No	Si	Algunos	No	Tiene resolución espacial alta (10-15µm) pero resolución axial limitada (1-3 mm). Dificil distinguir los depósitos minerales del núcleo lipídico.

Abreviaciones: CUA: arteriopatía urémica calcificante, AAC: calcificación aorta abdominal, CAC: calcificación coronaria, TC: tomografía computerizada, TUS: ultrasonografía transcutánea, MRI: resonancia magnética de imagen, CCTA: angiografía coronaria por TC, IVUS: ultrasonografía intravascular, OCT: tomografía de coherencia óptica.

1.2.5.1. Tomografía computerizada (TC): calcificación de la arteria coronaria

Actualmente se considera que la técnica de imagen *gold estándar* para la identificación y cuantificación de la CCV es la TC (64,66). Si bien la calcificación de los tejidos blandos se puede visualizar con cualquier tipo de TC, la introducción del haz de electrones en esta técnica permitió cuantificar con mayor precisión la calcificación de las arterias coronarias (CAC). Se trata de una técnica que tiene suficiente resolución temporal (suficiente velocidad de imagen para compensar los movimientos cardíacos y respiratorios) y resolución espacial (cortes suficientemente delgados al realizar las imágenes) para visualizar la CAC (Figura 4). En algunos hospitales, se ha visto reemplazada por la TC multidetector que tiene una resolución espacial superior y una resolución temporal comparable (66).

Se han desarrollado varios algoritmos para cuantificar la CAC y proporcionar un valor conocido como *coronary artery calcium score*, aunque el algoritmo de referencia es el desarrollado por Agatson *et al* en 1990 (67). Un incremento del *coronary artery calcium score* podría deberse a un aumento de volumen, de densidad o de ambos, lo que tiene implicaciones pronósticas diferentes. En varios estudios multi-étnicos se ha descrito que un incremento en la densidad de la CAC se correlaciona inversamente con el riesgo de padecer un evento cardiovascular grave, mientras que un incremento en el volumen del CAC se relaciona positivamente con eventos cardiovasculares graves (68,69). Una de las limitaciones de este método es que no diferencia entre volumen y densidad de la CAC ya que en la evaluación del riesgo resulta imprescindible conocer ambos puesto que se relacionan de forma opuesta con el riesgo cardiovascular (64).

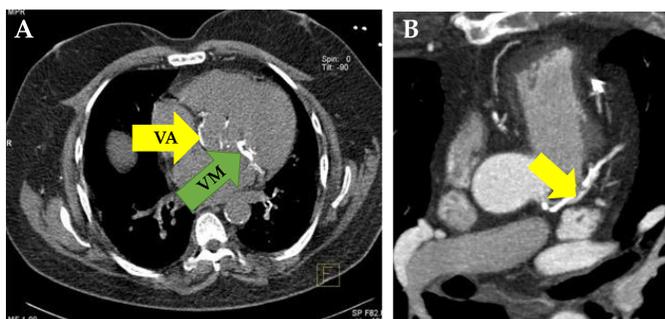


Figura 4. Imágenes representativas de TC en diferentes planos. (A) Imagen de TC axial del corazón. La flecha amarilla señala la raíz aórtica y la válvula aórtica calcificada (VA) y la flecha verde la válvula mitral calcificada (VM). (B) Imagen de angiografía por TC multiplanar del corazón. La flecha señala una placa blanda no calcificada entre dos áreas calcificadas densas en la arteria coronaria descendente anterior izquierda. Figura adaptada de *Raggi et al* (66).

Finalmente, cabe destacar el elevado coste que tienen estas técnicas de imagen (75 a 500 dólares por paciente) lo que supone un elevado gasto por

Introducción

individuo para el sistema sanitario. Además, se ha descrito que la realización de una sola TC a los 40 años conlleva una exposición a la radiación que incrementa el riesgo de padecer cáncer. Riesgo que se estima causante de 9 cánceres de cada 100.000 hombres y 28 de cada 100.000 mujeres que se someten a esta prueba. Además, se estima que después de cada procedimiento 1 de cada 4 pacientes experimenta nefrotoxicidad (64,70).

1.2.6. Tratamientos actuales de la CCV

Actualmente no existe tratamiento farmacológico para revertir la CCV. Los objetivos sobre los que se puede actuar son los reguladores clave del proceso de calcificación como la precipitación de los complejos fosfato-calcio, los calcimiméticos, la vitamina D, los bifosfonatos, la vitamina K o la reducción de la ingesta de calcio con la finalidad de retrasar o atenuar el proceso (24,49,71).

Debido a que la CCV se ve favorecida por concentraciones elevadas de fosfato, uno de los tratamientos más usados son los quelantes de fosfato. Entre ellos destaca el Sevelamer que atenuaría la progresión de la CCV aunque solo parece eficaz si se administra en etapas muy tempranas de la enfermedad (72). El tiosulfato de sodio es un quelante del calcio y a la vez antioxidante que podría prevenir el desarrollo de CCV. Sin embargo, se necesitan más estudios que analicen la eficacia de esta estrategia (73). También la vitamina D ha suscitado interés ya que regula una gran variedad de vías fisiológicas y metabólicas (74,75). Existen varios análogos de vitamina D comerciales como el calcitriol, alfacalcidol, calcidiol, paricalcitol, maxacalcitriol y doxercalciferol. Algunos ensayos clínicos han concluido que dosis bajas de calcitriol y paricalcitol podían proteger de la CCV (24).

Otra de las estrategias terapéuticas para la CCV sería el uso de bifosfonatos (análogos de los pirofosfatos) que podrían entorpecer la nucleación y el crecimiento de los cristales de hidroxapatita (73). Estos análogos se usan para el tratamiento de la osteoporosis y en ensayos experimentales el Etidronato ha conseguido atenuar la CCV (53,73). Los suplementos de vitamina K resultan esenciales para la coagulación sanguínea y el mantenimiento de la homeostasis de la calcificación. De hecho, el tratamiento de la enfermedad renal crónica con warfarina (antagonista de la vitamina K) incrementa significativamente el riesgo de desarrollar CCV (73). En algunos estudios se reportó que la suplementación de vitamina K no previno la calcificación aórtica, pero si atenuó la calcificación de las válvulas (24).

El uso de calcimiméticos, que mimetizan la acción del calcio en las células, se encuentra entre las estrategias estudiadas para retrasar la CCV con éxito. Algunos calcimiméticos como R-568 o AMG-641 han sido probados para prevenir la CCV (24). El mioinositol hexafosfato (IP6), conocido como Sanifit's

SN472, ha sido descrito para el tratamiento de la CCV (76). Este compuesto, que se encuentra de manera fisiológica dentro de las células, inhibe la formación y el crecimiento de cristales de hidroxapatita sin interferir de manera directa con los niveles circulantes de fosfato y calcio (76). Finalmente está en desarrollo el fármaco Denosumab, un anticuerpo monoclonal que puede inhibir la vía RANKL y mimetizar la acción natural de la osteoprotegerina. También está en desarrollo un inhibidor de la ALPL, enzima con un papel clave en la CCV (24).

2. Receptores nucleares (NRs)

La superfamilia de receptores nucleares representa el grupo más numeroso de factores de transcripción en eucariotas y regula programas biológicos implicados en un amplio espectro de procesos fisiológicos (77,78). Su estudio filogenético sitúa su aparición en la evolución de los metazoos, mucho antes de la divergencia entre vertebrados e invertebrados (79). En la actualidad, se han descrito 48 miembros de esta superfamilia gracias a la secuenciación del genoma humano (77,79,80).

Los NRs modulan la transcripción de genes diana a través de una variedad de mecanismos que incluyen tanto mecanismos de activación como de represión. La señalización de los NRs es notablemente compleja ya que puede ser genómica o no-genómica, dependiente o independiente de ligando y puede mediar la represión génica, la liberación de la represión génica, la activación génica o bien la transrepresión génica (79,80). Además, los NRs también pueden ser dianas de otras vías de señalización que los modifican post-traduccionalmente afectando a su función (79). De manera general, los NRs se unen al ADN en secuencias específicas del genoma y desencadenan el reclutamiento de proteínas correguladoras, remodeladores de cromatina y maquinaria transcripcional activando o reprimiendo la expresión de los genes (78).

Los NRs juegan un papel clave en una gran variedad de procesos fisiológicos como el metabolismo, el equilibrio de electrolitos, la proliferación celular, la respuesta inmune, la actividad enzimática, el desarrollo y la reproducción (77,81). Asimismo, se han relacionado con una gran variedad de procesos patológicos como el cáncer, los síndromes neurológicos y psiquiátricos, la inmunosupresión, la diabetes, la artritis reumatoide, el asma, las enfermedades cardiovasculares y el síndrome metabólico, entre otras (77,78,82). Es por ello que aunque la primera evidencia bioquímica de la presencia de NRs se remonta al 1960 y la clonación del primer NRs al 1985, la investigación sobre los NRs continúa suscitando gran interés biomédico como base del desarrollo de nuevos fármacos (77,78,83).

Introducción

2.1. Clasificación de los NRs

Aunque la función y el modo de acción de los NRs es muy diverso, todos ellos presentan una organización estructural muy conservada en la evolución (79). La alineación de secuencias y la construcción de un árbol filogenético permitió la clasificación de la superfamilia de los NRs humanos en siete subgrupos (Tabla 2) (78,79):

- Subgrupo 0:** incluye NRs atípicos con un solo dominio de unión a ligando, como el gen DAX y el gen SHP.
- Subgrupo 1:** gran subfamilia formada por receptores de hormonas tiroideas.
- Subgrupo 2:** subfamilia que incluye receptores similares a los receptores de retinoides X.
- Subgrupo 3:** grupo de NRs que incluye receptores de esteroides.
- Subgrupo 4:** subgrupo que contiene los receptores nucleares huérfanos indispensables para el desarrollo neurológico.
- Subgrupo 5:** incluye los NRs esteroidogénicos.
- Subgrupo 6:** incluye un único receptor nuclear, GCNF (*Germ Cell Nuclear Factor*) imprescindible para el correcto desarrollo.

2.2. Estructura de los NRs

Una de las características comunes que comparten todos los miembros es su estructura en dominios modulares. Ésta, en general, se compone de seis dominios (A-F) cada uno de los cuales juega un papel biológico clave (Figura 5). El peso molecular de los NRs es variable y oscila entre los 66 y los 100 kDa.

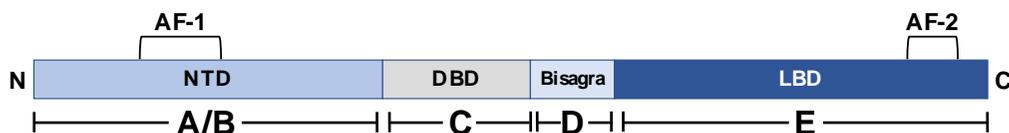


Figura 5. Representación esquemática de la estructura canónica de los NRs. Estructura modular de los NRs compuesta por un dominio N-terminal (NTD) que contiene la región activadora de función 1 (AF-1), un dominio en dedos de zinc de unión a ADN (DBD), una región flexible que actúa de bisagra y un dominio de unión a ligando (LBD) que interacciona con proteínas correguladoras a través de la región activadora de función 2 (AF-2). Figura adaptada de *Martínez-González et al* (81).

2.2.1. Dominio A/B

El dominio A/B o dominio N-terminal (NTD) tiene una secuencia poco conservada y con un tamaño muy dispar entre los NRs. El NTD contiene la región activadora de Función 1 (AF-1) que interacciona con las proteínas correguladoras

de manera célula específica (78,79,81). Se trata de una región con estructura alfa-helicoidal que es susceptible de experimentar *splicing* alternativo. Además, es la región donde se producen las modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, la acetilación y la SUMOilación (78).

2.2.2. Dominio C

Contiene el dominio de unión al ADN (DBD), se encuentra en la parte central de los NRs y es la región más conservada (78,79). Los NRs se unen a secuencias específicas de ADN denominadas elementos de respuesta a hormonas (HREs) que comprenden seis nucleótidos (5'-AGAACA-3' o 5'-AGGTCA-3') dispuestos como monómeros, repeticiones invertidas o repeticiones directas (79,82).

El DBD a su vez se divide en dos subdominios cada uno de los cuales está formado por cuatro residuos de cisteína que se coordinan con un ion de zinc para formar el motivo de dedo de zinc de unión al ADN (78,82). El primer subdominio contiene la hélice de reconocimiento del ADN y realiza interacciones específicas con algunas bases del ADN mientras que el segundo dominio establece contactos no específicos (78).

2.2.3. Dominio D

Se trata de una región bisagra corta que hace de puente entre la región DBD y la de unión a ligando. Esta región está codificada por la secuencia muy corta y poco conservada entre los NRs. La señal de localización nuclear de los NRs puede estar en este dominio (78,79).

2.2.4. Dominio E

Dominio de unión a ligando (LBD) que contiene un dominio de señalización alostérica complejo que, además de unirse a ligandos, interacciona directamente con proteínas correguladoras. Este dominio está conservado de manera general y contiene once hélices α y cuatro láminas β para formar una estructura de sándwich helicoidal tipo alfa. Este empaquetamiento permite crear un bolsillo hidrofóbico para la unión a ligando en la base del receptor (78,82).

Además, contiene la región activadora de Función 2 (AF-2) compuesta por las hélices 3, 4 y 12. Se ha demostrado que la hélice 12 es la conformacionalmente dinámica tras la unión del ligando (78,79,82). Finalmente, también se ha descrito que los NRs pueden interaccionar con correpresores transcripcionales mediante este dominio (79).

2.2.4. Dominio F

Se trata del dominio situado en el extremo C-terminal de los NRs. Debido a su variabilidad de secuencia entre los diferentes NRs, se conoce poco sobre su estructura y su funcionalidad (84). Aunque muchos NRs pueden no tener este dominio, se trata de una región que no tiene actividad independiente y está

Introducción

implicado en la unión a ligando y en la modulación de la actividad transcripcional (84,85).

2.3. Mecanismos de acción

En base a sus mecanismos de acción, los NRs se han clasificado en cuatro subtipos (I-IV) (Figura 6):

-**NRs tipo I:** el NR representativo de este tipo sería el receptor de estrógenos. Estos receptores se activan por hormonas esteroideas derivadas del colesterol como estrógenos, andrógenos, progestágenos y corticoides. Este tipo de NR se encuentra “secuestrado” unido a chaperonas en el citoplasma. Cuando se produce la activación por unión del ligando, las chaperonas se intercambian y el NR se transloca al núcleo donde se une al ADN en forma de homodímeros a secuencias palindrómicas HREs.

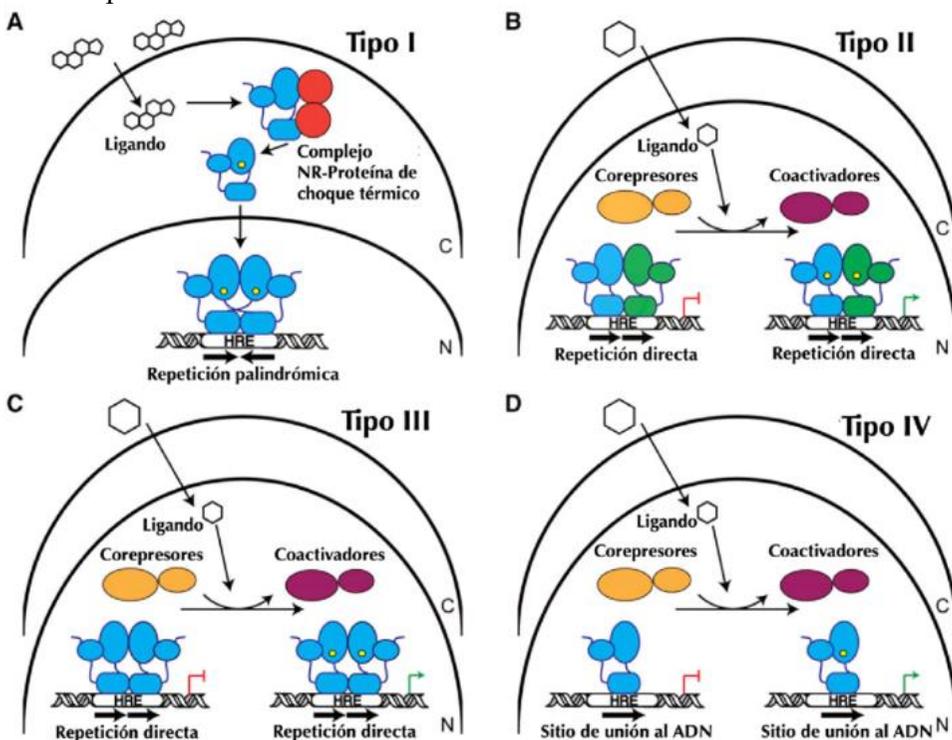


Figura 6. Representación gráfica de los distintos mecanismos de señalización de los NRs. (A) NRs de tipo I inactivos en el citoplasma unidos a chaperonas, tras la unión a ligando se liberan y se translocan al núcleo donde regulan la transcripción en forma de homodímeros. (B) NRs de tipo II localizados en el núcleo unidos a corepresores. Tras su activación, interaccionan con coactivadores e interaccionan con el ADN de forma heterodimérica. (C) NRs tipo III parecidos a los de tipo II pero se unen como homodímeros al ADN. (D) NRs de tipo IV idénticos a los de tipo III pero interaccionan de manera monomérica con el ADN. Figura adaptada de *Weikum et (78)*.

Tabla 2. Clasificación de los NRs humanos descritos. Se indica la familia, el grupo, el símbolo, la abreviatura y el ligando de cada uno de ellos. Tabla adaptada de *Weikum et al.* (78).

Familia	Grupo	Símbolo	Abreviatura	Ligando
0	B	NR0B1	DAX1	Huérfano
		NR0B2	SHP	
1	A	NR1A1	TR α	Hormonas tiroideas
		NR1A2	TR β	
	B	NR1B1	RAR α	Ácido retinoico
		NR1B2	RAR β	
		NR1B3	RAR γ	
	C	NR1C1	PPAR α	Ácidos grasos
		NR1C2	PPAR β	
		NR1C3	PPAR γ	
	D	NR1D1	REV-ERB α	Hemo
		NR1D2	REV-ERB β	
	F	NR1F1	ROR α	Esteroles
		NR1F2	ROR β	
		NR1F3	ROR γ	
	H	NR1H2	LXR β	Oxiesteroles
		NR1H3	LXR α	
NR1H4		FXR α	Ácidos biliares	
NR1H5P		FXR β	Huérfano	
NR1I1		VDR	1 α ,25-dihidroxitamina D3	
I	NR1I2	PXR	Endobióticos y xenobióticos	
	NR1I3			
2	A	NR2A1	HNF4 α	Ácidos grasos
		NR2A2	HNF4 γ	
	B	NR2B1	RXR α	Ácido 9-cis retinoico
		NR2B2	RXR β	
		NR2B3	RXR γ	
	C	NR2C1	TR2	Huérfano
		NR2C2	TR4	
	E	NR2E1	TLX	Huérfano
		NR2E3	PNR	
	F	NR2F1	COUP-TF α	Huérfano
NR2F2		COUP-TF β		
NR2F6		COUP-TF γ		
3	A	NR3A1	ER α	Estrógenos
		NR3A2	ER β	
	B	NR3B1	ERR α	Huérfano
		NR3B2	ERR β	
		NR3B3	ERR γ	
	C	NR3C1	GR	Glucocorticoides
		NR3C2	MR	Glucocorticoides y mineralcorticoides
NR3C3		PR	Progesterona	
NR3C4		AR	Andrógenos	
4	A	NR4A1	NGF1-B	Huérfano
		NR4A2	NURR1	Ácidos grasos insaturados
		NR4A3	NOR-1	Huérfano
5	A	NR5A1	SF-1	Fosfolípidos
		NR5A2	LRH-1	
6	A	NR6A1	GCNF	Huérfano

Introducción

-**NRs tipo II:** se incluyen en este grupo los RAR (*Retinoic Acid Receptor*) y LXR (*Liver X Receptor*) que están presentes en el núcleo independientemente del ligando que los activa. Cuando se activan por la unión a ligando, el receptor se libera del complejo con el correpresor y lo intercambia por coactivadores que interaccionan con otros componentes de la maquinaria transcripcional. Este tipo de receptores forman heterodímeros con RXR (*Retinoid X Receptor*) y se unen a elementos HREs de repetición directa.

-**NRs tipo III:** se trata de NRs, como el receptor de la vitamina D (VDR), que tienen un mecanismo de acción muy similar a los de tipo II pero se unen de forma homodimérica a elementos HREs de repetición directa.

-**NRs tipo IV:** se trata de NRs con un mecanismo de acción muy similar a los de tipo III que se unen como monómeros a elementos HREs. Es ejemplo de este tipo el factor esteroideogénico 1 (SF1) implicado en la determinación del sexo.

2.4. Subfamilia NR4A

La subfamilia cuatro de los NRs subtipo A (NR4A) está representada por tres miembros: NR4A1 (o NGFI-B/Nur77; gen B inducido por el factor de crecimiento nervioso), NR4A2 (o Nurr1; proteína 1 relacionada con el receptor nuclear) y NR4A3 (o NOR-1, también conocido como TEC, MENOR, CHN; *Neuron-derived Orphan Receptor 1*) (81,86).

Los tres miembros de esta subfamilia presentan una alta homología en su DBD (81,87). Se trata de NRs huérfanos ya que no se ha identificado un ligando fisiológico que se una a ellos. Se considera que los NR4As están constitutivamente activos y su actividad es independiente de ligando (81,87). Los receptores NR4A regulan la transcripción a través de la unión del DBD a secuencias específicas del promotor de sus genes diana. Una de las más comunes es el elemento octamérico NBRE (*NGFI-B Response Element*) cuya secuencia consenso es AAAGGTCA (Figura 7). Además, a través de los dominios NTD y LBD, los NR4A interaccionan y regulan la actividad, la estabilidad y la degradación de muchos otros factores de transcripción y proteínas correguladoras (87). Su actividad transcripcional se regula fundamentalmente por sus niveles de expresión, aunque también juegan un papel importante las modificaciones post-traduccionales y las interacciones proteína-proteína (81,87).

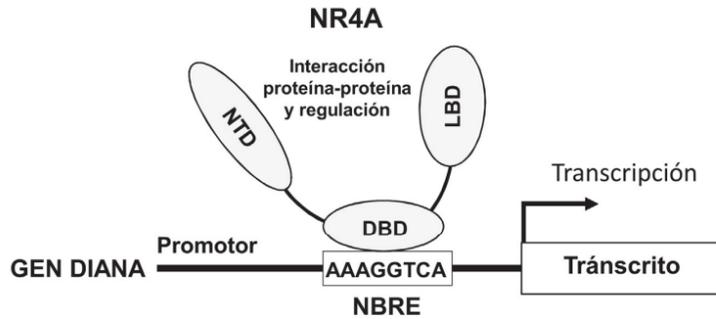


Figura 7. Estructura y función de los NR4A. Los receptores NR4A activan la transcripción a través de la unión del DBD a secuencias específicas del promotor de sus genes diana, entre las más comunes destaca el elemento octamérico NBRE cuya secuencia consenso es AAAGGTCA. El NTD es importante para la regulación de la actividad de estos factores de transcripción y para la interacción con cofactores y otros factores de transcripción. El LBD es un dominio multifuncional necesario para la dimerización y la interacción con otras proteínas. Figura adaptada de *Ballester-Servera et al (88)*.

Los NR4As son genes de respuesta temprana y se inducen rápidamente por una gran variedad de estímulos en tejidos y células en las que su expresión basal es muy baja (Figura 8) (88–90). Entre ellos destacan los factores de crecimiento (91,92), las LDLs nativas y oxidadas (93–95), las citoquinas angiogénicas e inflamatorias (93,96,97), las hormonas (98), la trombina (99,100), la hipoxia (99,101,102), los factores físicos y mecánicos (103,104), así como los factores neuronales de despolarización de membrana (81,105). Las modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, la acetilación y la SUMOilación también pueden alterar la actividad de los NR4A (106–108). Estos NRs se expresan en una gran variedad de tejidos, pero la mayor expresión de NR4As se localiza en cerebro, corazón, músculo esquelético, tejido adiposo, riñón e hígado (81,109,110).



Figura 8. La expresión de los receptores NR4A es inducida por multitud de estímulos. Los tres miembros NR4A (Nurr1, Nur77 y NOR-1) son genes cuya expresión aumenta de forma muy rápida en respuesta a un gran número de estímulos fisiopatológicos y físicos. Figura adaptada de *Ballester-Servera et al* (88).

La subfamilia NR4A ejemplifica la amplia gama de funciones que cumple la superfamilia de NRs ya que participan en múltiples procesos celulares como la proliferación, la diferenciación, la apoptosis, la supervivencia, la inflamación, el desarrollo embrionario y neuronal, el metabolismo lipídico y de carbohidratos así como la adaptación fisiológica al ejercicio o la regeneración hepática (81,111–117). Esto permite explicar la participación de los NR4As en una gran variedad de patologías humanas con elevada incidencia como las enfermedades cardiovasculares (89,118,119), la obesidad (120,121), la diabetes (122), el cáncer (123,124) o la enfermedad del Parkinson (Figura 9) (81,125).

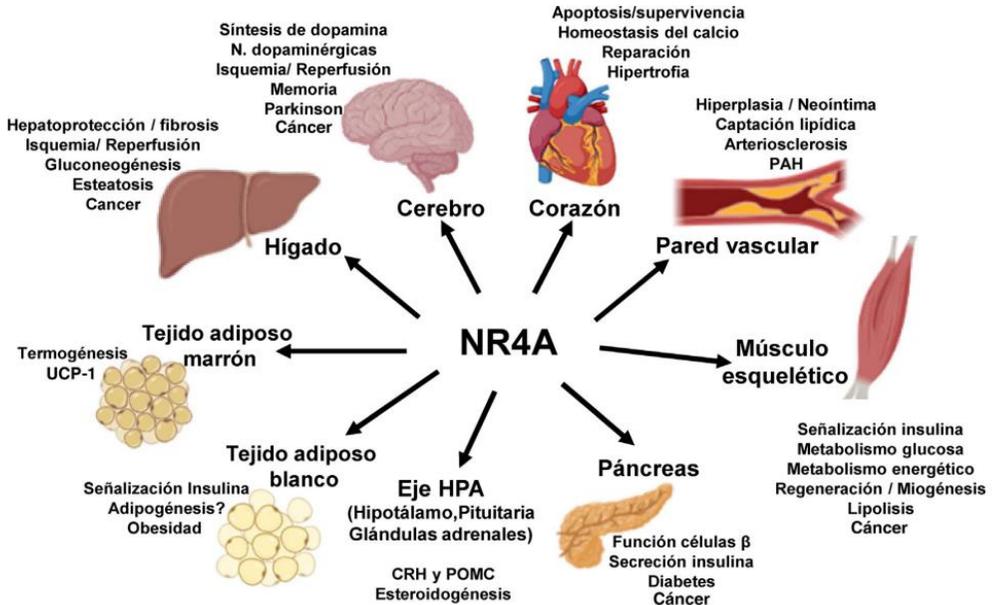


Figura 9. Resumen de algunos de los efectos de los receptores NR4A en diferentes órganos. Se indican los procesos en los que intervienen estos receptores y las patologías con las que se ha asociado su desregulación. Figura adaptada de *Ballester-Servera et al* (88).

Abreviaturas: UCP-1: uncoupling protein one; PAH: Hipertensión pulmonar arterial; HPA: Eje hipotalámico-pituitario-adrenal; CRH: hormona liberadora de corticotropina; POMC: proopiomelanocortina.

2.4.1. Unión al ADN

Tras la inducción de la expresión de los receptores NR4A, éstos se pueden unir a secuencias específicas del ADN en forma monomérica o dimérica. Cuando la unión es en forma monomérica se unen a una secuencia específica denominada elemento NBRE formada por una secuencia consenso de ocho nucleótidos (5'-AAAGGTCA-3') (Figura 10) (126).

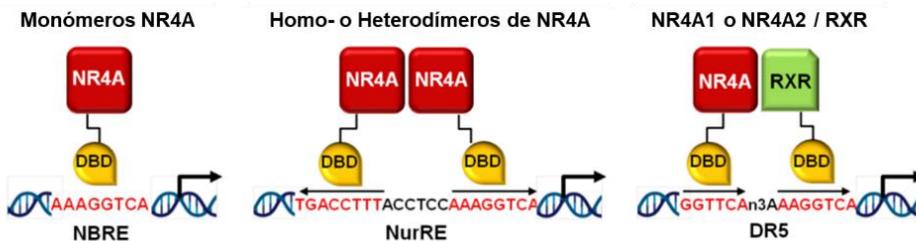


Figura 10. Unión de los NR4A a los elementos de respuesta de los promotores. Los receptores NR4A se unen específicamente a los motivos de ADN del promotor de sus genes diana. Se pueden unir al elemento NBRE del ADN en forma de monómeros, al elemento NurRE en forma de homodímeros o heterodímeros y, los NR4A1 y NR4A2, como heterodímeros con el receptor de retinoides (RXRs) a un motivo DR-5. Figura adaptada de *Martínez-González et al* (81).

En cambio, cuando la unión es en forma de homodímeros se unen a secuencias denominadas NurRE (*Nur-Response Element*) compuestas por dos

Introducción

octámeros invertidos de secuencia similar a la del elemento NBRE (5'-TG(G/A)(C/T)ATTTn6AAAT(G/A)(C/T)CA-3') separados por un número limitado de nucleótidos (Figura 10) (127). El receptor NOR-1 presenta menor afinidad por este elemento y menor capacidad para iniciar la transcripción (128). Asimismo, los receptores Nurr1 y Nur77, pero no NOR-1, pueden unirse al ADN en forma de heterodímeros junto con el RAR a una secuencia imperfecta de tipo repetición directa separada por cinco nucleótidos (5'-GGTTCAccgaaAGGTCA-3') denominada DR-5 (Figura 10) (129,130).

2.4.2. Estructura genética y proteica de los NR4A

El gen humano que codifica para NOR-1, ubicado en el brazo corto del cromosoma 9, está compuesto por más de 35 Kb y está constituido por ocho exones y siete intrones. Además, se ha identificado que el gen se transcribe en forma de dos transcritos que codifican para 626 aminoácidos con una masa molecular aproximada de 68 kDa (131). Su elevada homología con los receptores Nurr1 y Nur77 lo convirtió en el tercer miembro de la subfamilia NR4A.

Los tres miembros de la subfamilia NR4A contienen la estructura típica de los NRs caracterizada por la presencia de un dominio de transactivación AF-1 en la región N-terminal, un dominio conservado DBD y un dominio de unión a ligando LBD en su extremo C-terminal. Todos los miembros muestran un elevado grado de homología en su dominio DBD (90-95%) y en su dominio LBD (60%); sin embargo, divergen mucho en su extremo N-terminal (conservación 20-30%) (132,133).

Aunque los receptores NR4A comparten la estructura típica de los NRs, esta subfamilia presenta ciertas particularidades, especialmente en el dominio LBD. De hecho, análisis cristalográficos de rayos X del dominio LBD revelan la presencia de grandes residuos hidrofóbicos y estrechamente empaquetados que ocupan el espacio que debería corresponder al bolsillo de unión a ligando (134,135). Sin embargo, se ha descrito que la citosporona B, un compuesto fúngico presenta una elevada afinidad por el dominio LBD del receptor NR4A1 (133,136). Asimismo, se ha propuesto que las prostaglandinas E1 y A1 y el *5,6-dihydroxyindole* podrían ser ligandos endógenos para NR4A2 (137).

2.4.3. Papel de los receptores NR4A a nivel cardiovascular

Los receptores NR4A son genes cuya expresión se induce por daño intravascular, en respuesta a diferentes estímulos aterogénicos y en lesiones ateroscleróticas avanzadas (89,133). De manera general, en las células expuestas a factores ambientales que implican remodelado vascular la expresión de los NR4A se induce rápidamente (133). Estos receptores pueden regular genes implicados en el control de la inflamación, la proliferación, la apoptosis, la trombosis y la angiogénesis (89,133). Sin embargo, el papel de estos receptores en las diferentes

enfermedades cardiovasculares no se conoce totalmente. De hecho, se han atribuido funciones aparentemente contrarias a los receptores NOR-1 y Nur77, como por ejemplo funciones pro- y anti-aterogénicas de uno y otro (138).

2.4.3.1. NR4A en la aterosclerosis

Nuestro grupo describió por primera vez el aumento de la expresión de NOR-1 en lesiones ateroscleróticas humanas y lesiones vasculares de un modelo porcino sometido a una dieta aterogénica o sujeto a daño mecánico intravascular (88). Además, los tres miembros NR4A (Nurr1, Nur77 y NOR-1) se sobreexpresan en respuesta a estímulos que promueven el desarrollo de la aterosclerosis en todos los tipos celulares que participan en el proceso, lo que sugirió el papel proaterogénico de estos receptores (88,89,97,100,139). Los primeros abordajes experimentales realizados para conocer el papel de NOR-1 en el remodelado cardiovascular generaron cierta controversia ya que se observó un mayor engrosamiento de la neointima en un modelo murino de ligación de arteria carótida en el que se suprimió la actividad transcripcional de los tres receptores. Estudios posteriores, permitieron aclarar que los receptores NR4A no son redundantes y que ejercen efectos opuestos sobre la proliferación de células endoteliales y CMLVs (88).

A continuación, se resumen los estudios que han permitido conocer el papel de NOR-1 en los diferentes tipos celulares implicados en la aterosclerosis.

2.4.3.1.1. NOR-1 en la disfunción endotelial y en la inflamación

Las células endoteliales expresan NOR-1 y esta expresión aumenta en respuesta a estímulos que perturban la función endotelial y promueven la migración, la proliferación y la supervivencia celular. De hecho, cuando las células endoteliales se exponen a concentraciones crecientes de VEGF o de trombina, la inducción de NOR-1 aumenta de manera transitoria y muy acentuada, mientras la inhibición de este NR bloquea la migración y la proliferación celular inducida por estos estímulos (97,100,140). El estrés hipóxico también induce la expresión de NOR-1 mediante la regulación directa de su promotor por HIF-1 (*Hypoxia-Inducible Factor 1*). En este caso, la sobreexpresión de NOR-1 promueve la supervivencia celular mientras que su inhibición incrementa la proporción de células que mueren por apoptosis (88,101). En este efecto antiapoptótico de NOR-1 juega un papel crucial la proteína antiapoptótica cIAP2 (*Cellular Inhibitor Apoptosis 2*) ya que NOR-1 la regula a la actividad transcripcional de la cIAP2 de manera directa a través de la unión al elemento NBRE de su promotor (101). Respecto la angiogénesis, se ha propuesto que NOR-1 regula la expresión de endotelina 1 (ET-1), péptido vasoconstrictor con actividad proangiogénica, mientras que la inhibición de este factor de transcripción disminuye la migración celular y la

Introducción

formación de angiotubos de células HBMEC (*Human Brain Micro Endotelial Cells*) (88,141).

Los estímulos proinflamatorios también aumentan la expresión endotelial de NOR-1 lo que se ha asociado con la inducción de VCAM-1 (142). En esta regulación estarían implicados de forma indirecta dos microRNAs que modulan los niveles de NOR-1 (miR-17 y miR-20a) (143). Asimismo, la deficiencia de NOR-1, y la consiguiente reducción de la expresión de VCAM-1, disminuyen el contenido de macrófagos y el desarrollo de placas ateroscleróticas en modelos de animales de aterosclerosis experimental (142). En este contexto, se describió que NOR-1 regula el receptor RIP3 (*Receptor-Interacting Protein Kinase 3*) en los macrófagos de lesiones ateroscleróticas lo que modula la producción de citoquinas, induce inflamación y exacerba la aterosclerosis (144). NOR-1 también está inducido en pacientes diabéticos y se ha relacionado con los efectos proinflamatorios y proaterogénicos de la apolipoproteína A-IV glicada (g-ApoA-IV) (145). De hecho, esta apolipoproteína induce la expresión de NOR-1 y al silenciarlo se previene la respuesta inflamatoria producida por g-ApoA-IV. Sorprendentemente, NOR-1 podría tener efectos antiinflamatorios en el endotelio a través de la regulación de la trombomodulina, proteína con actividad anticoagulante, antiinflamatoria y antifibrinolítica (146).

Recientemente, se ha descrito la regulación post-traducciona de NOR-1 a nivel endotelial mediada por ROS. En efecto, la privación de glucosa y oxígeno y la posterior reoxigenación de células endoteliales produce una disminución de los niveles proteicos de NOR-1 (147). Este efecto se previene por el tratamiento con el antioxidante TRIOL, de manera que en modelos experimentales tratados con este compuesto se produce una recuperación de los niveles de NOR-1 que se asocia con la mejora de la permeabilidad de la barrera endotelial promovida por la hipoxia hipobárica (147).

2.4.3.1.2. NOR-1 en las CMLVs

Las CMLVs no proliferativas (quiescentes) tienen una expresión de NOR-1 muy baja. Sin embargo, este factor de transcripción se induce fuertemente en respuesta a diferentes estímulos como factores de crecimiento, trombina, LDLs nativas y oxidadas y citoquinas proinflamatorias (88,91). NOR-1 participa en los mecanismos moleculares que regulan la migración y la proliferación de estas células, así como su respuesta inflamatoria (92). Efectivamente, la inhibición de su expresión reduce la respuesta migratoria y proliferativa de las CMLVs en cultivo (92,140).

La generación de animales modificados genéticamente ha sido crucial para estudiar la función de NOR-1 en la pared vascular. Nuestro grupo generó un modelo de ratón transgénico que sobreexpresa el receptor nuclear NOR-1

humano de manera específica en las CMLVs (TgNOR-1^{CMLV}) (148). Al inducir lesión vascular mediante ligadura de carótida a estos animales, se observa un remodelado exacerbado que desencadena un mayor engrosamiento de la neointima (148). Además, las CMLVs de animales transgénicos tienen características de CMLVs menos diferenciadas, como una mayor expresión de SMem_b (*Embryonic Smooth Muscle Myosin Heavy Chain*) y mayor capacidad proliferativa (148). Estos resultados son coherentes con los hallazgos obtenidos en un modelo deficiente para NOR-1 sometido a daño arterial en el que se observó que la formación de la neointima disminuye significativamente respecto a los ratones salvajes y, además, las CMLVs son menos proliferativas (149). Este efecto a favor de la proliferación se asocia con la capacidad de NOR-1 de regular la expresión de ciclina D1 a nivel transcripcional, imprescindible para la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular en la que se produce la replicación del ADN (149).

Además de genes y proteínas esenciales del ciclo celular regulados de manera directa o indirecta por NOR-1, en los últimos años, se ha involucrado la regulación por NOR-1 de varios genes de la MEX implicados en el remodelado vascular. NOR-1 regula la expresión y actividad de las MMPs a través de varios mecanismos, entre ellos la regulación transcripcional de la alfa-2-macroglobulina (A2M) (150). También cabe destacar la regulación de la expresión de la vitronectina (VTN), una glicoproteína que participa en la adhesión, la migración y la proliferación celular, así como en la trombosis y la fibrinólisis (81). De hecho, se ha descrito la colocalización de NOR-1 y la VTN en lesiones ateroscleróticas humanas y que NOR-1 promueve la inducción de VTN y de este modo contribuye a la migración de las CMLV (151).

Además, NOR-1 se ha relacionado con el control de la homeostasis redox mediante la regulación de enzimas involucrados en la producción de ROS. La sobreexpresión de NOR-1 en CMLVs humanas incrementa la producción de ROS de manera simultánea a un aumento en los niveles de NADPH oxidasa 1 (NOX1) (88,152). La regulación de NOX1 por NOR-1 se confirmó mediante silenciamiento génico y por la colocalización de ambas proteínas en lesiones ateroscleróticas humanas (88,152). Más recientemente, se ha identificado un ARN largo no codificante (lncRNA, *long coding RNA*) que se induce en CMLVs estimuladas con angiotensina II (AngII) a través de NOR-1. Se observó una regulación coordinada de NOR-1 y Lnc-Ang164 por la AngII y otros factores de crecimiento, y cómo el silenciamiento de este lncRNA inhibió tanto el estrés oxidativo como la proliferación inducidos por AngII (153).

Introducción

2.4.3.1.3. NR4A en la inflamación y el sistema inmune

La inflamación resulta esencial para la protección frente a estímulos físicos, químicos y biológicos, sin embargo, una inflamación inapropiada o exacerbada causa daño tisular en una gran variedad de enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide, la psoriasis o la aterosclerosis (154).

Diferentes estímulos inflamatorios como IL-1 β , LDLox, lipopolisacáridos (LPS) y TNF α inducen la expresión de NOR-1 en CMLVs (93,142). A su vez, la sobreexpresión lentiviral de NOR-1 disminuye la expresión basal de citoquinas y quemoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP1 y CCL20) y su expresión, en cambio, aumenta al silenciar NOR-1 (93). En concordancia, en animales transgénicos para NOR-1 se observa una atenuación de la respuesta inflamatoria de la aorta en respuesta a la administración de LPS (93). Este efecto parece relacionado con la atenuación de las vías de señalización dependientes de quinasas activadas por mitógenos (ERK1/2, p38 MAPK y Jun N-terminal quinasa) cuya activación es menor en animales que sobreexpresan NOR-1 (88). Ello se traduce en una menor fosforilación y degradación de I κ B α , menor fosforilación y translocación de p65 al núcleo y en consecuencia menor activación de la vía NF κ B y de sus genes diana (88,93).

2.4.3.1.3.1. NOR-1 en monocitos y macrófagos

Los primeros estudios que abordaron el papel de los receptores NR4A en líneas celulares de macrófagos como THP-1 y RAW264.7 describieron su inducción por estímulos inflamatorios y lípidos oxidados a través de un mecanismo mediado por NF κ B por lo que se consideraron factores proinflamatorios (117).

Sin embargo, estudios posteriores han permitido establecer que estos receptores ejercen una función antiinflamatoria. En efecto, los tres miembros NR4A se expresan en los macrófagos de lesiones ateroscleróticas humanas y en experimentos de ganancia y pérdida de función en células *in vitro* se demuestra su capacidad para inhibir la activación de los macrófagos y su respuesta proinflamatoria (155). Los NR4A reducen la producción de citoquinas y quemoquinas así como la expresión de SR-A (*Scavenger Receptor type A*) y CD36, lo que disminuye la captación de LDLox y la formación de células espumosas (155).

Este papel antiinflamatorio en monocitos y macrófagos se ha visto reforzado por los estudios que relacionan a NOR-1 con la polarización de macrófagos a un fenotipo M2/antiinflamatorio (88). De hecho, la expresión de NOR-1 aumenta durante el proceso de polarización de monocitos humanos a macrófagos M2 mediante IL-4 (156). Además, su expresión en placas ateroscleróticas humanas es mayor en áreas enriquecidas en macrófagos CD68+MR+(156). Recientemente, el efecto proaterogénico de la ET-1, péptido

vasoconstrictor expresado principalmente en células endoteliales, pero también en CMLVs y macrófagos, se ha involucrado con los receptores NR4A (157). La sobreexpresión de ET-1 en células endoteliales promueve mayor secreción de miRNA-33 que atenúa la expresión de los receptores NR4A en macrófagos y así permite la activación del fenotipo proinflamatorio de éstos lo que favorece el desarrollo de aterosclerosis (158). La mayoría de los estudios indican un papel antiinflamatorio y antiaterogénico de NOR-1 en los monocitos y macrófagos. En consonancia, la deficiencia de NOR-1 específica de células madre hematopoyéticas acelera el reclutamiento de macrófagos y aumenta la aterosclerosis (159).

2.4.3.1.3.2. NOR-1 en linfocitos T y B

Los receptores NR4A tienen un papel clave en el desarrollo y la activación de los linfocitos T (160). En efecto, la apoptosis inducida por TCR (*T Cell Receptor*) en la selección negativa durante la diferenciación de los linfocitos T en el timo está regulada tanto por NOR-1 como por Nur77 (88,161). Los NR4A también son imprescindibles para el desarrollo de los linfocitos T reguladores (Treg). La especificación de su linaje y su función es controlada por el factor de transcripción Foxp3, cuya expresión es regulada por los receptores NR4A, especialmente por Nur77 y NOR-1 (162). Así, animales deficientes en los receptores NR4A en linfocitos no generan células Treg y mueren de manera prematura a causa de autoinmunidad sistémica (88).

Estudios recientes enfatizan el papel de la inmunidad y la importancia del balance entre Th17, Treg y sus citoquinas en el desarrollo de la aterosclerosis y en la rotura de las placas vulnerables (163,164). Nuestro grupo ha caracterizado un nuevo receptor de las LDLox en los linfocitos T, el CD69, que resulta imprescindible para la inducción de los receptores NR4A y la diferenciación de los Treg (95). A través de la unión a CD69, las LDLox inducen la expresión de los NR4A especialmente la de NOR-1 y desencadenan una respuesta antiinflamatoria, sobre todo NOR-1, e inhiben la formación de linfocitos Th17 (88). Además, los análisis en muestras de individuos participantes en el estudio PESA (*Progression of Early Subclincial Atherosclerosis*), sujetos con aterosclerosis subclínica, mostraron una menor expresión de CD69 y de los receptores NR4A, en leucocitos de sangre periférica lo que permite proponer a estos receptores como indicadores precoces de la enfermedad aterosclerótica (95,165).

En relación con los linfocitos B, cabe destacar que varios subtipos están implicados en la regulación de funciones tanto ateroprotectoras como proaterogénicas (166). Recientemente, se ha demostrado que la estimulación del receptor de antígenos de los linfocitos B induce rápidamente a NOR-1 y Nur77 (167). En cambio, un estudio en animales LDLR^{-/-}/Nur77^{-/-} alimentados con una

Introducción

dieta aterogénica se determinó que la delección de Nur77 en linfocitos B conlleva un aumento de la aterosclerosis (168).

2.4.3.1.3.3. NOR-1 en mastocitos, neutrófilos y células dendríticas

Los productos liberados por los mastocitos juegan un papel clave en la progresión de la aterosclerosis (88,169). Los procesos de degradación de la MEX, la muerte celular y el reclutamiento de mediadores inflamatorios en la pared vascular se ven favorecidos por la liberación de proteasas y factores de crecimiento secretados por mastocitos activados (88). Asimismo, se ha observado la inducción de NOR-1 en el proceso de activación de éstos (170). De hecho, frente a ciertas infecciones, NOR-1 es el gen más inducido de todo el genoma de los mastocitos y también es el principal receptor nuclear inducido por LPS en estas células (88,170,171). Aunque la secreción de citoquinas/quemoquinas de los mastocitos parece ser regulada por NOR-1, no se ha profundizado en el estudio del papel de NOR-1 en otros procesos en los cuales participan estas células como la vasodilatación, la homeostasis vascular, la angiogénesis y las respuestas inmunes innata y adaptativa (172,173).

También los neutrófilos y las células dendríticas están implicadas en los procesos de remodelado cardiovascular (174). Los neutrófilos son la primera línea de defensa del organismo y resultan fundamentales en la inmunidad innata (88). Uno de los genes más inducidos en estas células en respuesta a la proteína quinasa A (PKA) es NOR-1. Esta expresión de NOR-1 se ve aumentada en zonas de inflamación donde se acumulan neutrófilos y se ha descrito que su silenciamiento reduce la apoptosis de estas células, alargando su vida media (175).

Con relación a las células dendríticas, éstas participan en cada uno de los estadios de la aterosclerosis, que van desde la captación de lípidos a la secreción de citoquinas pro- y antiinflamatorias (88). NOR-1 participa en el proceso de activación e inducción de la expresión génica mediado por TLR (*Toll-Like Receptors*) y en la migración de estas células parece clave el papel que juega el eje NOR-1/FOXO1/CCR7 (176,177). También, se ha descrito que NOR-1 resulta crucial en la diferenciación de monocitos a células dendríticas (178).

2.4.3.2. NR4A en la CCV

Existen muy pocos estudios en los que se asocie la CCV con los NR4A. Recientemente, se ha descrito la inducción de Nur77 en lesiones calcificadas de modelos animales. En efecto, estudios *in vitro* describen un posible papel de Nur77 en la diferenciación osteoblástica de CMLVs inducida por lactato (179). Así, la diferenciación a célula osteoblástica se relaciona con la activación de la vía NR4A1/DNA-PKcs/p53, una mayor apoptosis y una aceleración de la transición fenotípica CMLV-osteoblasto y, finalmente, la deposición de calcio (57).

En el remodelado óseo, se ha relacionado a Nur77 con la migración y el reclutamiento de precursores osteoclásticos. Así, la activación de este receptor nuclear inhibe la expresión de OPN lo que desencadena una acumulación de osteoclastos y una pérdida de hueso (180). Además, se ha sugerido un papel relevante de Nurr1 en la formación del esqueleto, ya que regula la expresión de genes implicados en la diferenciación osteoblástica y, concretamente, se ha descrito la expresión de este receptor nuclear en células mesenquimáticas que son precursoras del esqueleto (181).

Pese a estos hallazgos, actualmente se desconoce si los NR4A y en particular NOR-1 podrían estar implicados en el proceso de la CCV.

3. Lisil Oxidasa

Los miembros de la familia Lisil Oxidasa (LOX) son enzimas responsables de iniciar el entrecruzamiento covalente entre las fibras de colágeno y elastina, contribuyendo así a las propiedades mecánicas de la MEX (182–184). Estos enzimas catalizan la deaminación oxidativa de grupos amina primarios que conducen a la formación de residuos de α -aminoaldehído δ -semialdehído y peróxido de hidrogeno (Figura 11) (182–187). El cobre presente en estos enzimas está involucrado en la transferencia de electrones hacia y desde el oxígeno para facilitar esta deaminación (188). Los aldehídos que se generan son muy reactivos y de manera espontánea pueden condensarse con otros aldehídos o con grupos ϵ -amino de otras lisinas e hidroxilisinas para formar entrecruzamientos covalentes intra- e inter-moleculares en las fibras de colágeno y elastina (182,186).



Figura 11. Reacción enzimática catalizada por los enzimas de la familia LOX. La actividad LOX permite la oxidación de los residuos de peptidil lisina en las cadenas de colágeno y elastina para convertirse en peptidil aldehídos. Figura adaptada de *Rodríguez et al* (185).

En mamíferos la familia de proteínas de las lisil oxidasas está compuesta por cinco miembros, la LOX y cuatro proteínas *LOX-like* (LOXL1-LOXL4) que comparten con LOX el 85, 58, 65 y 62% de similitud de su secuencia respectivamente (189). Se trata de aminooxidases dependientes de cobre que poseen un sitio de coordinación con cobre, un dominio catalítico altamente conservado y necesitan como cofactor a la LTQ (lisina tirosil quinona) (182). Estas enzimas tienen como sustratos el colágeno y la elastina, aunque también se han descrito algunos sustratos solubles como el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) y el TGF- β , sobre los que la LOX actúa inhibiendo su señalización.

Introducción

La LOX y la LOXL2, los dos miembros de la familia más estudiados se han localizado a nivel nuclear. De hecho, la histona H1 parece ser un sustrato específico de la LOX y su oxidación por este enzima podría tener un efecto al modular el grado de compactación de la cromatina que tendría un impacto sobre la transcripción génica (182,183). Además de su papel fundamental en la maduración de la MEX, los diferentes enzimas de la LOX participan en una gran variedad de procesos como el desarrollo, la reparación y el remodelado tisular (182,189). Alteraciones en el procesamiento de la MEX se han involucrado con enfermedades como el glaucoma, la fibrosis, el cáncer, la aterosclerosis, la insuficiencia cardíaca, la cirrosis hepática, los aneurismas y el síndrome de Menkes (183,189–191).

Todos los miembros de la familia LOX tienen el dominio catalítico muy conservado y difieren en el extremo N-terminal (Figura 12) (182,185). Mientras la LOX y la LOXL1 contienen un propéptido en su extremo N-terminal, la LOXL2, la LOXL3 y la LOXL4 carecen de él y tienen cuatro dominios SCRC (*Scavenger Receptor Cysteine-Rich*). La LOX y la LOXL1 se sintetizan en forma de prepropéptidos, se secretan como proenzimas y para su activación resulta imprescindible la escisión del propéptido (182,183,185). En el extremo C-terminal contienen un dominio CRL (*Cytokine Receptor Like*) que exhibe un motivo C-X₉-C-X-W-X₃₄-C-X₁₃-C, típico de los receptores de citoquinas de clase I, aunque se desconoce su función (182).

El dominio catalítico de los cinco miembros de la familia comparte más de un 50% de identidad de secuencia y contiene un sitio de coordinación con cobre. Este ion se incorpora a la LOX en el aparato de Golgi (Figura 13). Se ha descrito que la ATP7A (*ATPase copper transporting alpha*) es la encargada de transportarlo ya que su inhibición conlleva la pérdida de actividad de la LOX (189). El ion de cobre se coordina con tres residuos de histidina (H292, H294 y H296) que resultan esenciales para la formación del cofactor LTQ, necesario para la correcta actividad enzimática.

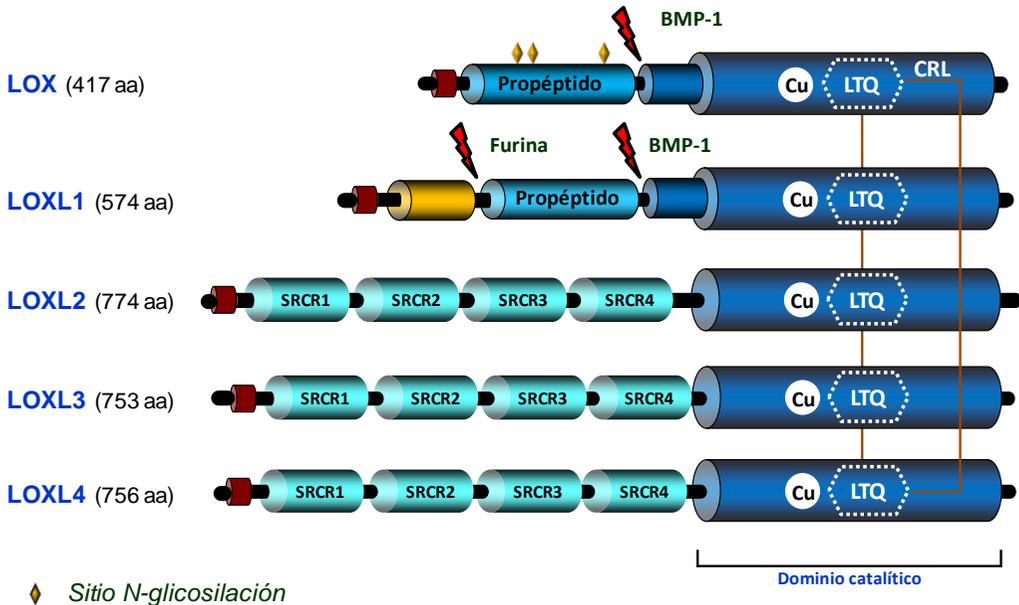


Figura 12. Organización de los dominios de los miembros de la familia LOX y la homología entre las isoenzimas LOX humanas. Las regiones C-terminal de las LOXs se corresponden con el dominio catalítico muy conservado, que contiene un motivo de coordinación con cobre y la región lisina tirosil quinona (LTQ), cofactor necesario para su actividad catalítica. En la imagen se indican los sitios susceptibles de escisión por BMP-1 (*Bone Morphogenic Protein 1*) en el propéptido de LOX y LOXL1 lo que permite el correcto procesamiento proteolítico de estas isoenzimas liberando sus formas activas. Los sitios de N-glicosilación en el propéptido se representan en forma de diamante amarillo en la LOX. Se indican también los cuatro dominios SRCR (*Scavenger Receptors Cysteine Rich*) que contienen las isoenzimas LOX en la región N-terminal. Figura adaptada de *Martínez-González et al* (183).

3.1. Procesamiento proteolítico de la LOX

La LOX y la LOXL1 se sintetizan y secretan al espacio extracelular en forma de precursores inactivos. Entonces sufren un procesamiento proteolítico mediado por la BMP-1 (*Bone Morphogenic Protein-1*) y otras proteinasas (*procollagen C-proteinases*) que liberan las formas catalíticamente activas de ambas enzimas y sus correspondientes propéptidos (Figura 13) (183,192). La LOX, la isoforma mejor caracterizada, se sintetiza como un precursor de aproximadamente 46 kDa que se procesa a la forma enzimáticamente activa de 32 kDa (185).

De manera más detallada, la BMP-1 cataliza la escisión del enlace entre las posiciones Gly¹⁶⁸-Asp¹⁶⁹ en la LOX humana. En la proLOX murina se ha identificado otro sitio de escisión en el enlace entre la Arg¹⁹² y la Pro¹⁹³ liberando otra isoforma de la LOX (35 kDa) (182). Al ser una secuencia también conservada en la especie humana se sugiere que también pueda producirse esta escisión. La MMP2 también procesa la proLOX al catalizar la escisión del enlace Asn¹⁵⁶-Leu¹⁵⁷.

Introducción

Recientemente, se ha descrito que la proLOX es procesada por ADAMTS (*ADAM Metallopeptidase with Thrombospondin Type 1 Motif*) 2 y 14 entre el Asp²¹⁸ y la Tyr²¹⁹. La parte N-terminal de la isoforma de la LOX generada por BMP-1 contiene varios residuos de tirosina conservados, que no están presentes al ser procesadas por ADAMTS2 y 14. Algunos de estos residuos de tirosina están O-sulfatados y contribuyen a la unión de la LOX al colágeno. De hecho, la isoforma de LOX generada por ADAMTS2 se une al colágeno con menor afinidad que la isoforma de LOX generada por BMP-1 (182).

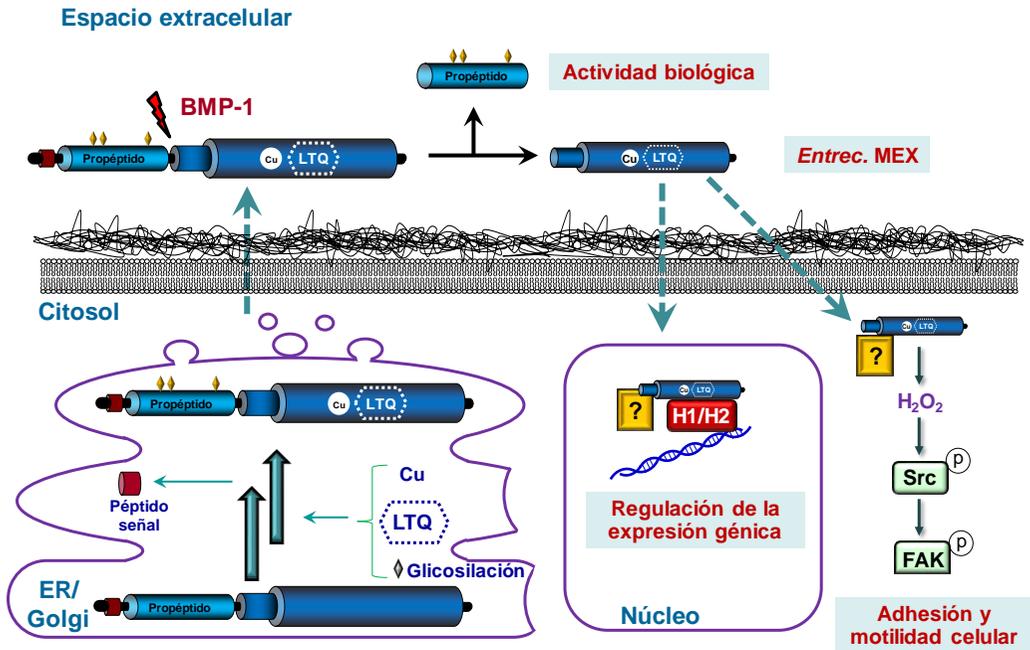


Figura 13. Síntesis y funciones biológicas de la LOX. La LOX es sintetizada como pre-proenzima y sufre modificaciones post-traduccionales en el retículo endoplasmático (ER) y Golgi. Tras la escisión del péptido señal, se produce la incorporación de cobre, la formación LTQ y la glicosilación y, finalmente, la forma pro-LOX es secretada al espacio extracelular. Allí, BMP-1 la proteoliza liberando la forma catalítica madura, implicada en el remodelado de la MEX, y el propéptido, que también tiene actividad biológica independiente de la actividad enzimática LOX. La LOX extracelular puede translocarse a diferentes compartimentos del interior celular mediante mecanismos desconocidos. Allí, la LOX citosólica se ha relacionado con la adhesión y motilidad de las células tumorales. Las formas de LOX nucleares se han vinculado con la regulación de la expresión génica utilizando las histonas H1/H2 como sustratos. Figura adaptada de Martínez-González et al (183).

En este procesamiento también participan componentes de la MEX como la fibronectina, la fibulina 4 y la trombospondina 1. La fibronectina se une a la LOX y al BMP-1 lo que favorece el procesamiento proteolítico de ésta (183). La fibulina 4 también estimula el procesamiento de la proLOX ya que estudios *in vivo* corroboran que la deficiencia de ésta reduce la activación proteolítica de la

proLOX. La trombospondina 1 es capaz de inhibir el procesamiento de la proenzima por parte de BMP-1 mediante su unión al propéptido (182,193).

3.2. Patologías relacionadas con alteraciones en la actividad LOX

Los estudios realizados tanto *in vitro* como en modelos animales sugieren una asociación entre la alteración de la expresión y la actividad LOX con el desarrollo de diferentes patologías.

La fibrosis es una de las enfermedades que más estrechamente se ha relacionado con la familia de enzimas de la LOX ya que se caracteriza por la acumulación aberrante de MEX. Ésta puede afectar a una gran variedad de órganos como el pulmón, el hígado, el riñón o la piel (192). Algunos estudios en modelos animales reflejan que la inhibición de la LOX revierte la respuesta fibrótica del hígado frente a tetracloruro de carbono o a bleomicina (192,194,195). Además, se ha propuesto la LOX como biomarcador de ciertas enfermedades como la esclerosis sistémica y la fibrosis pulmonar idiopática en la que la secreción de LOX aumenta significativamente (192,196,197).

También se ha relacionado la alteración del entrecruzamiento de colágeno mediado por LOX con el desarrollo de enfermedades óseas como la osteogénesis imperfecta o los síndromes Ehlers-Danlos y Bruck o con el desarrollo de la patología ocular del glaucoma ya que la actividad LOX resulta clave en la formación y mantenimiento de las estructuras oculares (192,198–200).

Asimismo, la LOX se ha asociado con el cáncer ya que la maduración de la MEX resulta crítica en el inicio y metástasis de esta enfermedad. De hecho, se ha descrito un papel funcional de la LOX en el cáncer de mama, colorectal, prostático y gástrico, entre otros (191,192,201). Sin embargo, el papel de la LOX en el contexto del cáncer no está muy claro ya que se ha descrito tanto un efecto supresor como potenciador tumoral *in vitro*. Sin embargo, en pacientes oncológicos niveles elevados de LOX y LOXL2 se correlacionan con un incremento de la metástasis y menor supervivencia mientras que el silenciamiento de la LOXL1 y la LOXL4 se correlacionan con un mejor pronóstico (192).

Además, se ha propuesto que la alteración de la actividad de LOX podría estar implicada en el desarrollo de ECVs. En estudios tempranos asociaron el fenotipo cardiovascular de latirismo (caracterizado por la disección o rotura aórtica) con la inhibición de la actividad LOX. El latirismo es una intoxicación crónica producida por el consumo excesivo de semillas de almorta con altos niveles de alcaloides que inhiben la actividad de la enzima LOX (202,203). Entre los alcaloides, destaca el β -aminopropionitrilo (BAPN) que tiene un grupo amino primario que inhibe la LOX de manera irreversible (182,204–206)

Introducción

y como consecuencia, su efecto promueve la formación de fibrillas de colágeno anormales (182). La asociación entre la inhibición de la actividad LOX junto con el desarrollo de complicaciones cardiovasculares permitió poner el foco en la relevancia de la familia LOX en el sistema cardiovascular (185,192).

3.2.1. LOX en el sistema cardiovascular

Las LOX/LOXLs se expresan en la pared vascular y en el corazón y resultan fundamentales para su correcto funcionamiento y desarrollo. Así, los ratones LOX^{-/-} mueren perinatalmente y presentan graves anormalidades en el sistema vascular tales como aneurismas aórticos, tortuosidad aórtica, fragmentación excesiva de láminas elásticas, alteraciones morfológicas y adhesivas de las células endoteliales y discontinuidad de las CMLVs de la capa media de la pared vascular (183,185).

3.2.1.1. La LOX y la disfunción endotelial

En arterias sanas, el endotelio presenta una elevada expresión de LOX y existen múltiples evidencias que asocian la disminución de dicha expresión con la disfunción endotelial (184,185,207). En presencia de estímulos que inducen daño endotelial como el incremento de LDLs, la hiperhomocisteinemia y las citoquinas proinflamatorias, la expresión endotelial de LOX está significativamente disminuida (183,184,208,209). De hecho, la inhibición de LOX tanto por BAPN como por concentraciones aterogénicas de LDLs incrementan la permeabilidad endotelial sugiriendo que la menor expresión de LOX en el endotelio puede alterar la integridad de la barrera endotelial (210).

La hiperhomocisteinemia, factor que induce disfunción endotelial y altera las propiedades elásticas de la pared, también inhibe la actividad LOX y regula negativamente su expresión a nivel transcripcional (211). Esta inhibición depende del grupo tiol de la molécula de homocisteína y del estrés oxidativo que produce (211). Análogamente citoquinas proinflamatorias que también alteran la función endotelial reducen la expresión LOX tanto *in vitro* como *in vivo*. De hecho, se ha descrito que TNF α disminuye el nivel de ARNm y la actividad enzimática LOX a través de la activación del receptor TNFR2 (*Tumor Necrosis Factor Receptor 2*). Cabe destacar que el tratamiento con estatinas, fármaco que disminuye los lípidos y mejora la función endotelial, normaliza la expresión de LOX disminuida por la hipercolesterolemia y el TNF α y atenúa la alteración de la permeabilidad endotelial inducida por ambos (212).

Pese a que estos trabajos sugieren que la inhibición de la LOX es un proceso común a la disfunción endotelial se ha descrito que en células endoteliales humanas, esta enzima se induce por AGEs a través de la vía de señalización RAGE/MAPK, NF κ B y AP-1 (183,213).

3.2.1.2. *La regulación LOX en las CMLVs y remodelado vascular*

Las CMLVs juegan un papel clave en el remodelado vascular, un proceso que engloba la migración y la proliferación celular, así como la producción y la reorganización de la MEX. Diferentes factores de crecimiento y citoquinas activan las CMLVs, aumentan la síntesis de la MEX y la expresión de LOX, entre ellos el TGF β que aumenta la expresión de LOX y de este modo favorece la síntesis de componentes de la MEX (185,214). La LOX también se induce por la estimulación de CMLVs con PDGF, mitógeno que promueve la migración y la proliferación de las CMLVs, promueve la oxidación del receptor PDGFR β que activa vías relacionadas con la respuesta quimiotáctica, angiogénesis y remodelado vascular de las CMLVs (183,215). Además, la LOX participa en el remodelado cardiovascular en ratas alimentadas con una dieta rica en grasa y media los efectos profibróticos de la leptina (216).

En las últimas décadas, se ha asociado la LOX con procesos que van más allá de su papel en la estabilización de la matriz como la respuesta quimiotáctica de las células, la proliferación, la adhesión y la migración celular (217). En efecto, un método computacional identificó a este enzima como el gen responsable del estímulo proliferativo en CMLVs (218). En consonancia con esto, se ha relacionado la inducción de LOX con patologías caracterizadas por una elevada migración y proliferación de CMLVs (218). Así, en modelos experimentales de daño vascular, se produce un incremento de los niveles de ARNm y proteína de la LOX que precede la acumulación de colágeno y el engrosamiento de la neointima (219). La expresión de las isoformas LOX/LOXLs se altera en la hipertensión pulmonar, caracterizada por un incremento en la migración y proliferación de las CMLVs y por una estructura anómala de la MEX (220).

Sin embargo, algunos estudios describen efectos contradictorios acerca de la contribución de LOX a la proliferación de las CMLVs. Se ha descrito una correlación inversa entre la expresión de la LOX y la proliferación de las CMLVs neonatales. Estudios de nuestro grupo realizados en ratones que sobreexpresan LOX en las CMLV (TgLOX^{CMLV}) mostraron una atenuación del engrosamiento de la neointima en respuesta a ligadura de la arteria carótida que se revirtió por el tratamiento con el inhibidor BAPN (221). Este efecto se relacionó con una reducción significativa de la proliferación de las CMLVs, niveles bajos de Myh10 (marcador de cambio fenotípico en las CMLV), PCNA (marcador de proliferación celular) y MCP1 en las CMLVs de los animales transgénicos (221,222).

Por último, hay que destacar la presencia de formas activas de LOX en el núcleo de las CMLVs (223). Aunque la actividad biológica de éstas no está clara, sí que se ha relacionado con la reorganización de cromatina y con la

Introducción

regulación de la expresión génica de componentes de la MEX, como la elastina y el colágeno, y la proliferación de las CMLVs (224,225).

3.2.1.3. El papel de la LOX en la progresión de la aterosclerosis e inestabilidad de placa

El conocimiento del papel de la LOX en el inicio, la progresión y la inestabilidad de la placa aterosclerótica se ha visto obstaculizado por la falta de estudios en muestras humanas. Sin embargo, diferentes aproximaciones en modelos animales indican un papel de la LOX en la aterosclerosis (Figura 14).

Resultados de nuestro grupo mostraron que la hipercolesterolemia disminuye la expresión vascular de LOX en un modelo de aterosclerosis temprana en cerdo (210). Sin embargo, en lesiones ateroscleróticas avanzadas de conejos sometidos a dieta aterogénica (suplementada con 8% aceite de cacahuete y 2% de colesterol) se observó un incremento significativo de su expresión, especialmente en el arco aórtico (226). Análogamente la LOX se induce en las lesiones de ratones ApoE^{-/-}, al igual que genes que codifican para componentes de la MEX, como el colágeno y la fibronectina (227). La administración de BAPN reduce la formación de lesiones ateroscleróticas en respuesta a dieta aterogénica aproximadamente a la mitad y disminuye el contenido de macrófagos en estas lesiones en ratones ApoE^{-/-} (183,227). Sin embargo, cabe señalar que la ApoE *per se* inhibe la expresión de LOX para asegurar la correcta elasticidad vascular y proteger el vaso contra la aterosclerosis lo que descarta al ratón *knockout* para ApoE como modelo adecuado para analizar el papel de LOX en la aterosclerosis (228).

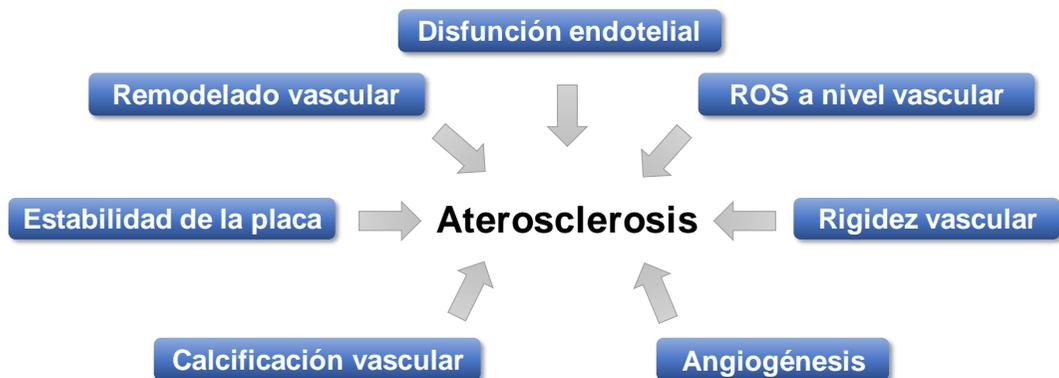


Figura 14. Efectos del desequilibrio de las LOX/LOXLs en el inicio y progresión de la aterosclerosis. Los procesos indicados pueden verse influenciados por la desregulación de las LOX/LOXLs y afectar a la progresión aterosclerótica. Figura adaptada de Martínez-González *et al* (183).

En placas ateroscleróticas avanzadas, la actividad LOX puede impactar sobre la estabilidad de la placa que depende de la integridad de la cubierta fibrosa

que recubre el núcleo lipídico. En este contexto, una baja actividad LOX y el consiguiente defecto en el entrecruzamiento del colágeno, podría debilitar la cubierta fibrosa y favorecer la presencia de formas solubles de colágeno que puedan ser degradadas por las MMPs. Así, se ha sugerido que niveles elevados de LOX aumentarían la estabilidad de la placa aterosclerótica (183,229). Resulta interesante que niveles altos de ARNm de LOX en placas carotídeas humanas se asociarían con una mayor estabilidad de las lesiones y como consecuencia un menor riesgo de infarto de miocardio (230). En consonancia, la contribución del IFN γ a la rotura de las placas ateroscleróticas estaría vinculada con la capacidad de esta citoquina de inhibir la expresión de LOX y la síntesis de colágeno I en CMLVs (231,232). Por el contrario, la presencia de osteoprotegerina (OPG) en regiones susceptibles al desarrollo de placas ateroscleróticas promueve la acumulación de CMLVs, la inducción de LOX, la maduración de fibras de colágeno y la formación de una cubierta fibrosa estable (229). Así, el entrecruzamiento de colágeno dependiente de LOX podría jugar un papel relevante limitando las complicaciones clínicas y estabilizando las lesiones ateroscleróticas previniendo la rotura de la cubierta fibrosa.

3.2.1.4. *El papel de la LOX en la CCV*

En las últimas décadas, se ha propuesto la LOX como elemento fundamental en la mineralización vascular (183). El cultivo de CMLVs humanas y murinas en un medio osteogénico induce la deposición de calcio acompañado por un aumento de LOX. Diferentes aproximaciones tanto de ganancia como pérdida de función de LOX *in vitro* demostraron que la LOX contribuye a la calcificación de las CMLVs inducida por medio rico en fosfato ya que favorece la transdiferenciación de las CMLVs un fenotipo osteoblástico (233). Las CMLVs de ratones TgLOX^{CMLV} mostraron una deposición de calcio exacerbada en comparación con células de ratones salvajes (WT). De manera similar, anillos aórticos de ratones TgLOX^{CMLV} expuestos a medio osteogénico evidenciaban una mayor mineralización de la media respecto a los WT (233). Además, esta mineralización se acompañaba de una mayor deposición de colágeno insoluble, destacando la importancia de la calidad de la MEX en este proceso (233). Asimismo, este trabajo muestra la existencia de una correlación positiva entre la expresión de LOX y la presencia de calcio en lesiones ateroscleróticas humanas (233). De forma similar, se ha evidenciado el incremento de la expresión de la LOX y del entrecruzamiento de colágeno en las válvulas aórticas humanas calcificadas (233,234). Sin embargo, no se ha analizado la contribución de la LOX a la calcificación valvular al tiempo que es fundamental establecer hasta qué punto LOX participa en la calcificación vascular asociada a la aterosclerosis en modelos animales adecuados.

OBJETIVOS

Las ECVs son la principal causa de mortalidad a nivel mundial y la aterosclerosis es el denominador común de las ECVs de componente isquémico (235). Junto a la inflamación, el estrés oxidativo y la apoptosis celular, la CCV es uno de los principales procesos asociados a la aterosclerosis (236,237). En la CCV se produce la mineralización de la MEX a través de mecanismos no bien descritos que conducen a la diferenciación osteoblástica de CMLVs en la que intervienen factores de transcripción y proteínas que modulan las propiedades de la MEX (236). La mineralización de la MEX incrementa la rigidez vascular, afecta a la vulnerabilidad de las placas ateroscleróticas y produce estenosis de la válvula aórtica desencadenando hipertrofia cardíaca que puede llegar a causar insuficiencia cardíaca (28,238). Actualmente no existen tratamientos que prevengan o reduzcan la CCV.

Nuestro grupo describió por primera vez la presencia de NOR-1 en lesiones ateroscleróticas de placas coronarias (91). Su expresión es crítica para procesos clave del remodelado cardiovascular ya que regula la migración, la proliferación y la apoptosis-supervivencia de las CMLVs, la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo y la expresión de componentes de la MEX, mecanismos todos ellos implicados en la fisiopatología de la aterosclerosis y la CCV (81,93,101,152). Por lo tanto, NOR-1 podría regular genes clave en el remodelado y la CCV asociada a la aterosclerosis y la calcificación valvular.

Nuestro grupo también describió la relevancia de la LOX a nivel vascular así como su presencia en lesiones ateroscleróticas calcificadas (233). Además, se ha descrito que esta enzima está modulada por lipoproteínas, citoquinas y condiciones procalcificantes y que regula el remodelado vascular, el estrés oxidativo y la rigidez vascular (183,210–212,222,233). Recientemente, nuestro grupo ha descrito la participación de LOX en la diferenciación osteoblástica y calcificación de las CMLV *in vitro* y *ex vivo*. LOX es inducida por medios osteogénicos ricos en fosfato y su pérdida o ganancia de función afecta de manera sustancial a la mineralización de la MEX (233). Actualmente, se desconoce si la LOX es relevante en la calcificación valvular y la calcificación asociada a la aterosclerosis en modelos animales.

De acuerdo con los antecedentes expuestos, y con nuestros resultados preliminares, nuestra hipótesis de trabajo es que el receptor nuclear NOR-1 y la enzima LOX juegan un papel fundamental en el remodelado cardiovascular asociado a la aterosclerosis y a la CCV y que modelos animales modificados genéticamente para NOR-1 y LOX podrían resultar útiles para el estudio de los mecanismos celulares y moleculares implicados en esta patología. En este contexto se han planteado los siguientes objetivos:

Objetivos

Objetivo 1. Analizar el papel del receptor nuclear NOR-1 en la aterosclerosis y la calcificación cardiovascular.

- 1.1. Caracterizar cómo afecta la calcificación a la expresión de NOR-1 en muestras de válvulas y arterias humanas calcificadas.
- 1.2. Determinar el papel de NOR-1 en la transdiferenciación osteoblástica de VICs y CMLVs y en la deposición de calcio en células en cultivo.
- 1.3. Estudiar el efecto de la sobreexpresión específica de NOR-1 en CMLV sobre la calcificación vascular en modelos *ex vivo* e *in vivo*.

Objetivo 2. Profundizar en el análisis de los mecanismos que vinculan a la LOX con la aterosclerosis y la calcificación cardiovascular.

- 2.1. Caracterizar la expresión de la LOX y otras isoenzimas de esta familia en muestras de válvulas y arterias humanas calcificadas.
- 2.2. Analizar cómo afecta la maduración de la MEX dependiente de la actividad LOX a la calcificación ectópica.
- 2.3. Estudiar el efecto de la transgénesis de LOX dirigida a CMLV en la calcificación asociada a la aterosclerosis.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Modelos de experimentación animal

En este trabajo se utilizaron dos colonias de ratones transgénicos diseñadas para sobreexpresar NOR-1 humano (TgNOR-1^{CMLV}) o LOX humana (TgLOX^{CMLV}) específicamente en CMLVs.

El cuidado y alojamiento de los animales se llevó a cabo en un área libre de patógenos de la Unidad de Experimentación Animal de l'Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (IRHSCSP, Barcelona). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité ético del IRHSCSP (Ley 5/Junio 21, 1995; Generalitat de Cataluña) y durante su desarrollo se cumplió de manera estricta la normativa europea y nacional vigente para la protección animal (Directiva Europea 2010/63/EU y Real Decreto 53/2013).

1.1. Modelo de ratón transgénico que sobreexpresa NOR-1 humano dirigido a CMLVs

Para dirigir la sobreexpresión de NOR-1 a CMLVs se utilizó la construcción pCAGGS – pSM22α-hNOR-1 detallada en la Figura 15. Tras la digestión de esta construcción y la purificación del ADN, éste se insertó en el pronúcleo de un cigoto fertilizado mediante microinyección. Los cigotos viables se transfirieron al oviducto de hembras pseudogestantes y la descendencia que había incorporado el transgén en su genoma se consideró fundador de la colonia (148).

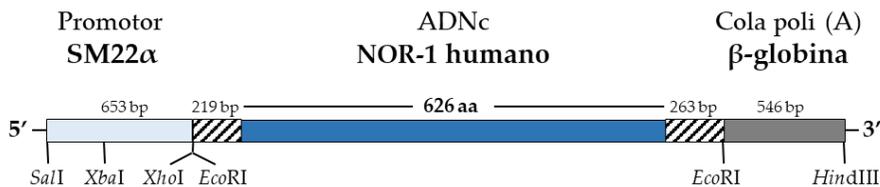


Figura 15. Esquema de la construcción del transgén que dirige la expresión de NOR-1 humano a CMLV. El transgén está formado por el ADNc de NOR-1 humano (Nº Acceso GenBank D78579; posiciones 513-2872) fusionado a la secuencia de Poli (A) de la β-globina de conejo; y dirigido por el promotor SM22α (Nº Acceso GenBank U36589; posiciones 2145-2797).

Los fundadores de la colonia se cruzaron con ratones C57BL6/J (Charles River) durante 10 generaciones para poder establecer la familia y así obtener animales transgénicos con fondo C57BL6/J con una pureza superior al 99,9%. Con una periodicidad de tres o cuatro meses, los ratones transgénicos se cruzaron con ratones salvajes C57BL6/J con la finalidad de generar descendencia transgénica, mantener la colonia y evitar la deriva genética.

Toda la descendencia se genotipó mediante PCR a partir de ADN genómico extraído de la cola obtenido mediante digestión con un tampón

Material y métodos

Tris/KCl (50 mM Tris pH 8, 50 mM KCl, 2,5 mM EDTA, 0,45% NP40) junto con 1 μ L de proteinasa K (600 mAU/mL) incubado a 55 °C durante toda la noche. Este ADN se cuantificó y se utilizó para realizar la PCR en la que se utilizaron los cebadores detallados en la Tabla 3.

Tabla 3. Cebadores usados para el genotipado de los ratones TgNOR-1^{CMLV}

Cebadores para genotipar TgNOR-1 ^{CMLV}		Región reconocida
Directo	5'-GACAGACTGCTCCAACCTGG-3'	Promotor SM22 α
Reverso	5'-GGTTCATGATCTCCGTGGTG-3'	ADNc NOR-1 humano

Para la reacción de PCR se utilizó la enzima *MyTaq* polimerasa (Bioline) y las condiciones indicadas en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de PCR para el genotipado de los ratones TgNOR-1^{CMLV}.

Reacción de PCR:		Ciclos:	
ADN	50 ng	95 °C	1 min
Cebadores	0,4 μ M cada uno	95 °C	15 seg
Tampón 5x <i>MyTaq</i>	2,5 μ l	55 °C	15 seg x 30
<i>Taq</i> Polimerasa	0,125 U/ μ l	72 °C	10 seg
H₂O	Hasta 12,5 μ l	72 °C	10 min

El producto amplificado se visualizó en un gel de agarosa al 1% expuesto a luz UV. En los animales portadores del transgén se amplificaba una banda de 579 pb.

En este estudio, se utilizaron ratones macho de genotipo salvaje (WT, n= 38) y TgNOR-1^{CMLV} (n= 38) de quince semanas de edad.

1.2. Modelo de ratón transgénico que sobreexpresa LOX humana dirigida a CMLVs

Para dirigir la sobreexpresión de LOX a CMLVs se utilizó la construcción pCAGGS – SM22 α -hLOX detallada en la Figura 16. La estrategia para generar los ratones fundadores de esta colonia fue la misma que la descrita en el apartado 1.1. de esta misma sección (222).

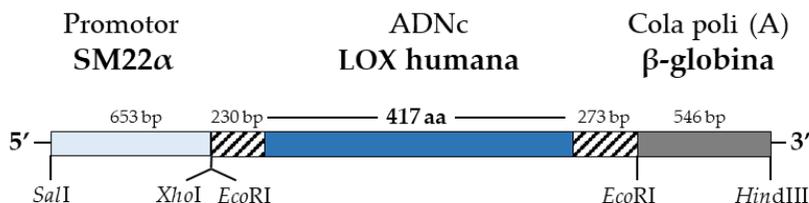


Figura 16. Esquema de la construcción del transgén que dirige la expresión de LOX humana a CMLV. El transgén está formado por ADNc de la LOX humana obtenido partir de la digestión del plásmido pBlueScript-LOX (cedido por el Dr. Mäki, Universidad de Oulu, Finlandia) fusionado a la secuencia de Poli (A) de la β -globina de conejo; y dirigido por el promotor SM22 α (N^o Acceso GenBank U36589; posiciones 2145-2797).

Para mantener la colonia, los ratones transgénicos se cruzaron con ratones salvajes C57BL6/J cada tres o cuatro meses.

Toda la descendencia se genotipó mediante PCR a partir del ADN genómico obtenido como se ha indicado anteriormente (véase apartado 1.1. de esta sección). Este ADN se cuantificó y se amplificó por PCR con el uso de cebadores detallados en la Tabla 5.

Tabla 5. Cebadores usados para el genotipado de los ratones TgLOX^{CMLV}

Cebadores para genotipar TgLOX ^{CMLV}		Región reconocida
Directo	5'-GACAGACTGCTCCAACCTGG -3'	Promotor SM22 α
Reverso	5'-AGCACGGGTATCTCAGTCTCC -3'	ADNc LOX humana

Para la reacción de PCR se utilizó la enzima *MyTaq* polimerasa (Bioline) y las condiciones indicadas en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de PCR para el genotipado de los ratones TgLOX^{CMLV}.

Reacción de PCR:		Ciclos:	
ADN	50 ng	95 °C	3 min
Cebadores	0,4 μ M cada uno	95 °C	1 min
DMSO	3%	56 °C	1 min x 30
Tampón 5x <i>MyTaq</i>	2 μ l	72 °C	50 seg
<i>Taq</i> Polimerasa	0,125 U/ μ l	72 °C	7 min
H₂O	Hasta 10 μ l		

El producto amplificado se visualizó en un gel de agarosa al 1% expuesto a luz UV. En los animales portadores del transgén se amplificaba una banda de 360 pb.

En este estudio, se utilizaron ratones macho de quince semanas de edad de genotipo salvaje (WT, n= 31) y TgLOX^{CMLV} (n= 30).

1.3. Procedimientos de experimentación animal

1.3.1. Inducción de aterosclerosis e hiperlipidemia mediante inyección de AAV-PCSK9^{D374Y} y dieta rica en grasa y colesterol

Se indujo hiperlipidemia, aterosclerosis y calcificación mediante la inyección, a través de la vena de la cola, de vectores virales adenoasociados (AAV) que codifican para una forma mutada de ganancia de función de la proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9^{D374Y}) humana (239). A los grupos control se les administró suero salino. A las 24 horas de la inyección, se inició la administración de una dieta rica en grasa (21%) y colesterol (1,25%) (D12108C, Research Diets).

Material y métodos

Así para cada familia se establecieron 4 grupos experimentales.

- Familia TgNOR-1^{CMLV}:
 - WT hermanos de camada con suero salino y dieta aterogénica
 - WT hermanos de camada con AAV-PCSK9^{D374Y} y dieta aterogénica
 - TgNOR-1^{CMLV} con suero salino y dieta aterogénica
 - TgNOR-1^{CMLV} con AAV-PCSK9^{D374Y} y dieta aterogénica

- Familia TgLOX^{CMLV}:
 - WT hermanos de camada con suero salino y dieta aterogénica
 - WT hermanos de camada con AAV-PCSK9^{D374Y} y dieta aterogénica
 - TgLOX^{CMLV} con suero salino y dieta aterogénica
 - TgLOX^{CMLV} con AAV-PCSK9^{D374Y} y dieta aterogénica

1.3.2. Ultrasonografía de los arcos aórticos

La semana previa al inicio del estudio y trascurridas 20 semanas después de la administración de los virus adenoasociados y la dieta aterogénica, se analizó mediante ultrasonografía la presencia de lesiones ateroscleróticas en el arco aórtico de los ratones y sus tres principales ramificaciones. Para ello, los ratones se anestesiaron con una mezcla de oxígeno e isoflurano al 2%. Se depiló la zona torácica con crema depilatoria y se colocó al animal en posición supina sobre una plataforma atemperada a 37°C para mantener la temperatura corporal. Se aplicó gel de ecografía sobre el tórax y se visualizó el arco aórtico en un único plano mediante el ecógrafo Vevo 2100 con un transductor de 30 MHz (Figura 17) (Visualsonics, Toronto).

Seguidamente, se midió el diámetro de la luz de la arteria braquiocefálica en el punto más próximo al origen de la ramificación y en el eje perpendicular al flujo sanguíneo. Estas medidas se realizaron a partir de imágenes capturadas de vídeos de 100 *frames* utilizando el software del equipo. La reducción del diámetro de la arteria braquiocefálica es indicativa de la presencia de lesiones ateroscleróticas que se visualiza como una región de alta refringencia.

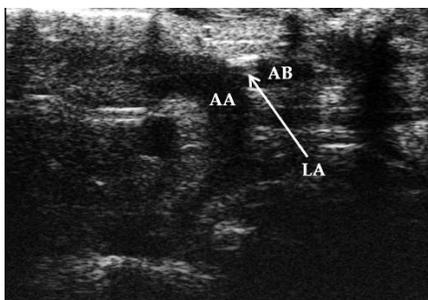


Figura 17. Imagen representativa del arco aórtico con lesión ateroesclerótica de ratón obtenida mediante ultrasonidos. Imagen representativa de un arco aórtico (AA) y la arteria braquiocefálica (AB) con presencia de lesión ateroesclerótica (LA) con mayor refringencia en la imagen.

1.3.3. Extracción sanguínea

Una semana antes del inicio del estudio y 1, 5 y 13 semanas tras la administración de los virus adenoasociados se extrajo sangre de los ratones, por vía submandibular previo ayuno de 4 horas. A tiempo final (20 semanas) se extrajo sangre por punción cardíaca. La sangre heparinizada se centrifugó a $2000 \times g$ durante 5 min y se almacenó el plasma a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ para posteriores análisis.

Los niveles plasmáticos de colesterol total y de triglicéridos se midieron utilizando el kit colorimétrico *Wako Cholesterol E* (Wako Pure Chemicals) y el kit *L-type Trygliceride M* (Wako Pure Chemicals), respectivamente. En ambos casos se siguieron las especificaciones del fabricante.

Además, se determinaron los niveles de calcio en plasma mediante el kit colorimétrico *Quanti chrom Calcium Assay* (Bioassay Systems) y de fosfato mediante el kit *Phosphate Colorimetric Assay Kit* (Biovision), siguiendo en ambos casos las especificaciones del fabricante.

1.3.4. Tratamiento farmacológico de los animales

A las 20 semanas del inicio del experimento, se administró una sobredosis anestésica a los ratones (i.p.; intraperitoneal, medetomidina (1 mg/Kg) y ketamina (75 mg/Kg)). Después de comprobar la pérdida total de reflejos, se extrajo sangre por punción cardíaca. Seguidamente, se perfundió con suero salino a través del ventrículo izquierdo y se extrajeron diferentes órganos que se congelaron rápidamente en N_2 líquido y se almacenaron a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su procesamiento. Aquellos tejidos que iban dirigidos a estudios inmunohistoquímicos se fijaron para ser incluidos posteriormente en parafina o bien se embebieron en OCT y se congelaron.

De cada grupo experimental las muestras vasculares se distribuyeron según se indica a continuación: un grupo de aortas se fijaron para realizar la tinción *Oil Red O* (O.R.O.) *en face* y la arteria braquiocefálica se fijó para posteriormente incluirla en parafina o embeberla en OCT y congelarla; un

Material y métodos

segundo grupo de aortas se recogió para extraer RNA y proteína y el arco aórtico se fijó y congeló en OCT o se incluyó en parafina para posteriores análisis histológicos e inmunohistoquímicos. Para el estudio de la raíz aórtica, se cortó el corazón de manera paralela a la entrada de la aorta al corazón y la parte superior se embebió en OCT y se congeló rápidamente o bien se fijó para incluirla en parafina.

1.3.5. Tinción *Oil Red O* (O.R.O.) en aortas *en face*

Las aortas extraídas y limpias de grasa perivascular se fijaron durante 24 horas en paraformaldehído al 4% y posteriormente se dejaron en PBS al 0,04% de azida sódica hasta su procesamiento. Previamente a la tinción O.R.O., las aortas se incubaron con metanol al 78% (5 min; 2 veces). Seguidamente, se tiñeron con una solución 0,2% p/v de O.R.O. preparada en fresco (0,07 g de O.R.O. en 25 mL de metanol al 100% con 10 mL de NaOH 1 M) durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, las aortas se lavaron con 1 mL de metanol al 78% (5 min; 2 veces) y se transfirieron de nuevo a PBS-Azida sódica 0,04%.

Las aortas teñidas se abrieron longitudinalmente y, con la ayuda de agujas minucias, se montaron sobre una superficie negra exponiendo la cara luminal de la arteria. Finalmente, se captaron imágenes de las aortas utilizando la cámara digital Retiga R3 color acoplada al adaptador Optem Zoom 70XL. El porcentaje de área lesión aterosclerótica respecto el área de toda la aorta se determinó mediante el *software Fiji*.

1.3.6. Análisis de la calcificación microscópica mediante NIRF (*Near-Infrared Fluorescence*)

A los ratones a los que se indujo aterosclerosis y calcificación vascular, se les administró por vía intravenosa 24 horas antes del sacrificio una sonda fluorescente, *Osteosense 680 EX* (Perkin Elmer) (20 mM), que se une con alta afinidad a cristales de hidroxapatita. A las 24 horas, los animales se sacrificaron y se extrajo el conjunto aorta-corazón que una vez eliminada la grasa se fijó durante 24 horas con paraformaldehído al 4%. Seguidamente, la fluorescencia emitida por la aorta se captó utilizando el sistema *IVIS Spectrum In vivo Imaging System* (Perkin Elmer) con una longitud de onda de excitación de 675 nm y una longitud de onda de emisión de 720 nm. La eficiencia total de la radiación emitida por las aortas se cuantificó usando el software del equipo (*Living Image Software 4.3.1.*).

2. Muestras humanas

Se recogieron muestras de válvulas aórticas humanas de pacientes sometidos a reemplazo valvular del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP) gracias a la colaboración con el servicio de cirugía cardíaca. Dependiendo de su grado de calcificación a nivel macroscópico las válvulas fueron clasificadas en dos grupos: aquellas en las que la calcificación ocupaba una superficie igual o inferior al 20% (poco calcificadas; PC) y aquellas en las que la calcificación ocupaba más del 80% de su área (muy calcificadas; MC). Las muestras en fresco se utilizaron para: el aislamiento de células valvulares intersticiales (VICs), se congelaron en N₂ para la posterior extracción de ARN/proteína o bien se fijaron y se procesaron para realizar análisis inmunohistoquímicos. La recogida de muestras fue aprobada por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del HSCSP (Nº 19/267). Además, se utilizaron muestras de válvulas aórticas calcificadas de otra cohorte de pacientes intervenidos para la cirugía de reemplazo valvular en el Hospital Universitario de Navarra (Nº aprobación CEIC 17/2013) gracias a la colaboración de la Dra Natalia López Andrés (Navarrabiomed). En este caso, se usaron muestras de válvulas aórticas sanas obtenidas de autopsias como referencia en los análisis de esta segunda cohorte.

Las muestras de arterias coronarias proceden de pacientes sometidos a trasplante de corazón, realizado en el servicio de Cirugía Cardíaca del HSCSP (Nº de aprobación CEIC 12/267). Finalmente se realizaron estudios en arterias femorales procedentes de pacientes sometidos a cirugía vascular en el Hospital Clínico de la Virgen de la Arrixaca (Nº de aprobación CEIC 02/10).

Todos los estudios con muestras humanas se han realizado de acuerdo con la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 2013, y todos los pacientes o sus representantes legales firmaron un consentimiento informado.

3. Cultivos celulares

En este estudio se utilizaron cultivos celulares de: CMLVs murinas y humanas, VICs y líneas celulares (HeLa, Lenti-X 293T). Todas las células se cultivaron a 37 °C y 95% de humedad, 21% O₂ y 5% CO₂.

3.1. Obtención y mantenimiento de cultivos primarios de CMLVs de aorta y coronarias humana

Las CMLVs humanas usadas en este estudio provienen de aortas y arterias coronarias de pacientes sometidos a trasplante cardíaco en la Unidad de Trasplante cardíaco del servicio de Cirugía Cardíaca del HSCSP. Las células se obtuvieron mediante la técnica descrita anteriormente por nuestro grupo (240).

Material y métodos

En condiciones de esterilidad, se eliminó el tejido conjuntivo y graso adherido a la aorta o coronaria, se abrió longitudinalmente el vaso y se eliminó el endotelio mediante raspado con un bisturí. Con la ayuda de unas pinzas, se eliminó la adventicia y la capa media se fraccionó en pequeños fragmentos (explantes) de aproximadamente 2 mm², que se colocaron en placas de cultivo con medio completo (Tabla 7). El medio se cambió cada 3 días y cuando las células llegaron a la confluencia se tripsinizaron y subcultivaron.

Para la tripsinización, las células se lavaron dos veces con PBS atemperado a 37 °C y a continuación se añadió el volumen mínimo de tripsina-EDTA 0,05% (Gibco BRL) para que toda la superficie quedara cubierta. Al cabo de 2 min, la tripsina se inactivó añadiendo medio completo atemperado (5 veces el volumen de tripsina añadido) y se centrifugó a 290 x g durante 10 min. El sedimento celular obtenido se resuspendió en el volumen adecuado de medio de cultivo. Se contó el número de células, previa tinción con azul de tripano al 0,4% (Trypan Blue, Sigma), utilizando la cámara de Neubauer y las células se sembraron a una densidad de 10.000 células/cm².

3.2. Obtención y cultivo de CMLVs de aorta murina

Análogamente, se obtuvieron CMLVs de aortas de ratones jóvenes (8-10 semanas de edad; cepa C57BL6/J). Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y, con la ayuda de una lupa binocular, se extrajo la aorta que se introdujo en un tubo tipo Falcon con PBS suplementado con 2% de penicilina/estreptomina. Bajo campana de flujo laminar y en condiciones de esterilidad, las aortas se transfirieron a una solución de digestión que contenía colagenasa tipo II (175 U/mL; Worthington) y elastasa (1,25 U/mL) en medio de cultivo DMEM y se incubaron a 37 °C durante 10 min. Bajo lupa se separó la adventicia de la media con la ayuda de unas pinzas curvas. La media se incubó en medio de cultivo completo (Tabla 7) 2 horas a 37 °C al 5% CO₂. Transcurrido este tiempo, la aorta se cortó en anillos de entre 1-2 mm de grosor y de nuevo se dejó en solución de digestión durante 2 horas en agitación suave constante a 37 °C. Seguidamente, se añadieron 5 mL de medio completo y se centrifugó a 200 x g durante 5 min. El sedimento celular se sembró en un frasco de 25 cm² con medio completo. El medio se cambió cada 3 días y cuando las células llegaron a confluencia se tripsinizaron y subcultivaron.

Para la tripsinización se siguió el protocolo descrito en el apartado anterior centrifugando estas células a 200 x g durante 5 min. El sedimento celular obtenido se resuspendió en el volumen adecuado, se realizó el conteo del número de células que se sembraron a una densidad de 10.000 células/cm².

Tabla 7. Medios de cultivo de las CMLV humanas y murinas y VICs humanas.

Componentes:	CMLV humanas	CMLV murinas y líneas celulares	VICs humanas
Medio base	M199 (Gibco)	DMEM (Gibco)	DMEM/F12 (Gibco)
Suero Fetal Bovino (FBS) (Biological Industries)	20%	10%	20%
Suero humano (Banco de Sangre y Tejidos)	2%	-	-
L-Glutamina (Gibco)		2 mM	
Penicilina-Estreptomicina (Gibco)	100 U/mL (penicil.) + 100 µg/mL (estrept.)		
FGF2 (Factor de crecimiento de fibroblastos 2) (Novus Biologicals)	-	-	10 ng/mL
Insulina (Sigma)	-	-	50 ng/mL

3.3. Obtención y cultivo primario de VICs humanas

Las válvulas humanas procedentes de pacientes sometidos a cirugía de reemplazo valvular se lavaron con abundante PBS y se trocearon en pequeños fragmentos de 0,5 cm² en condiciones de esterilidad. Los fragmentos se digirieron con 1 mg/mL de colagenasa tipo II (Worthington) disuelta en PBS durante 1 hora a 37 °C y en agitación constante, como se ha descrito (241). Tras la digestión, el tejido se centrifugó a 500 x g durante 5 min y el sedimento celular se resuspendió en medio completo (Tabla 7). Las células se sembraron en frascos recubiertos con gelatina a los que se cambió el medio cada 2-3 días hasta que las células alcanzaron la confluencia.

Seguidamente las células se tripsinizaron y se subcultivaron. Las células se caracterizaron como VICs mediante inmunohistoquímicas por su marcaje positivo para α -actina de musculo liso (α -SMA) y vimentina (Figura 18).

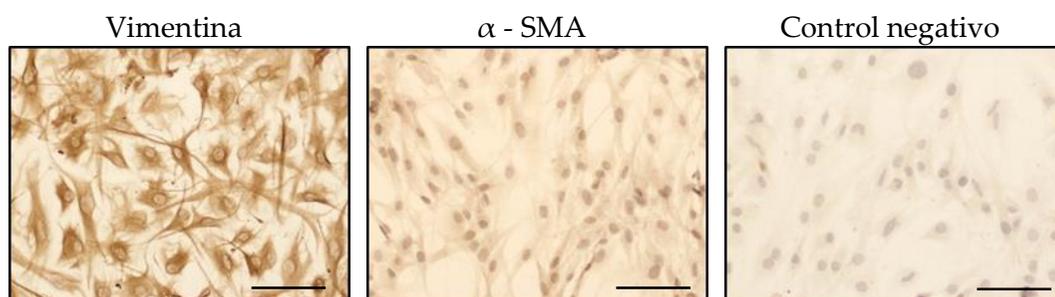


Figura 18. Comprobación de los marcadores típicos de VICs en nuestros cultivos primarios. Fotografías representativas de VICs con marcaje positivo para vimentina y α -SMA (imagen de la izquierda y central). El control negativo corresponde a una preparación que sólo se incubó con anticuerpo secundario anti-IgRatón (imagen de la derecha). Las preparaciones se contratiñeron con hematoxilina. Barra: 100 µm.

3.4. Cultivo de líneas celulares

Para la producción de partículas lentivirales, se usó la línea celular Lenti-X 293T (procedentes de la transformación de la línea celular HEK293 derivada de riñón embrionario humano; ATCC) y HeLa (células epiteliales derivadas de cáncer de cérvix humano; ATCC). Se cultivaron según las especificaciones del ATCC (Tabla 7).

3.5. Inducción de calcificación *in vitro*

Las células VICs humanas se sembraron a razón de 25.000 células/cm² y cuando alcanzaron la confluencia deseada (90-95%) se inició la inducción de la calcificación. Para ello, el medio de cultivo se reemplazó por DMEM con glucosa a 4 g/L y 5% de FBS y las células se expusieron a un medio osteogénico (OM) que contenía 2 mM de NaH₂PO₄ y 50 µg/mL de ácido L-ascórbico. El medio se cambió cada 3 días. En algunos experimentos las células se incubaron con el inhibidor selectivo de la actividad LOX (β -aminopropionitrilo, BAPN, 500 µM) 24 horas antes de la inducción osteogénica que también se repuso con el OM en cada cambio de medio. Además, se llevó a cabo la inducción de calcificación en células que habían sido transducidas lentiviralmente (véase el apartado 5 de esta sección) o en las que se había realizado silenciamiento génico (véase apartado 6 de esta sección).

Otra de las estrategias usadas para inducir calcificación en estas células fue suplementar el medio OM con sobrenadantes condicionados de VICs que habían sido transducidas previamente con pLVX o pLVX/hLOX (Véase apartado 5 de esta sección). Así, las VICs se expusieron a medio OM previamente suplementado con un 33,33% de medio condicionado proveniente de células (25.000 células/cm²; 100 µL/cm²) transducidas con pLVX o pLVX/hLOX.

Las CMLVs humanas de aorta y coronarias y las CMLVs murinas se sembraron a razón de 20.000 células/cm² y cuando alcanzaron la confluencia deseada (90-95%) se inició la inducción de calcificación. Para ello, se reemplazó el medio de las células por medio DMEM con glucosa a 4 g/L y 10% de FBS y expusieron a un medio rico en fosfato (medio osteogénico; OM) que contenía 10 mM de β -glicerofosfato, 50 µg/mL ácido L-ascórbico y 10 nM de dexametasona.

3.6. Análisis de la calcificación de células en cultivo

Para visualizar macroscópicamente la calcificación, las células sembradas en monocapa y expuestas a medio OM (véase apartado 3.5.) se lavaron brevemente con PBS (5 min; 2 veces) y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron con agua destilada y se tiñeron con el colorante rojo de alizarina al 1% durante 5 min. Transcurrido este

tiempo, se lavaron con agua destilada abundante mínimo 4 veces y se visualizó la tinción en el microscopio Zeiss axiovert 200M.

Además, se analizó la actividad fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP) a partir de lisados de estas células utilizando el kit colorimétrico *Alkaline Phosphatase Activity* (K412, Biovision). Para ello las células se lisaron con el tampón de lisis provisto por el kit, se realizó una recta patrón a partir de *p*-nitrofenilfosfato (pNPP) y se leyó el producto de la reacción colorimétrica a la longitud de onda de 405 nm en el espectrofotómetro *Spectra Max 250* (Molecular Devices).

3.7. Descelularización de VICs para generar *scaffolds* de MEX

Para evaluar el papel de la MEX en el inicio y la propagación de la deposición de cristales de hidroxiapatita generamos matrices a partir de células sometidas a diferentes condiciones: VICs transducidas con pLVX/hLOX, tratadas con BAPN o bien suplementadas con medios condicionados de células infectadas con pLVX/hLOX. Estas células se lisaron, la MEX se lavó exhaustivamente y sobre ella se sembraron VICs que se sometieron a OM y evaluamos la calcificación, siguiendo un protocolo adaptado de Franco-Barranza *et al* (242). Brevemente, el protocolo seguido en estos estudios consistió en sembrar las VICs a razón de 25.000 células/cm² en una superficie recubierta de gelatina y se dejaron en cultivo mínimo 5 días en medio completo para que se generase una MEX suficientemente consistente. Las células se lavaron con PBS (2 veces) y se añadió un tampón que lisa las células y preserva la MEX (PBS con 20 mM de NH₄OH y 0,05% de Tritón X-100). Se incubó el tiempo necesario para que en el microscopio se visualizara la lisis de las células. Seguidamente, el tampón de lisis se diluyó con el doble de volumen de PBS y se realizaron 2 lavados de PBS. Finalmente, las placas se dejaron en PBS con 1 mM de MgSO₄ y 1 mM CaCl₂ para preservar la MEX hasta su utilización. Paralelamente, las VICs se tripsinizaron y se sembraron sobre estas matrices y transcurridas 24 horas se indujo calcificación como se ha indicado en el apartado 3.5.

4. Análisis de la calcificación vascular *ex vivo*

Se analizó la calcificación en anillos aórticos de ratones WT y TgNOR-1 en estudios *ex vivo*. Para ello, la aorta limpia de grasa perivascular se seccionó en anillos de 1 mm de grueso. Estos anillos se cultivaron en medio DMEM con 4 g/L de glucosa (Biowest), 1 mM L-glutamina, 15% de FBS y 3 mM de NaH₂PO₄ como se describió previamente (233). Después de 6 días de incubación en medio rico en fosfato, los anillos aórticos se fijaron con paraformaldehído al 4% y se incluyeron en parafina (véase apartado 9). Se realizaron cortes de 5 µm utilizando

un micrótopo (JUNG RM 2005; Leica). Los portaobjetos se rehidrataron y se tiñeron con rojo alizarina al 1% durante 5 min. Seguidamente, se lavó el exceso de colorante con agua destilada, se volvieron a deshidratar y se montaron con DPX (Casa Álvarez). Finalmente, se captaron imágenes en el microscopio Olympus BX 51 y se cuantificó el área teñida con la ayuda del software *Fiji*.

5. Sobreexpresión génica en células en cultivo mediante transducción lentiviral

El proceso por el cual se introduce material genético exógeno en una célula utilizando como vector un virus se conoce como transducción. Los lentivirus se caracterizan por poder transducir células tanto quiescentes como proliferativas, permiten introducir insertos de tamaño medio (aproximadamente 8 Kb) y se integran en el genoma de la célula huésped, desencadenando una expresión estable del transgén. Esta técnica se utilizó para sobreexpresar de forma estable en VICs las formas humanas del receptor nuclear NOR-1 y la enzima LOX.

En primer lugar, se clonó el ADNc humano de NOR-1 y de LOX en el vector de expresión pLVX- puro y se produjeron las partículas virales mediante el sistema *Lenti-X™ Lentiviral Expression System* (Clontech). Como controles, se obtuvieron partículas virales a partir del vector pLVX-puro vacío.

Este sistema de sobreexpresión desarrollado por *Clontech* incluye un vector de expresión pLVX-puro que contiene secuencias LTR (*Long Terminal Repeats*) necesarias para la integración del transgén en el genoma de la célula diana, así como una secuencia de empaquetamiento ψ . Además, presenta un sitio de multiclonación con diferentes dianas de restricción que permiten clonar el gen de interés bajo el control del promotor del citomegalovirus. Finalmente, el plásmido pLVX-puro presenta un gen de resistencia a la puromicina, antibiótico utilizado para la selección de las células infectadas.

5.1. Construcción de los vectores de expresión lentiviral

El plásmido pLVX/hNOR-1 se obtuvo a partir de la clonación en el vector pLVX-puro del ADNc de NOR-1 humano (93,150,152). EL ADNc de NOR-1 fue cedido por el Dr. Naganari Ohkura (Growth Factor Division, National Cancer Center Research Institute, Tokio, Japón) en el plásmido pBluescript SK-. Este vector se digirió con el enzima de restricción EcoRI durante 1 hora a 37 °C. El plásmido pLVX-puro se digirió de igual manera y se desfosforiló. El ADNc de NOR-1 y el plásmido pLVX-puro previamente digeridos se separaron por electroforesis en gel de agarosa, se purificaron por columna de afinidad y se ligaron. La ligación se realizó con la *ADN ligasa T4* (1 U/10 μ L de reacción, Fermentas), la reacción

incluía 50 ng de vector vacío y una cantidad determinada de inserto siguiendo una proporción molar a favor del inserto (inserto: plásmido, 3:1) con la finalidad de favorecer la inserción:

$$ng \text{ inserto} = 3 \times \frac{(ng \text{ plásmido} \cdot kb \text{ inserto})}{kb \text{ vector}}$$

La reacción de ligación se incubó durante 1 hora a 22 °C y seguidamente a 16 °C durante 16 horas. El producto de la ligación se transformó en bacterias competentes mediante choque térmico a 42 °C durante 40 segundos. Seguidamente, se recuperaron en medio SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*) durante 1 hora a 37 °C, se centrifugaron y el sedimento celular se sembró en placas LB-agar con ampicilina (0,1 mg/ mL). Transcurridas 16 horas, se tomó una de las colonias y se inoculó en 3 mL de LB-ampicilina durante toda la noche a 37 °C. A partir de 2 mL de este precultivo se extrajo el ADN plasmídico utilizando las columnas *mi-Plasmid Miniprep kit* (Metabion). Se comprobó si la construcción era correcta mediante digestión con enzimas de restricción y análisis en gel de agarosa. A partir del precultivo de los clones correctos, se inocularon 100 µL en 50 mL de medio LB con ampicilina y se incubó a 37 °C toda la noche. A la mañana siguiente se preparó un glicerolado (20% de glicerol) a partir de 1 mL de cultivo que se guardó a -80 °C. El resto se centrifugó a 4000 x g a 4 °C durante 15 min y el sedimento celular se utilizó para obtener ADN plasmídico libre de endotoxinas mediante el *ZymoPURE™ II Plasmid Midiprep kit* (Zymo).

También se generó el plásmido pLVX/hLOX que se obtuvo a partir de la clonación en el vector pLVX–puro del ADNc de LOX humana (221,233). El ADNc de LOX fue cedido por el Dr. Mäki (Universidad de Oulu, Finlandia) en el plásmido pBluescript-LOX. Se siguió un procedimiento similar al indicado para pLVX/hNOR-1 hasta obtener ADN plasmídico libre de endotoxinas.

5.2. Producción de lentivirus

Las células Lenti-X 293T se utilizaron como células empaquetadoras de partículas víricas para producir virus con capacidad infectiva pero no replicativa, de manera que las células infectadas incorporan el transgén pero no producen virus. Las células se sembraron en placas de 100 mm de diámetro (4·10⁶ células/placa) en medio completo sin antibióticos y con un FBS sin tetraciclina. Al día siguiente, se transfectaron con los plásmidos pLVX correspondientes según las especificaciones del kit *Lenti-X™ Lentiviral Expression system* (Clontech), juntamente con una mezcla de plásmidos que contenía el kit, los cuales codifican para las proteínas víricas necesarias para la producción de virus. Después de 16 horas de incubación, el medio de transfección se substituyó por medio completo,

Material y métodos

sin tetraciclina, y se incubó durante 48 horas, tiempo necesario para la producción y liberación de partículas víricas al medio. Transcurrido este tiempo, el sobrenadante se pasó por filtros de membrana de SFCA (Acetato de celulosa libre de tensioactivos) de 0,45 μm de poro (Corning) y se alicuotó en viales de criopreservación para almacenarlos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

5.3. Determinación de la concentración de puromicina y polibreno

Las células que son infectadas se seleccionan con puromicina ya que el vector aporta un gen de resistencia a este antibiótico. La concentración de puromicina adecuada varía dependiendo del tipo celular y es necesario ajustarla para seleccionar eficientemente las células. Con este objetivo se trataron VICs humanas con diferentes concentraciones de puromicina y se seleccionó, en cada tipo celular, aquella concentración que provocó la muerte celular masiva (70-80%) en las primeras 24-48h y la muerte de todas las células a los 3-4 días. En el caso de las VICs fue de 0,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

También se determinó la concentración óptima de polibreno (bromuro de hexadimetrina), polímero catiónico que neutraliza las cargas que provocan la repulsión entre virus y célula y, por lo tanto, mejora la eficiencia de infección. Se determinó que la concentración de uso para los diferentes tipos celulares era de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

5.4. Determinación del título viral

Una vez producidas y recogidas las partículas virales, se calculó la capacidad infectiva o título viral mediante la infección de células HeLa con un banco de diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) de los sobrenadantes celulares que contenían los virus y posterior selección por puromicina, siguiendo el protocolo de la casa comercial. Brevemente, las células HeLa se infectaron durante 24 horas con medio completo con polibreno (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y las diluciones de los sobrenadantes ricos en partículas virales generados. Transcurrido ese tiempo, se inició la selección con puromicina durante 7-10 días hasta la aparición de clones individuales. De esta manera se obtuvo el valor de cfu (*Colony Forming Units*) para cada producción vírica, el cual se utilizó para calcular el volumen de virus necesario para infectar las células con una MOI (*Multiplicity of Infection*) determinada, siendo la MOI el número de partículas víricas por célula.

5.5. Transducción de VICs

Las VICs se sembraron en placas de diferente tipo (6, 12 o 24 pocillos) a razón de 25.000 células/ cm^2 según se fuesen a usar para la purificación de proteína, ARN o para tinción en la placa, respectivamente. Se infectaron con lentivirus con una

MOI= 15 con 8 µg/mL de polibreno, como indica la casa comercial. A las 24 horas, el medio con virus se substituyó por medio completo y las células se incubaron 24 horas más antes de añadir puromicina (0,6 µg/mL en VICs). La selección de células infectadas se realizó durante una semana.

6. Silenciamiento génico mediante siRNA

El siRNA (ARN de interferencia) es una molécula de ARN de 20 a 25 nucleótidos diseñada para bloquear específicamente ARNm de un gen concreto, interfiriendo así en su expresión. El siRNA se vehiculizó en células VICs mediante lipofección (*DharmaFECT-1™ Transfection Reagent, Horizon*).

La expresión de NOR-1 se inhibió mediante silenciamiento génico usando una combinación de 4 siRNAs *On-Target Plus SmartPool* (Human NR4A3 L-003428-00-0005 20; GE Healthcare Dharmacon). Como control se usó *ON-TARGET plus Non-targeting Control Pool* (D-001810-10-05; GE Healthcare Dharmacon). El siRNA específico se usó a una concentración final de 30 nM. Brevemente, las células se sembraron en medio completo sin antibióticos a razón de 25.000 células/cm² en placas multipocillo durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se cambió el medio de cultivo por la mezcla de transfección que contenía 70% medio fresco, idéntico al de siembra, y el 30% restante estaba formado por la combinación de OptiMEM (Gibco), el siRNA a una concentración final de 30 nM y 4 µL de liposoma por mL de volumen de medio de transfección. Se mezcló suavemente, se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y seguidamente se añadió a las células. Las células se incubaron con esta solución durante 8 horas, si era la primera vez que se silenciaban, o bien 4 horas, si se trataba de resilenciar en el caso que el experimento excediera los 6 días de duración. Pasadas las horas de silenciamiento, se cambió el medio de transfección por medio completo y al día siguiente se cambió por medio osteogénico (véase apartado 3.5. de esta sección). El bloqueo de la expresión génica se comprobó mediante PCR a tiempo real.

7. Análisis de expresión de ARNm

7.1. Extracción de ARN

El ARN se obtuvo mediante dos técnicas diferentes: la extracción basada en solventes orgánicos y el uso de columnas de afinidad.

7.1.1. Extracción de ARN mediante solventes orgánicos

En la mayoría de los casos, el ARN de células y tejidos se extrajo con el reactivo *TRIsure™* (Bioline) siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta técnica se basa

Material y métodos

en el uso de sales de guanidina, urea, fenoles y cloroformo para separar el ARN en medio acuoso, dejando el ADN y las proteínas en fase orgánica.

Las células cultivadas en monocapa se lisaron con *TRIsure*TM (1 mL/10 cm²) y se recogieron con la ayuda de un raspador. Las muestras de tejido se trituraron en N₂ líquido en un mortero de porcelana frío hasta conseguir un polvo fino. Seguidamente, se pesaron en frío entre 20 y 25 mg de polvo de tejido al cual se añadió 1 mL de *TRIsure*TM y se homogeneizó (Kinematica Homogeneizador PolytronTM 2500E). En el caso de aortas de ratón se utilizó el reactivo de *TriPure Isolation Reagent* (Roche), el cual permitió aislar ARN, ADN y proteínas de una misma muestra.

Ambos tipos de lisados se congelaron a -80 °C y se descongelaron para facilitar la lisis. El protocolo continuó según las especificaciones del fabricante.

Finalmente, el ARN obtenido y resuspendido en agua libre de ARNasas se mantuvo en hielo para su uso inmediato o bien se congeló a -80 °C.

7.1.2. Extracción mediante columnas de afinidad

Se usó esta técnica para la extracción de ARN de células sometidas a silenciamiento génico con siRNA ya que permite eliminar moléculas de ARN de pequeño tamaño que podrían interferir en un posterior análisis por PCR a tiempo real. Se realizó la extracción mediante el kit comercial *MicroElute Total RNA kit* (Omega) cuya extracción se basa en la capacidad de adhesión del ARN a una membrana de sílice, en presencia de altas concentraciones de sales y etanol.

Para ello, se preparó el reactivo de lisis RLT (tampón que contiene tiocianato de guanidinio) suplementado con β-mercaptoetanol (10 μL/mL de RLT). El lisado celular se recogió con la ayuda de un raspador y se realizó la extracción según las indicaciones del fabricante.

Finalmente, el ARN eluido en agua libre de ARNasas se mantuvo en hielo para su uso inmediato o bien se congeló a -80 °C.

7.2. Determinación de la calidad y cantidad de ARN

El ARN extraído se cuantificó mediante espectrofotometría (*NanoDrop*, *Thermo Scientific*). La pureza del ARN viene determinada por los cocientes 260/280 y 260/230, que para considerarse óptimos deben tener valores entre 1,8-2,0 y 1,8-2,2, respetivamente.

Con la finalidad de evaluar la integridad del ARN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,2% en tampón MOPS y condiciones desnaturizantes y libres de ARNasas. Las muestras se calentaron a 65 °C durante 10 min en tampón de carga con bromuro de etidio y los geles se

desarrollaron durante 1 hora a 60 V antes de examinarlas en luz UV. El estado de ARN se estimó según la integridad de las bandas correspondientes a los ARN ribosomales 18S y 28S.

7.3. PCR a tiempo real

La cuantificación relativa de los niveles de ARNm de los genes de interés se realizó por PCR a tiempo real. El ARNm se retro-transcribió a ADNc utilizando el *High Capacity cDNA reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems). Este método utiliza secuencias aleatorias como oligonucleótidos cebadores (*random primers*) y la transcriptasa reversa *Multiscribe™*. Las reacciones se realizaron a partir de 500 ng de ARN en un volumen total del 10 µL de reacción, siguiendo las instrucciones de la casa comercial (Tabla 8). El ADNc obtenido se diluyó en agua libre de nucleasas (1/10) y se almacenó a -20 °C hasta su amplificación por PCR a tiempo real que se realizó mediante el equipo de detección ABIPRISM 7900 HT (Applied Biosystems).

Tabla 8. Condiciones de reacción de retro-transcripción.

Componentes:		Ciclos:	
ARN total	0,5 µg	25 °C	10 min
Tampón de reacción 10X	1 X	37 °C	120 min
Hexámeros aleatorios	1 X	85 °C	5 min
Mezcla de dNTPs	4 mM (1 mM cada uno)		
Enzima <i>MultiScribe™</i>	2,5 U		
H ₂ O desionizada libre de nucleasas	Hasta 10 µl		

7.3.1. PCR a tiempo real con sistema TaqMan®

Este método permite determinar en tiempo real la amplificación de productos mediante un sistema de dos oligonucleótidos cebadores y una sonda específica para la secuencia diana. La sonda tiene un fluorocromo en su extremo 3' y una molécula amortiguadora o *quencher* en su extremo 5' que, por proximidad, bloquea la emisión de fluorescencia de la primera. La sonda hibrida en la parte central del amplicón, pero no emite fluorescencia hasta que la polimerasa la hidroliza liberando la molécula *quencher*, la cual deja de realizar su función amortiguadora. De esta manera se detecta la amplificación de un determinado producto con una elevada especificidad. En el Apéndice se incluye un listado de sondas TaqMan utilizadas. Las condiciones de PCR fueron las siguientes (Tabla 9):

Tabla 9. Condiciones de reacción de PCR a tiempo real (Taqman®)

Componentes:		Ciclos:	
ADNc (reacción de retro-transcripción; 1/10)	4,0 µL	95 °C	2 min
<i>SensiFAST Probe Hi-ROX Mix, 2x</i>	1 X	95 °C	10 s
Sonda específica	1 X	60 °C	40 s
H ₂ O desionizada libre de nucleasas	Hasta 20 µl		x 40

Para cada 20 µL de reacción se realizaron dos réplicas de lectura de 9 µL cada una, que se amplificaron en placas de 384 pocillos. Los niveles de ARNm se determinaron a partir de los valores Ct (*Cycle threshold*) obtenidos en la reacción de PCR a tiempo real mediante la interpolación con una recta patrón preparada con diluciones seriadas de ADNc o por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, y se normalizaron por la expresión de un gen de referencia como la proteína de unión a TATA (TBP) o la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

7.3.2. PCR a tiempo real con el sistema SYBR-Green

El *SYBR-Green* es una molécula orgánica que se intercala en la doble hélice de ADN y se acopla energéticamente a los ácidos nucleicos que lo forman de manera que se incrementa notablemente la tasa de emisión de fluorescencia. El complejo resultante presenta un pico de absorción a 498 nm y un pico de emisión a 522 nm. En este método, la reacción de amplificación incorpora *SYBR® Green* además de los oligonucleótidos específicos diseñados mediante la herramienta *NCBI/Primer-BLAST*. Se utilizó como mezcla de reacción el *SYBR® Premix Ex Taq II* (Takara) y los oligonucleótidos específicos (descritos en el apéndice) según se indica (Tabla 10).

Tabla 10. Condiciones de reacción de PCR a tiempo real (SYBR-Green):

Componentes:		Ciclos:	
ADNc(reacción de retro-transcripción; 1/10)	4,0 µL	95 °C	30 seg
<i>SYBR® Premix Ex Taq II</i>	1 X	95 °C	5 s
Oligonucleótido <i>Sentido</i>	300 nM	60 °C	30 s
Oligonucleótido <i>Antisentido</i>	300 nM	95 °C	15 s
H ₂ O desionizada libre de nucleasas	Hasta 20 µl	60 °C	1 min
		95 °C	15 s

x 40

Curva de disociación

8. Análisis de los niveles de proteína

8.1. Obtención de extractos proteicos

8.1.1. Extractos celulares totales

Las células cultivadas en monocapa se lavaron dos veces con PBS y se lisaron con el tampón de lisis (véase apéndice) en ebullición (8-10 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$) con la ayuda de un raspador. El lisado se congeló a $-80\text{ }^\circ\text{C}$, se descongeló para optimizar la lisis y se disgregó mecánicamente con la ayuda de una jeringa con aguja de 29G. Seguidamente se centrifugó a $16.000 \times g$ durante 5 min para eliminar el material no disgregado y se recogió el sobrenadante. La concentración de proteína se evaluó siguiendo el método del ácido bicinconínico (BCA) (véase apartado 8.2. de esta sección). Los extractos proteicos se almacenaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su posterior utilización.

8.1.2. Extractos proteicos de sobrenadante

Las células se cultivaron en medio libre de FBS y transcurridas 48 horas se recogió el sobrenadante (3-5 mL) y se concentró y dializó con PBS mediante las columnas de exclusión (*Amicon Ultra 10.000 MWCO, Millipore*), las cuales descartan las proteínas con un peso molecular inferior a 10 kDa. Los sobrenadantes (4 mL) se concentraron hasta un volumen de 150 μL mediante centrifugaciones sucesivas ($240 \times g$; 15 min; $4\text{ }^\circ\text{C}$). La cuantificación proteica se realizó siguiendo el método de BCA (véase apartado 8.2. de esta sección).

8.1.3. Extractos proteicos de tejido

Los tejidos congelados se trituraron en N_2 líquido con un mortero de porcelana hasta conseguir polvo fino. Seguidamente, se pesaron entre 20-25 mg de polvo de tejido al cual se añadió un tampón de lisis con inhibidores de proteasas (véase apéndice). La mezcla se homogeneizó (Kinematica Homogeneizador Polytron™ 2500E) en frío y se congeló a $-80\text{ }^\circ\text{C}$, se descongeló y se centrifugó a máxima potencia durante 10 min a $4\text{ }^\circ\text{C}$ con la finalidad de descartar el tejido no disgregado. Este último paso se repitió sucesivamente hasta no observar precipitado de tejido no disgregado. El sobrenadante se recuperó y la concentración de proteínas solubles se cuantificó por el método BCA (véase apartado 8.2. de esta sección).

En el caso de aortas de ratón se utilizó el reactivo *TriPure Isolation Reagent* (Roche), el cual permite aislar el ARN, ADN y proteínas de una misma muestra. A la muestra triturada se añadió 1 mL de tejido, se homogeneizó en frío y se congeló a $-80\text{ }^\circ\text{C}$. La extracción de proteínas se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante.

Material y métodos

8.1.4. Extractos nucleares de células en cultivo

Los extractos de proteínas nucleares y citosólicas se obtuvieron mediante incubaciones sucesivas en tampones hipotónicos e hipertónicos. Se partió de CMLVs murinas sembradas en placas de 100 mm. Todo el proceso se realizó a 4 °C. Cada placa se lavó con PBS frío (2 veces) y la monocapa celular se recogió con la ayuda de un raspador en PBS frío suplementado con un cóctel inhibidor de proteasas. La suspensión celular se centrifugó a 1800 x g durante 7 min, el precipitado celular se resuspendió en 300 µL de tampón hipotónico (Tabla 11) y se incubó durante 15 min en hielo, agitándolo periódicamente. A continuación, se añadió *Nonidet P40* hasta una concentración de 0,6% y se agitó con vórtex durante 10 segundos para facilitar la lisis celular. El lisado se centrifugó a 16.000 x g a 4 °C durante 30 segundos, y el sobrenadante resultante, correspondiente a las proteínas citoplasmáticas, se guardó a -80 °C. El precipitado de núcleos resultante de la centrifugación anterior se resuspendió con 500 µL de tampón A para eliminar el detergente. En este punto del protocolo y a partir de una alícuota de 20 µL se comprobó la integridad de los núcleos en el microscopio. Seguidamente, se centrifugó nuevamente a 16.000 x g a 4 °C durante 30 segundos y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 50 µL de tampón hipertónico frío (Tabla 11) y se incubó durante 30 min a 4 °C en rotación orbital. Finalmente, se centrifugó a 16.000 x g a 4 °C durante 5 min y el sobrenadante obtenido se guardó a -80 °C, siendo la fracción de proteínas nucleares. La cuantificación proteica se realizó siguiendo el método de BCA (véase apartado 8.2. de esta sección).

Tabla 11. Composición de los tampones para los extractos de proteínas nucleares en cultivo

Componentes:	Tampón hipotónico	Tampón hipertónico
HEPES	10 mM	25 mM
KCl	10 mM	50 mM
MgCl ₂	1,5 mM	1,5 mM
DTT	1 mM	1 mM
Cóctel inhibidor de proteasas	1X	1X
NaCl	-	400 mM
Glicerol	-	10%

8.2. Determinación de la concentración de proteína por BCA

La concentración de proteína se determinó mediante el método del ácido bicinonínico (*BCATM protein assay reagent, Pierce*). En este método, la concentración de proteínas de cada muestra se calculó interpolando los valores de absorbancia obtenidos en una recta patrón a partir de proteína de albúmina

de suero bovino (BSA). La absorbancia de la reacción colorimétrica que se generó se determinó mediante el espectrofotómetro *Spectra Max 250* (Molecular Devices) a una longitud de onda de 562 nm.

8.3. Western Blot

Se realizó la electroforesis de los extractos proteicos en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) (geles entre 7,5-15% de acrilamida:bisacrilamida 37,5:1) en condiciones desnaturizantes.

Las muestras se llevaron a la ebullición durante 10 min en tampón Laemmli en condiciones reductoras y desnaturizantes, cuyos componentes se muestran en el apéndice.

La electroforesis se realizó a 100 V en tampón de recorrido (3g/L de Tris-base; 14,5 g/L de glicina; 0,1% de SDS). En un carril de la electroforesis se incluyó un marcador de peso molecular *HyperPAGE Prestained Protein Marker* (BIO-33066, Biorad). Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilo (*Immobilon®-P Transfer Membrane, Pore size: 0,45 μM; Millipore*) en tampón de transferencia (25 mM de Tris-HCl; 192 mM de glicina; 20% de metanol), a 200 mA constantes durante 90 min a 4 °C. A continuación, las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación suave con una solución que contenía un 5% de leche desnatada en polvo en TBS-Tween 0,05%. Seguidamente, se incubaron con los anticuerpos primarios pertinentes durante 16 horas a 4 °C en agitación suave. Después de la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron con TBS-Tween 0,05% (2 veces; 5 min), seguido de 2 lavados con TBS (5 min) a temperatura ambiente y agitación constante. La unión del anticuerpo primario a la proteína de interés se detectó mediante la adición de un anticuerpo secundario que reconoce las IgG de la especie animal donde se generó el anticuerpo primario (la lista de anticuerpos usados está detallada en el apéndice). Este anticuerpo secundario está unido a peroxidasa de rábano (*HRP, horseradish peroxidase*), de manera que al añadir el sustrato adecuado (*Immobilon® Forte Western HRP Substrate, Millipore*) emite quimioluminiscencia, la cual se detectó mediante películas autoradiográficas *Curix rp2 plus* (Agfa) reveladas mediante procedimientos fotográficos estándar. Se verificó que la carga de proteína fuera homogénea mediante la determinación de los niveles de β-actina o nucleolina en el caso de extractos nucleares. Las películas se escanearon en el densitómetro *GS-800* (BIO-RAD) y la cuantificación relativa de las bandas se realizó mediante el programa *Quantity One* (BIO-RAD).

8.4. Inmunocitoquímica

Se realizaron tanto inmunocitoquímicas por detección fluorescente como por detección con diaminobenzidina (DAB).

Material y métodos

8.4.1. Detección fluorescente

Las VICs se sembraron a una densidad de 25.000 células/cm² en cámaras *Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slides* (Lab-Tek®) previamente recubiertas de gelatina. A continuación, se indujo calcificación con medio OM y al cabo de los días se realizó la inmunotinción para colágeno I. Las células se lavaron rápidamente con PBS (2 veces; 5 min) y se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 15 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se lavaron con PBS (2 veces; 5 min) y se permeabilizaron con PBS-Tween al 0,5%. Las preparaciones se incubaron con una solución de bloqueo que contenía PBS-Tween 0,1%-BSA 2% (2 veces; 30 min). Seguidamente, se incubaron con *Image-IT™ FX Signal Enhancer* (Invitrogen) durante 30 min. Después de dos lavados con PBS, se añadieron los anticuerpos primarios pertinentes (Tabla 12) en solución de PBS-Tween 0,1%-BSA 1% durante 16 horas a 4 °C en agitación constante. Transcurrido este tiempo, las preparaciones se lavaron con PBS (2 veces; 5 min) y se añadió una mezcla de anticuerpo secundario (Tabla 12), tinción de núcleos *Hoescht* (1:1000, 33342, Molecular Probes) protegido de la luz durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de esta incubación, las placas se lavaron con PBS (2 veces; 5 min) y se montaron con el medio *ProLong® gold antifade reagent* (Molecular Probes). Las preparaciones se visualizaron en el microscopio de fluorescencia Olympus BX51.

8.4.2. Detección con diaminobenzidina (DAB)

Las VICs se sembraron a una densidad de 25.000 células/cm² en cámaras *Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slides* (Lab-Tek®) previamente recubiertas con gelatina. A continuación, se dejaron crecer hasta alcanzar la confluencia deseada y realizar la inmunotinción. Las células se lavaron rápidamente con PBS (2 veces; 5 min) y se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 15 min a temperatura ambiente. Seguidamente, las preparaciones se permeabilizaron con PBS-Tritón X-100 al 0,4% y se bloquearon e incubaron con el correspondiente anticuerpo primario y después el secundario, siguiendo las indicaciones descritas en el apartado 8.4.1. Tras una hora de incubación con el anticuerpo secundario, las placas se lavaron con PBS (2 veces; 5 min) y se incubaron con una solución de bloqueo de peroxidasa (H₂O₂ al 3% de PBS) durante 30 min. Posteriormente, se lavaron las preparaciones con PBS (3 veces; 5 min) y se incubaron con el reactivo *ABC del VESTACTIN Elite ABC kit (PK-6100, Vector Laboratories, INC.)* durante 30 min. Finalmente, se lavaron las preparaciones con PBS (3 veces; 5 min). Seguidamente, las preparaciones se revelaron utilizando diaminobenzidina como sustrato de la peroxidasa (*DAB Substrate*, Roche). La reacción se paró con agua del grifo, seguido de un lavado con agua destilada y finalmente las muestras se montaron en *Glicergel*. Las preparaciones se visualizaron en el microscopio Olympus BX51.

Tabla 12. Anticuerpos utilizados en inmunocitoquímica de fluorescencia y DAB.

Antígeno	Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución	Detección
Colágeno IaI	NB600-408 (Novus Biologicals)	1:150	Anti-IgG de conejo generado en cabra Alexa Fluor 488	1:200	Fluorescencia
NOR-1 humano	H00008013-M06 (Abnova)	1:50	Anti-IgG de ratón generado en caballo (Dako)	1:200	DAB
Vimentina	M7020 (Dako)	1:500	Anti-IgG de ratón generado en caballo (Dako)	1:200	DAB
α-SMA	Ab5694 (Abcam)	1:500	Anti-IgG de conejo generado en cabra (Dako)	1:200	DAB

8.5. ELISA

Los niveles plasmáticos de la proteína PCSK9 humana, la OPG murina y la proteína Dickkopf-verwandtes-1 (DKK-1) murina se determinaron mediante los ELISAs *Human PCSK9 Quantikine ELISA kit*, *Mouse Osteoprotegerin Quantikine ELISA kit*, *Mouse Dkk-1 Quantikine ELISA kit*, (R&D Systems, USA), respectivamente. En todos los casos se siguieron las instrucciones del fabricante y absorbancia del producto de la reacción colorimétrica se determinó en el espectrofotómetro *Spectra Max 250* (Molecular Devices).

9. Histología

9.1. Procesado de las muestras

Las muestras de tejidos recogidas en el sacrificio se fijaron en paraformaldehído al 4% justo después de su extracción y se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente. Los arcos aórticos longitudinales y un grupo de braquiocefálicas se embebieron en OCT tras la fijación y se congelaron a -80 °C hasta su utilización. Estas muestras congeladas se microseccionaron utilizando el criostato CM3050 S (Leica) para preparar cortes de 5 μ m que se almacenaron a -80 °C hasta su posterior tinción.

El grupo restante de arterias braquiocefálicas, un grupo de raíces aórticas así como el resto de tejidos recogidos completaron su fijación hasta llegar a la inclusión en parafina. Para ello, se realizó una deshidratación progresiva en 2 baños sucesivos de Gliofix (30 min), 4 baños de etanol absoluto (30 min), seguido de 3 baños en xileno (45 min) y finalmente 2 baños en parafina líquida (1 hora/ 60 °C). A continuación, las muestras se incluyeron en bloques de parafina utilizando el dispensador EG1150H (Leica). De estos bloques se hicieron secciones de 5 μ m de grueso con el micrótopo JUNG RM 2005 (Leica) y se acomodaron en portaobjetos tratados comercialmente para optimizar la adhesión del tejido (*Flex IHC Microscope Slides*, Dako).

9.2. Tinciones e inmunohistoquímicas

Las secciones de tejido parafinado se estufaron a 60 °C durante 10 min, seguidamente se desparafinaron con 2 baños sucesivos de xileno (7 min) y, a continuación, se rehidrataron mediante pases sucesivos por etanol 100%, etanol 95%, etanol 70% y agua destilada (2 veces; 3 min, respectivamente).

Las secciones de tejido preservado en OCT se estufaron a 40 °C durante 40 min, se fijaron en acetona fría durante 10 min y finalmente se hidrataron en agua destilada (2 veces; 5 min).

Una vez terminada la tinción o inmunohistoquímica correspondiente se realizó la deshidratación de todas las preparaciones mediante 3 baños de etanol 95%, 2 de etanol 100% y finalmente 2 más de xileno (3 min/baño). Las preparaciones se montaron utilizando el medio de montaje DPX (Casa Álvarez).

9.2.1. Tinción de hematoxilina-eosina

Esta tinción tiñe los núcleos en color azul y el citoplasma celular de color rosa. Las muestras se incubaron con hematoxilina de Mayer durante 5 min y se lavaron con agua del grifo 5 min más. A continuación, se tiñeron con eosina durante 30 segundos y se lavaron con agua del grifo 5 min más. Finalmente se procedió a la deshidratación y montaje de los portaobjetos.

9.2.2. Tinción de rojo sirio

La tinción de rojo sirio es selectiva para el colágeno y al ser observada con luz polarizada permite diferenciar el grado de entrecruzamiento de las fibras, para inferir su grado de madurez. Cuando se observan las preparaciones bajo luz polarizada aparece un gradiente de color que depende del grueso de la fibra; a medida que aumenta el entrecruzamiento de colágeno el color cambia de verde/amarillo (fibras poco entrecruzadas) hasta naranja rojo (fibras muy entrecruzadas).

Las preparaciones se tiñeron con una solución de rojo sirio durante 1 hora. Pasado este tiempo, se lavaron dos veces durante 3 min con agua acética y se deshidrataron y montaron.

9.2.3. Tinción de von Kossa

Esta tinción se utiliza para detectar la presencia de depósitos y sales de calcio. El principio de esta tinción se basa en la sustitución de los iones de calcio (presentes en la calcificación) por iones de plata de una solución de nitrato de plata que bajo la exposición a una fuente de luz conduce a la observación de depósitos de calcio en color negro. Como contratinción y para observar los núcleos se usa el *Nuclear Fast Red* que los tiñe de color rosa.

Se siguieron las instrucciones especificadas en el kit (*Silver plating kit acc. to Von Kossa, Merck*): Las preparaciones se tiñeron con una solución de nitrato de plata con exposición a la luz de una bombilla de 20 V durante 30 min. Transcurrido este tiempo las preparaciones se lavaron con agua del grifo y se incubaron 5 min con la solución de tiosulfato sódico para evitar falsos positivos. Seguidamente, se lavaron con agua del grifo y se tiñeron 5 min con el reactivo rojo nuclear en solución de aluminio sulfato al 0,1% (*Nuclear Fast Red, Sigma*). Finalmente, las muestras se deshidrataron y se montaron.

9.2.4. Tinción fluorescente OsteoSense™ 680 EX

El OsteoSense™ es una sonda fluorescente que tiene la capacidad de unirse de manera específica a cristales de fosfato cálcico en fase sólida, preferentemente, en su forma cristalina como la hidroxiapatita. Esta sonda nos permite detectar la presencia de calcificación en las muestras que al excitar a 675 nm emiten fluorescencia a 720 nm.

Para esta tinción se partió de secciones de tejido preservado en OCT previa fijación y se hizo una adaptación de las instrucciones de fabricante para aplicarlo a secciones en portaobjetos. Se hicieron lavados con PBS (2 veces; 5 min) y se incubaron con 200 nM de la sonda OsteoSense™ 680 EX a 4 °C durante 16 horas en agitación suave. Transcurrido este tiempo, las preparaciones se lavaron con PBS (3 veces; 5 min) y se tiñeron con *Hoescht* diluido en PBS durante 3 min. Finalmente se volvieron a lavar con PBS (3 veces; 5 min) y se montaron con *ProLong® gold antifade reagent* (Molecular Probes).

9.2.5. Tinción de lípidos con Oil Red O (O.R.O.)

El *Oil Red O* (O.R.O.) es un colorante lipofílico que debido a su solubilidad difunde hacia la grasa del tejido lo que permite detectar el contenido lipídico de las muestras y, en este estudio, el contenido lipídico de las placas de ateroma.

Para esta tinción se partió de secciones de tejido preservado en OCT previa fijación que se estufaron y se volvieron a fijar durante 1 hora con la solución formaldehído cálcico (40% paraformaldehído con 10% CaCl₂ en H₂O). Las preparaciones se dejaron secar y se lavaron con isopropanol al 60%. Seguidamente, las secciones se tiñeron durante 15 minutos con una solución O.R.O. preparada en fresco (solución saturada de O.R.O. en isopropanol 100% [2 g de colorante en 200 mL de isopropanol] con 1% de dextrina). Las secciones se pasaron por dos baños de isopropanol 60% (1 min/ baño) para después lavarlas con agua destilada (5 min). Finalmente, se realizó la contratinción con hematoxilina de Mayer durante 3 min, se eliminó el exceso de colorante con un lavado de agua del grifo (5 min) y un lavado de agua destilada (5 min). Por último, se montaron con el medio de montaje *Glicergel*.

Material y métodos

9.2.6. Tinción de pentacrómico de Movat

La tinción de pentacrómico de Movat se utiliza para destacar los componentes de tejido conectivo (colágeno, elastina, músculo, fibrina y mucina) para lo que se usan 5 colorantes (azul alcían, hematoxilina Verhoeff, escarlata de Biebrich, fucsina ácida y azafrán).

Se siguió el protocolo descrito en el kit (*Electron Microscopy Science*): las preparaciones se incubaron a 50 °C durante 10 min en Solución de Bouin, seguidamente se incubaron 25 min en tinción azul alcían (tinción azul de tejido cartilaginoso). Transcurrido este tiempo, se sumergieron sucesivamente a alcohol alcalino durante 10 min a 56 °C, solución de orceína-verhoeff (4 min) y en escarlata de Biebrich combinada con fucsina ácida durante 2 min (tinción roja de músculo y fibra). Se pasaron por un baño de ácido acético 0,5% durante 30 segundos, en un baño de ácido fosfotúngstico al 5% durante 10 min y se realizaron tres lavados con etanol 100%, para, finalmente, incubarlas con una solución alcohólica de azafrán durante 8 min (tinción amarilla de fibras de colágeno y reticulares). Finalmente, las muestras se deshidrataron y se montaron.

9.2.7. Inmunohistoquímica

Las muestras se sometieron al proceso de desenmascaramiento de antígeno en un vaso *Coplin* con tampón citrato (pH 6) o bien Tris-EDTA (pH 9) en un baño de vapor a 95-99 °C durante 20 min. A continuación, el vaso se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 30 min. Las muestras se lavaron con PBS (3 veces; 5 min) y se incubaron con una solución de bloqueo de la peroxidasa endógena al 3% durante 30 min. Las muestras se colocaron en una cámara húmeda, se lavaron con PBS (3 veces; 5 min) y se permeabilizaron con PBS-Tween al 1% durante 5 min. Con la finalidad de evitar uniones inespecíficas, las preparaciones se bloquearon con una solución de PBS-Tween 0,1% con un 10% de suero de la especie animal en la cual se había generado el anticuerpo secundario (30 min) y, a continuación, se bloqueó la unión para la avidina y la biotina con el *Avidin/Biotin Blocking Kit* (Vector Laboratories). Para llevar a cabo este bloqueo, primero se incubó con una solución de avidina durante 15 min, se hicieron lavados PBS-Tween al 0,1%-suero al 1% (3 veces; 5 min), se incubaron con la solución de biotina durante 15 min y se lavaron de la misma manera. A continuación, las muestras se incubaron con un anticuerpo primario específico (Tabla 13) durante toda la noche en agitación suave a 4 °C. Al día siguiente, las preparaciones se lavaron con PBS-Tween al 0,1% (5 min; 3 veces) y se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado dirigido contra las IgG específicas de la especie donde se ha generado el anticuerpo primario (dilución 1:200 en PBS-Tween al 0,1% con 1% de suero durante 1 hora en agitación suave). Después de 3 lavados con PBS (5 min), las muestras se incubaron con el reactivo ABC (Vector

Laboratories), se lavaron con PBS (3 veces; 5 min) y se revelaron utilizando DAB como sustrato de la peroxidasa (*DAB substrate*, Roche). La reacción se paró con agua del grifo, se lavó con agua destilada y finalmente las muestras se deshidrataron y montaron como se indicó anteriormente.

Las imágenes de los cortes histológicos se captaron por microscopia óptica mediante el microscopio Olympus BX51.

Tabla 13. Anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica.

Antígeno	Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
α -SMA	ab5694 (Abcam)	1:500	Anti-IgG de conejo hecho en cabra (Dako)	1:200
RUNX2	Ab23981 (Abcam)	1:100	Anti-IgG de conejo hecho en cabra (Dako)	1:200
OPN	NB-600-1043 (Novus Biologicals)	1:500	Anti-IgG de conejo hecho en cabra (Dako)	1:200
CD68	Ab125212 (Abcam)	1:100	Anti-IgG de conejo hecho en cabra (Dako)	1:200
IL-6	GTX110527 (GeneTex)	1:50	Anti-IgG de conejo hecho en cabra (Dako)	1:200
MMP2	Ab86607 (Abcam)	1:100	Anti-IgG de ratón hecho en caballo (Dako)	1:200
NOR-1	H00008013-M06 (Abnova)	1:100	Anti-IgG de ratón hecho en caballo (Dako)	1:200
LOX	Ab31238 (Abcam)	1:100	Anti-IgG de conejo hecho en cabra (Dako)	1:200
Vimentina	Ab8979 (Abcam)	1:200	Anti-IgG de conejo hecho en cabra (Dako)	1:200
OPG	NB100-56505 (Novus Biologicals)	1:500	Anti-IgG de ratón hecho en caballo (Dako)	1:200
Ki67	Ab15580 (Abcam)	1:50	Anti-IgG de conejo hecho en cabra (Dako)	1:200
MCP1	Sc-1785 (Santa Cruz)	1:50	Anti-IgG de cabra hecho en conejo (Dako)	1:200
8-oxo-dG	Ab48508 (Abcam)	1:500	Anti-IgG de ratón hecho en caballo (Dako)	1:200

10. Análisis del estrés oxidativo

10.1. Tinción histológica con DHE

La tinción con dihidroetidio (DHE) permite analizar el nivel aniones superóxido (O_2^-) de la muestra. El DHE reacciona con este radical generando etidio a nivel intracelular que se intercala con el ADN.

Para la realización de esta técnica es muy importante que el tejido no esté fijado, sino embebido en OCT y congelado rápidamente tras su extracción. En este caso, realizamos la tinción en muestras de válvulas aórticas humanas y raíces aórticas de ratones que se embebieron en OCT y a partir de las cuales se prepararon cortes de 5 μm mediante un criotomo. Inicialmente, se dejaron secar a 37 °C durante 1 hora para conseguir una buena adhesión de la muestra. Pasado este tiempo, se realizó el lavado de las preparaciones con KHB-Hepes (130 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 0,24 mM MgCl₂, 8,3 mM HEPES, 11 mM glucosa a un pH de 7,4) se colocaron en una cámara húmeda y se incubaron con tampón KHB-Hepes a 37 °C durante 30 min. Se eliminó el exceso de tampón KHB-Hepes y se incubó con DHE (2 μM) a 37 °C durante 30 min. A continuación, se eliminó el exceso de DHE y se realizó el montaje de los portaobjetos con glicerol al 100%. Las preparaciones se mantuvieron a 4 °C hasta su visualización en el microscopio. La captación de las imágenes se realizó en el microscopio confocal TCS SP5 a una longitud de onda de excitación de 563 nm.

11. Análisis morfométricos de las tinciones, inmunohistoquímicas e inmunocitoquímicas

Los análisis morfométricos se realizaron con el *software Fiji* (versión 2.9.0 para Windows). El umbral de medición del área positiva para la tinción fue el mismo para todos los grupos estudiados que se analizaron de forma ciega. Los resultados se expresaron en forma de porcentaje de área positiva respecto al área total (braquiocefálica y raíz aórtica) o área de lesión (secciones longitudinales de arco aórtico) para el análisis de colágeno, α -SMA, OPN, LOX, OPG, MMP2, IL-6, pentacrómico de Movat, Von Kossa, O.R.O. y rojo de alizarina. En el caso de la tinción de CD68, Ki67 y RUNX2 el resultado se expresó en forma de células positivas respecto a área total (braquiocefálica y raíz aórtica) o área de lesión (secciones longitudinales de arco aórtico). En el caso de tinciones fluorescentes o de luz polarizada (DHE, rojo sirio, OsteoSense 680) se cuantificó el *Integrity Density* respecto al área total (braquiocefálica y raíz aórtica) o área de lesión (secciones longitudinales de arco aórtico).

12. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media (SEM). La prueba estadística para la comparación de dos grupos fue la prueba *t-Student*, si los datos superaban la prueba de normalidad (*Saphiro-Wilk test*) y de varianzas (*Levene test*). En caso contrario, se utilizó la prueba no paramétrica *Mann-Whitney U test*. La comparación entre múltiples grupos se realizó siguiendo el análisis de la varianza de un factor (*One way ANOVA*), el análisis de la varianza de dos vías

(*Two way ANOVA*) o bien la comparación de múltiples grupos siguiendo el análisis de la varianza de dos vías en medidas repetidas (*Two way ANOVA analysis with repeated measures*) aplicando la corrección de *Tukey post-hoc test* o bien la corrección *Two-stage setp-up method of Benjamini, Krieger and Yekuteli False Discovery Rate post-hoc test*. La incidencia de calcificación, así como los factores de riesgo de la cohorte analizada se determinaron mediante *Fischer's exact test*. Los análisis se realizaron a través del *software* estadístico GraphPad Prism versión 8.0.2. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el p-valor era inferior a 0,05.

RESULTADOS

1. Implicación del receptor NOR-1 en la aterosclerosis y la calcificación cardiovascular

1.1. Mayores niveles de NOR-1 en válvulas y arterias humanas calcificadas

El receptor nuclear NOR-1 está implicado en múltiples procesos que participan en el remodelado cardiovascular (81), sin embargo, su potencial contribución a la CCV es incierta. Por ello, nos propusimos caracterizar la expresión de NOR-1 en válvulas y arterias femorales humanas calcificadas.

1.1.1. Caracterización de válvulas aórticas humanas calcificadas y variables clínicas de la cohorte del HSCSP

Se recogieron muestras de válvulas aórticas de pacientes sometidos a cirugía de reemplazo practicadas en el HSCSP. Las válvulas se analizaban macroscópicamente y se clasificaban según su grado de calcificación como válvulas poco calcificadas (PC), si el área de calcio no superaba el 20% del área total de la válvula; y muy calcificadas (MC), si el área de calcio superaba el 80% del área total de la misma (Figura 19). Las válvulas con grado de calcificación intermedio se destinaban a la generación de cultivos primarios de VICs. Así, se recogieron un total de $n=77$ válvulas que incluían muestras PC ($n=25$) y MC ($n=52$). Las variables clínicas de esta cohorte de pacientes se muestran en la Tabla 14. La principal característica a destacar de los pacientes de los que se obtuvieron estas muestras es que predominan los individuos de edad avanzada ($70,66 \pm 10,82$) y la mayoría de ellos son hipertensos ($70,12\%$).

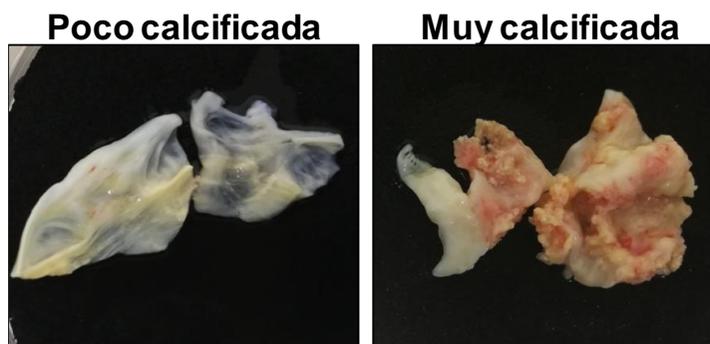


Figura 19. Imágenes representativas de válvulas aórticas humanas con diferente grado de calcificación. Se muestran válvulas aórticas poco y muy calcificadas (izquierda y derecha, respectivamente).

Resultados

Tabla 14. Variables clínicas de los pacientes incluidos en la cohorte del HSCSP.

Variables	Total	Válvulas PC	Válvulas MC	P- valor
n (%)	77 (100%)	25 (32,46%)	52 (67,54%)	
Edad (media±SD)	70,66 ± 10,82	69,8 ± 14,01	71,08 ± 9,027	NS
Varón, n (%)	52 (67,53%)	18 (72%)	34 (65,38%)	NS
Altura (media±SD)	164,7 ± 10,86	167,6 ± 12,67	163,4 ± 9,724	NS
Peso (media±SD)	76,66 ± 15,16	76,36 ± 15,45	76,81 ± 15,17	NS
IMC (media±SD)	28,27 ± 5,592	27,1 ± 4,104	28,84 ± 6,138	NS
DM, n (%)	21 (27,27%)	4 (16%)	17 (32,69%)	NS
HTA, n (%)	54 (70,12%)	18 (72%)	36 (69,23%)	NS
Fumadores, n (%)	30 (38,96%)	7 (28%)	23 (44,23%)	NS
Aclaramiento creatinina(media±SD)	70,98 ± 29,13	68,55±31,66	72,15±28,08	NS
Clase NYHA, n (%)				
I	2(2,60%)	2(8,00%)	0 (0,00%)	
II	42 (54,55%)	14 (56,00%)	28 (53,85%)	
III	32 (41,56)	9 (36,00%)	23 (44,23%)	NS
IV	1 (1,30)	0 (0,00%)	1 (1,92%)	
Fármacos				
ACEI, n (%)	24 (31,17%)	9 (36%)	15 (28,85%)	NS
ARB, n (%)	18 (23,38%)	7 (28%)	11 (21,15%)	NS
Diuréticos, n (%)	28 (36,36%)	12 (48%)	16 (30,77%)	NS
β-bloqueantes, n (%)	27 (35,06%)	11 (44%)	16 (30,77%)	NS
Estatinas, n (%)	40 (51,95%)	9 (36%)	31 (59,62%)	NS
Parámetros ecocardiográficos				
Gradiente pico máximo (media±SD)	70,19 ± 25,4	43,9 ± 30,09	76,3 ± 20,04	0,0018
Gradiente medio (media±SD)	44,8 ± 16,41	27,20 ± 19,33	48,63 ± 13,06	0,0007
EF% (media±SD)	59,92 ± 14,58	56,48 ± 13,32	63,24 ± 14,76	0,0074
Calcium score (A.U.) (media±SD)	1,897 ± 0,2215	1,903 ± 0,2397	1,894 ± 0,2146	NS
Estenosis grave, n (%)	51 (66,23%)	7 (28%)	44 (84,62%)	<0,0001
Insuficiencia aórtica grave, n (%)	22 (28,57%)	15 (60%)	7 (13,46%)	<0,0001

SD: desviación estándar; IMC: Índice de masa corporal; DM: Diabetes mellitus; HTA: Hipertensión arterial; NYHA: Clasificación funcional de la New York Heart Association; ACEI: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARB: bloqueantes de los receptores de angiotensina II; EF: Fracción de eyección; A.U.: Unidades Arbitrarias; NS: no significativo.

No observamos diferencias en la edad, el género, el tabaquismo o el tratamiento farmacológico entre los dos grupos de pacientes con diferente grado de calcificación. Sin embargo, los pacientes con válvulas PC se caracterizaban por tener menor incidencia de estenosis aórtica grave pero mayor incidencia de insuficiencia aórtica (Tabla 14). Además, en los pacientes con válvulas PC la ecocardiografía previa a la cirugía reveló que los valores de los parámetros cardíacos relacionados con la función valvular (gradiente pico máximo y gradiente medio) estaban elevados, pero eran significativamente más bajos, es decir, más cercanos a los valores de referencia de la población sana que los pacientes con válvulas MC (Tabla 14).

1.1.2. Niveles aumentados de NOR-1 en válvulas humanas con mayor grado de calcificación

Una vez caracterizada nuestra cohorte de pacientes, analizamos los niveles del receptor nuclear NOR-1 en válvulas PC y MC para determinar si su expresión se veía afectada por la calcificación. Los análisis de *Western Blot* revelaron niveles de NOR-1 significativamente mayores en las válvulas MC en comparación con las PC, en las que NOR-1 era virtualmente indetectable (Figura 20A). Además, este incremento de NOR-1 iba acompañado de un aumento de la expresión de marcadores osteogénicos como RUNX2, un factor de transcripción esencial para la diferenciación osteocondrogénica y la calcificación valvular, y osteopontina (OPN) (Figura 20B).

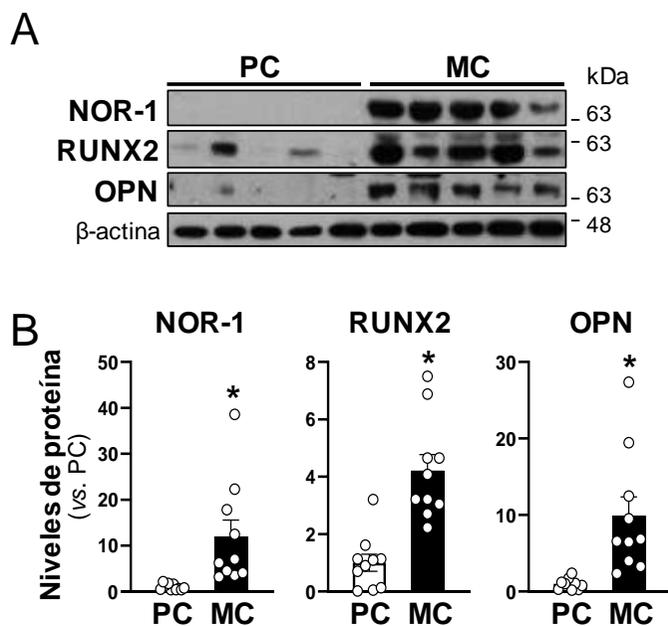


Figura 20. La expresión de NOR-1 está aumentada en válvulas aórticas humanas calcificadas. (A) Imágenes representativas de *Western Blot* de NOR-1, RUNX2 y osteopontina (OPN) en válvulas PC y MC. (B) Cuantificación densitométrica de los niveles de estas proteínas. Se muestran también los niveles de β -actina que se evaluaron como control de carga. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n= 10). *p<0,05 vs. PC.

A nivel histológico los resultados fueron coherentes ya que las inmunohistoquímicas realizadas en cortes de válvulas MC detectaron mayor tinción de NOR-1 en regiones cercanas a los nódulos de calcificación (positivos para la tinción de Von Kossa) (Figura 21). Además, cortes sucesivos de estas mismas válvulas mostraron que el marcaje NOR-1 colocalizaba con zonas positivas para RUNX2 en áreas ricas en VICs (regiones positivas para vimentina) (Figura 21). Sin embargo, los análisis inmunohistoquímicos en las válvulas PC revelaron escasa tinción o ausencia de NOR-1 y RUNX2 (Figura 21).

Paralelamente se realizaron los controles negativos de las inmunohistoquímicas con la finalidad de confirmar la especificidad de la tinción. Estas secciones no se incubaron con el anticuerpo primario, pero sí con los secundarios correspondientes y en ambos casos no se apreció tinción inespecífica (Figura 22).

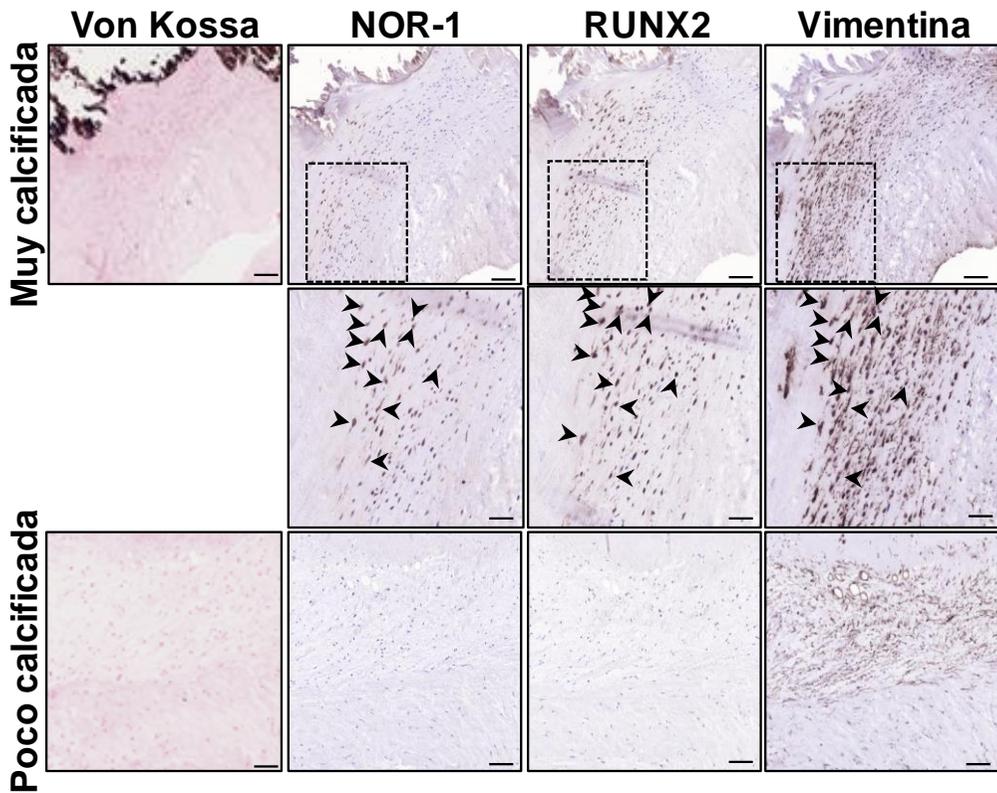


Figura 21. Inmunohistoquímica de NOR-1 en regiones próximas a la calcificación de válvulas aórticas humanas. Imágenes representativas de la tinción von Kossa y análisis inmunohistoquímicos de NOR-1, RUNX2 y vimentina en válvulas PC y MC. Los paneles centrales muestran magnificados los campos indicados en los paneles superiores. Las flechas negras indican células con marcaje positivo para NOR-1, RUNX2 y vimentina en secciones consecutivas. Barras: 100 μm (paneles superior e inferior) y 50 μm (panel central).

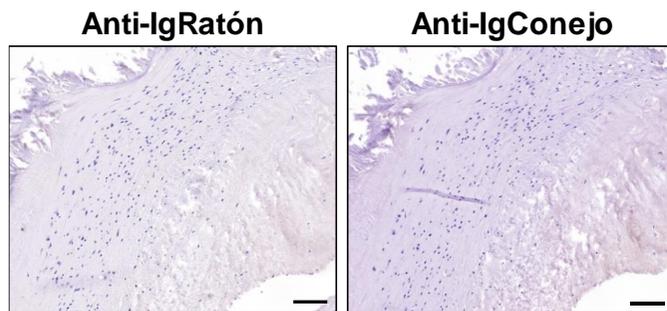


Figura 22. Controles negativos de los análisis inmunohistoquímicos de válvulas humanas calcificadas. Imágenes microscópicas de los controles negativos de los estudios mostrados en la Figura 21. Las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina (Ig) de ratón (izquierda) y anti-inmunoglobulina (Ig) de conejo (derecha) realizadas en válvulas MC. Barra: 100 μm .

Resultados

1.1.3. Mayores niveles de NOR-1 en arterias femorales humanas calcificadas

Análogamente, caracterizamos la expresión de NOR-1 en arterias femorales con lesiones ateroscleróticas calcificadas. Se detectó expresión de NOR-1 en áreas cercanas a la zona calcificada (von Kossa positiva) lo que sugería una relación de este factor de transcripción con el desarrollo de CCV (Figura 23).

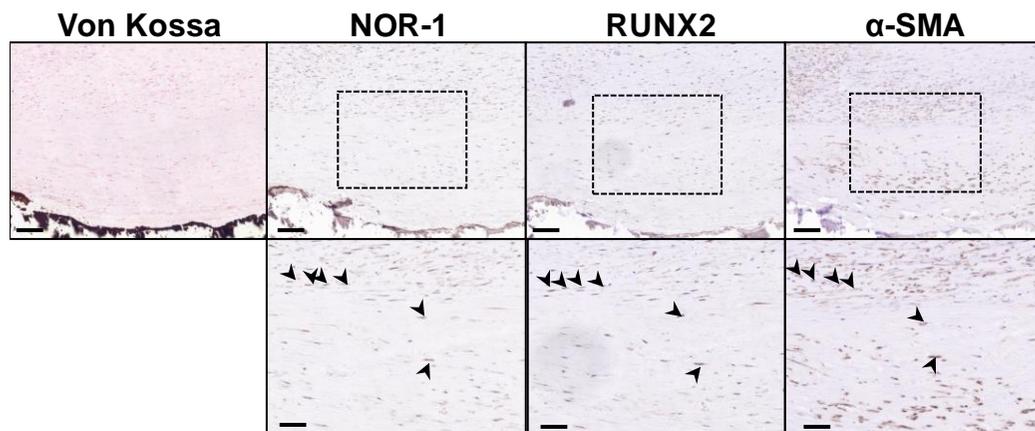


Figura 23. Estudio inmunohistoquímico de NOR-1 en lesiones ateroscleróticas calcificadas de arterias femorales humanas. Imágenes representativas de la tinción de von Kossa y el análisis inmunohistoquímico para NOR-1, RUNX2 y α -SMA en lesiones ateroscleróticas calcificadas de arterias femorales humanas. Los paneles inferiores corresponden a la magnificación de las áreas recuadradas en los paneles superiores. Las flechas negras indican células positivas para NOR-1, RUNX2 y α -SMA en secciones consecutivas. Barras: 100 μ m (paneles superiores) y 50 μ m (paneles inferiores).

Análisis en cortes consecutivos evidenciaron que las zonas con marcaje positivo para NOR-1 correspondían a células que expresan RUNX2 y α -SMA (áreas con predominio de CMLVs) (Figura 23).

1.2. Impacto de NOR-1 en la transdiferenciación osteoblástica de células en cultivo

Los resultados descritos en los apartados anteriores sugerían una posible relación entre el desarrollo de la CCV y NOR-1. Para profundizar en el papel de NOR-1 en la calcificación, se llevaron a cabo estudios de inducción de calcificación en dos tipos celulares: VICs de válvulas aórticas humanas y CMLVs de aorta y arterias coronarias.

1.2.1. NOR-1 atenúa la calcificación de VICs en cultivo

VICs en cultivo se expusieron a medio osteogénico (OM) para inducir la transdiferenciación osteoblástica y la mineralización de la MEX. Las células expuestas a OM al cabo de varios días depositaban calcio que se visualizó mediante tinción con rojo de alizarina (Figura 24A). Asimismo, los lisados de las

células cultivadas en medio OM mostraron un incremento significativo de la actividad fosfatasa alcalina inespecífica de tejido (TNAP), enzima implicada en la mineralización de la MEX, respecto a las VICs control (Figura 24B).

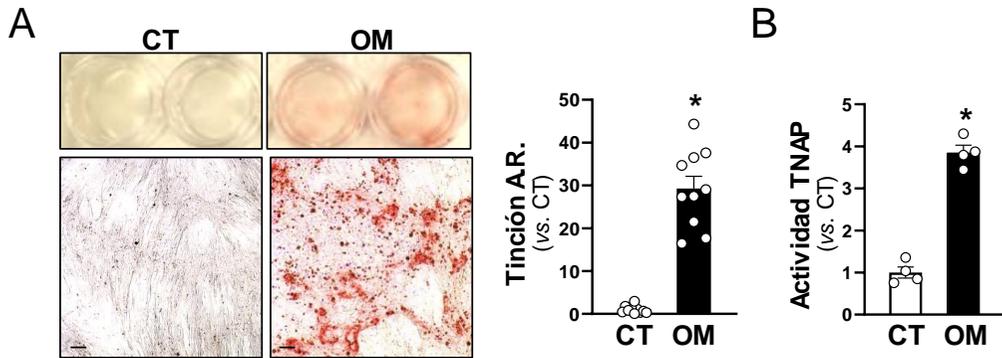


Figura 24. Inducción de calcificación en células valvulares intersticiales (VICs) expuestas a medio osteogénico. Las VICs humanas se cultivaron en medio control (CT, barras blancas) o medio osteogénico (OM, barras negras). (A) Imágenes representativas de la tinción con rojo de alizarina en VICs expuestas durante 14 días a medio OM. Barras: 100 μ m. El gráfico de barras representa la cuantificación del marcaje positivo de esta tinción en condiciones CT y OM. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n= 10). *p<0,05 vs. CT. (B) Análisis de la actividad de la fosfatasa alcalina inespecífica de tejido (TNAP) en dichas células. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n= 4). *p<0,05 vs. CT.

Una vez confirmado que el medio OM inducía calcificación en este tipo celular, analizamos la expresión génica durante la transdiferenciación osteogénica de las VICs. El análisis de los niveles de ARNm durante este proceso evidenció un aumento significativo de la expresión de NOR-1 conjuntamente con un aumento de la expresión de marcadores osteogénicos como RUNX2, BMP2, BGLAP y OPN (Figura 25A). Además, se detectó un incremento de los niveles de ARNm de la IL-6 (Figura 25A), citoquina involucrada en la mineralización de las VICs (243). El análisis de los niveles de proteína mediante *Western Blot* confirmó el aumento de NOR-1, RUNX2 y OPN en las VICs expuestas a OM respecto a las células en medio control (Figura 25B).

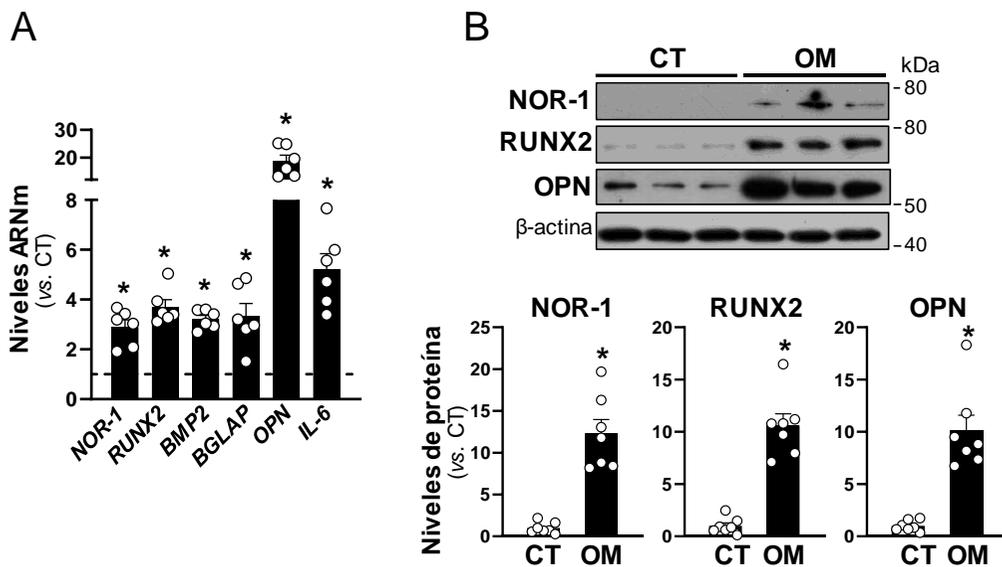


Figura 25. La expresión de NOR-1 se induce en células valvulares intersticiales (VICs) expuestas a medio osteogénico. Las VICs humanas se cultivaron en medio control (CT, barras blancas) o medio osteogénico (OM, barras negras) durante 6 días. (A) Niveles de ARNm de NOR-1, marcadores implicados en la transdiferenciación osteogénica e IL-6 analizados mediante PCR a tiempo real. Los niveles de expresión en células control se indican mediante una línea discontinua de puntos. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n= 6). * $p < 0,05$ vs. CT. (B) Análisis por *Western Blot* de los niveles de proteína de NOR-1, RUNX2 y OPN. Se muestran imágenes representativas (panel superior) así como la cuantificación densitométrica de los resultados obtenidos representados en el gráfico de barras (panel inferior). Se muestran los niveles de β -actina como control de carga. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n= 7). * $p < 0,05$ vs. CT.

1.2.2. El silenciamiento de NOR-1 agrava la calcificación de las VICs

Para evaluar el impacto de NOR-1 en la calcificación de VICs, se bloqueó la expresión de NOR-1 mediante el uso de una mezcla de siRNAs específicos. Esta estrategia redujo de manera drástica los niveles de ARNm de este factor de transcripción en VICs cultivadas tanto en medio control como en medio de calcificación (OM) (Figura 26).

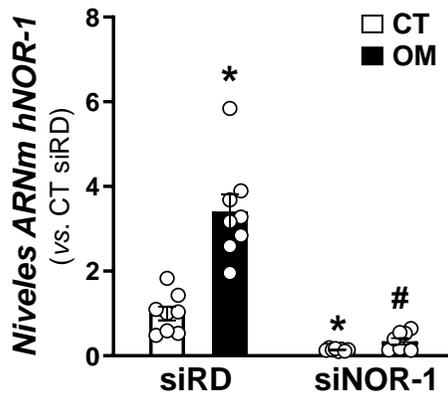


Figura 26. El silenciamiento de NOR-1 en VICs redujo eficientemente su expresión. Niveles relativos de ARNm de NOR-1 en VICs transfectadas con un ARN de interferencia *random* (siRD) o dirigido a NOR-1 (siNOR-1) cultivadas en medio control (CT, barras blancas) o medio osteogénico (OM, barras negras). Los resultados se expresan como media \pm SEM (n= 8). $p < 0,001$: * vs. siRD/células CT; # vs. siRD/ células OM.

El bloqueo de este factor de transcripción agravó significativamente la mineralización de la MEX inducida por OM en comparación con las células transfectadas con siRD mantenidas también en condiciones procalcificantes (Figura 27).

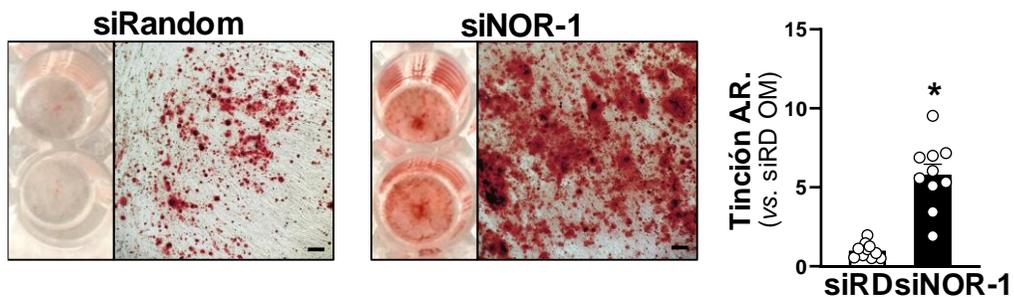


Figura 27. El silenciamiento de NOR-1 agravó la calcificación de las VICs. Las VICs humanas se transfectaron con ARN de interferencia contra NOR-1 (siNOR-1) o un siRNA *random* (siRD) y se expusieron a un medio control (CT, barras blancas) o un medio osteogénico (OM, barras negras). Imágenes representativas de la tinción con rojo de alizarina en dichas células después de 10 días de inducción osteogénica. Barra: 100 μ m. El gráfico de barras representa la cuantificación de la deposición de calcio. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n= 10). $*p < 0,05$: vs. VICs transfectadas con siRD.

Asimismo, analizamos si el silenciamiento de NOR-1 afectaba a la expresión de marcadores de diferenciación. Efectivamente, aquellas células transfectadas con un siNOR-1 en medio OM mostraban un aumento exacerbado de los niveles de expresión de ALPL, BMP2, RUNX2 y OPN en comparación con las VICs transfectadas con un siRNA *random* (Figura 28A y B). Por lo tanto, NOR-

Resultados

1 parece ser un factor de transcripción importante que modula el proceso de transdiferenciación osteoblástica de las VICs y la calcificación.

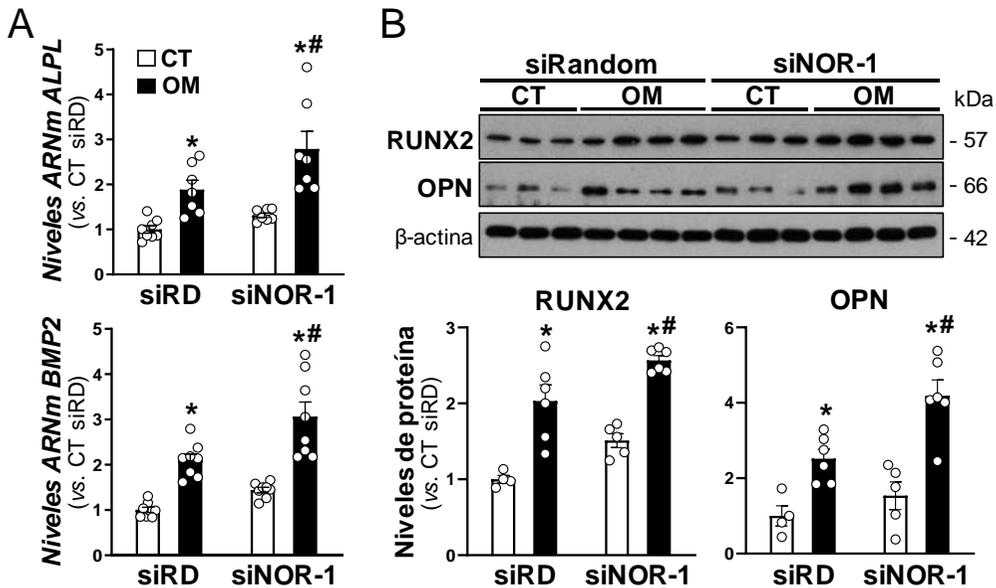


Figura 28. El silenciamiento de NOR-1 exacerbó la inducción de marcadores osteogénicos en VICs. VICs humanas se transfectaron con un ARN de interferencia contra NOR-1 (siNOR-1) o un siRNA *random* (siRandom, siRD) y se expusieron a medio control (CT, barras blancas) o medio osteogénico (OM, barras negras). (A) Niveles relativos de ARNm de ALPL y BMP2 analizados por PCR a tiempo real después de 6 días de inducción osteogénica. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n= 7-8). $p < 0,05$: * vs. VICs cultivadas en medio CT; # vs. VICs transfectadas con siRD en medio OM. (B) Imágenes representativas del análisis por *Western Blot* que muestran los niveles de RUNX2 y OPN (panel superior) y gráficos de barras correspondientes a su cuantificación densitométrica (panel inferior). Se muestran los niveles de β -actina como control de carga. Los resultados se expresan como media \pm SEM (CT n= 4-5; OM n= 6). $p < 0,05$: * vs. VICs cultivadas en medio CT; # vs. VICs transfectadas con siRD en medio OM.

1.2.3. La sobreexpresión de NOR-1 en VICs previene la mineralización de la MEX

Una vez comprobado que el silenciamiento de NOR-1 promueve la calcificación de las VICs en condiciones osteogénicas, quisimos evaluar el efecto de su sobreexpresión. La sobreexpresión de NOR-1 en VICs se indujo mediante transducción lentiviral. Tras la selección con puomicina de las células infectadas éstas se expusieron a medio control o a medio osteogénico y analizamos los niveles de expresión de NOR-1 mediante PCR a tiempo real. Los resultados evidenciaron que la sobreexpresión lentiviral producía un aumento muy importante de los niveles de este factor de transcripción tanto en condiciones control como procalcificantes (Figura 29).

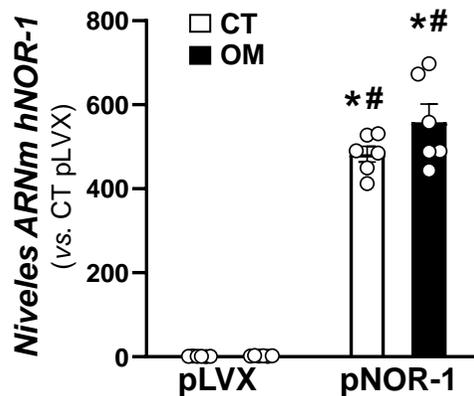


Figura 29. Niveles de NOR-1 en VICs transducidas lentiviralmente en condiciones control y procalcificantes. Se analizaron los niveles de ARNm de NOR-1 en VICs humanas transducidas con pLVX/NOR-1 (pNOR-1) o con el vector lentiviral control pLVX cultivadas en medio control (CT, barras blancas) o medio osteogénico (OM, barras negras). Los resultados se expresan como media \pm SEM (n= 6). $p < 0,001$: * vs. VICs transducidas con pLVX en medio CT; # vs. VICs transducidas con pLVX en medio OM.

A continuación, analizamos el impacto de la sobreexpresión de NOR-1 sobre la diferenciación osteoblástica y la mineralización de la MEX. La sobreexpresión de NOR-1 redujo de forma muy significativa la calcificación de las VICs inducida por las condiciones osteogénicas (Figura 30).

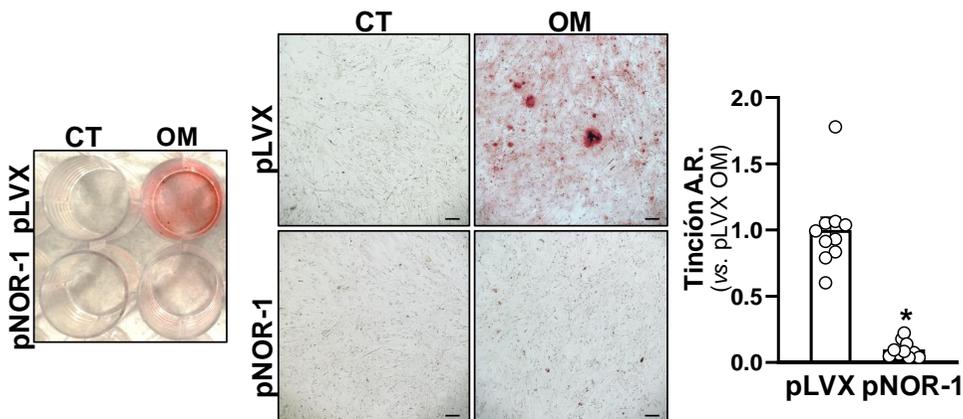


Figura 30. La sobreexpresión de NOR-1 reduce la mineralización de la MEX inducida por condiciones procalcificantes. Las VICs se transdujeron con pLVX/NOR-1 (pNOR-1) o bien con el vector lentiviral pLVX y se incubaron en condiciones control (CT, barras blancas) o medio osteogénico (OM, barras negras). Se muestran imágenes macroscópicas y microscópicas representativas de la tinción con rojo de alizarina de estas células tras 14 días de la inducción osteogénica. Barras: 100 μ m. El gráfico de barras representa la cuantificación del área teñida en las células transducidas con pLVX y pNOR-1 inducidas con OM. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n= 10). $p < 0,01$: vs. células transducidas con pLVX en medio OM.

Resultados

De forma coherente, en las VICs transducidas con NOR-1 se atenuó la inducción de los genes implicados en el proceso de transdiferenciación osteoblástica como ALPL, BMP2, IL-6 y RUNX2 respecto a las transducidas con el vector control (Figura 31A y B). Por lo tanto, estos resultados sugieren que NOR-1 previene o retrasa la calcificación *in vitro*.

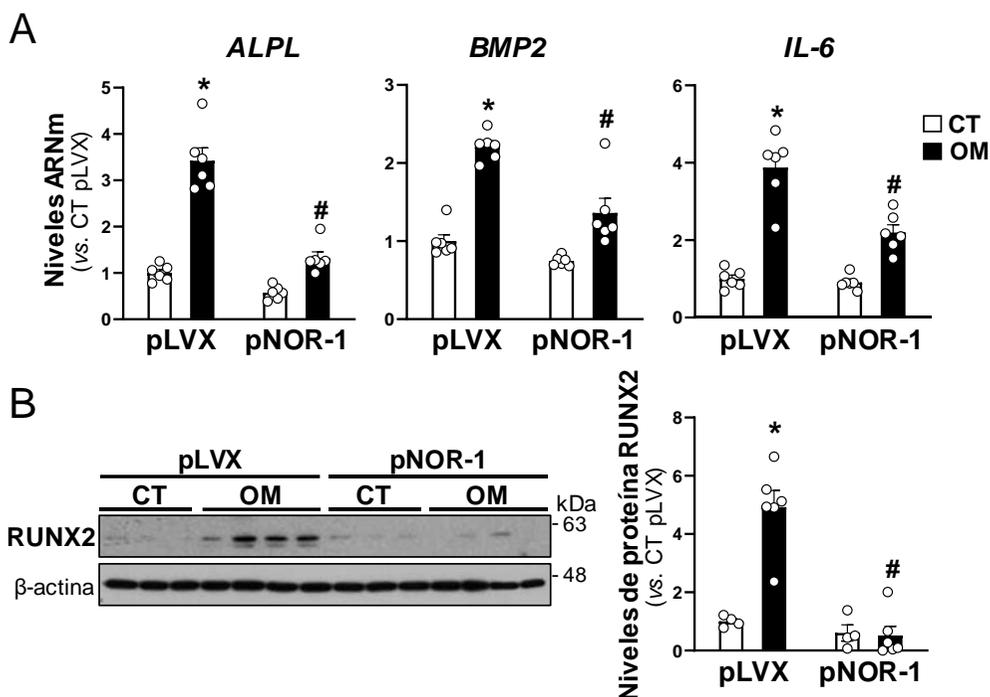


Figura 31. La sobreexpresión de NOR-1 en las VICs limita la inducción de la expresión de los marcadores de transdiferenciación osteoblástica en respuesta a medio osteogénico. Las VICs se transdujeron con pLVX/NOR-1 (pNOR-1) o bien con el vector lentiviral pLVX en condiciones control (CT, barras blancas) o en medio osteogénico (OM, barras negras). (A) Niveles de ARNm de ALPL, BMP2 e IL-6 analizados por PCR a tiempo real a los 6 días de la inducción osteogénica. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n= 6). $p < 0,05$: * vs. células transducidas con pLVX en medio CT; # vs. células transducidas con pLVX en medio OM. (B) Imágenes representativas del análisis por Western Blot que muestran los niveles de proteína de RUNX2 (izquierda) y su cuantificación densitométrica (derecha). Se muestran los niveles de β -actina como control de carga. Los resultados se expresan como media \pm SEM (CT n= 4; OM n= 6). $p < 0,01$: * vs. células transducidas con pLVX en medio CT; # vs. células transducidas con pLVX en medio OM.

1.2.4. Análisis del papel de NOR-1 en el proceso de transdiferenciación osteogénica de las CMLVs

Nos propusimos analizar cómo afectan los niveles de expresión de NOR-1 al proceso de transdiferenciación osteoblástica de las CMLVs. Para ello CMLVs humanas de aorta y de arterias coronarias se expusieron a OM y se evaluó la

mineralización de la MEX así como la inducción de los marcadores de calcificación.

El medio OM favoreció la deposición de calcio en la MEX tanto de CMLVs de aorta como de coronarias (Figura 32A y B) y también se asoció con niveles significativamente mayores de actividad TNAP (Figura 32C y D). El análisis de los niveles de ARNm determinó un incremento significativo de la expresión de NOR-1 así como de los marcadores característicos de la transdiferenciación osteoblástica como RUNX2, ALPL e IL-6 (Figura 32E y F).

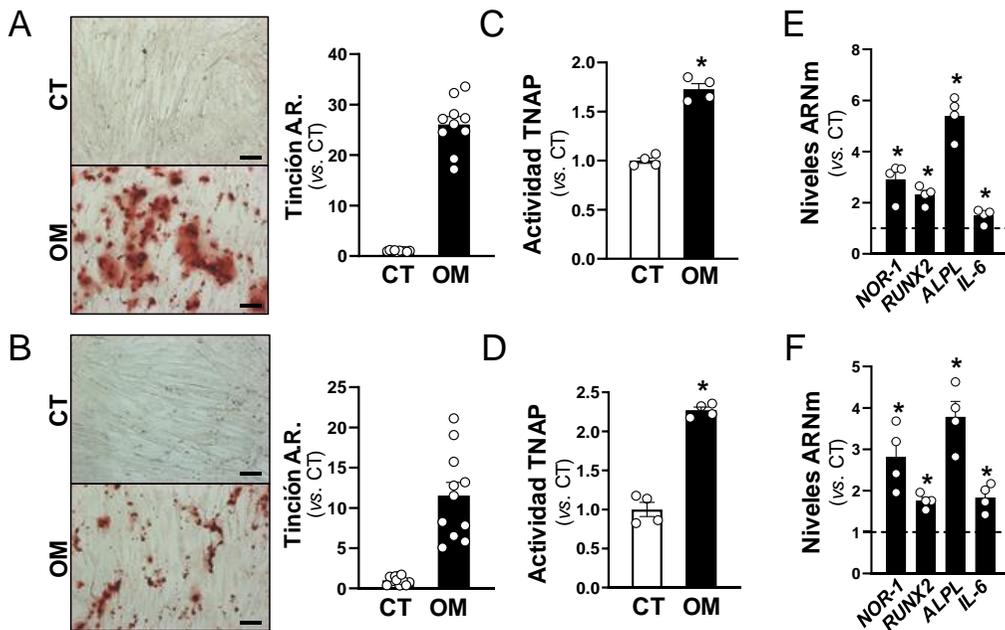


Figura 32. Aumento de la expresión de NOR-1 durante la transdiferenciación osteoblástica de CMLVs humanas de aorta y arterias coronarias. (A-F) CMLVs humanas de aorta (CMLVs, A, C y E) y de arterias coronarias (CMLVs, B, D y F) se mantuvieron en condiciones control (CT, barras blancas) o se expusieron a condiciones osteogénicas (OM, barras negras). (A y B), Imágenes representativas de la tinción con rojo de alizarina (izquierda) y resultado de su cuantificación en CMLVs de aorta (n= 10) (A) y de arterias coronarias (n= 11). Barras: 100 μ m. (B) (derecha). Los resultados se expresan como media \pm SEM. * p <0,05: vs. CMLVs en medio CT. (C y D) Actividad TNAP de CMLVs de aorta (C) y arterias coronarias (D) en medio OM. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n= 4). * p <0,05: vs. CMLVs en medio CT. (E y F) Niveles de expresión de NOR-1, marcadores osteogénicos e IL-6 analizados por PCR a tiempo real en CMLVs de aorta (E) y arterias coronarias (F) a los 6 días de la inducción osteogénica. La línea de puntos indica los niveles de ARNm de las células mantenidas en condiciones CT (normalizadas a 1). Los resultados se expresan como media \pm SEM (n= 4). * p <0,05: vs. CMLVs en medio CT.

Resultados

1.3. Análisis del efecto de la sobreexpresión de NOR-1 en CMLVs en la calcificación vascular *ex vivo* e *in vivo*

Los resultados comentados anteriormente evidencian que NOR-1 modula la calcificación *in vitro* por lo que nos interesó confirmarlo en otros modelos de calcificación. Para ello utilizamos un modelo de ratón transgénico desarrollado por nuestro grupo en el que la sobreexpresión de NOR-1 está dirigida a CMLVs.

1.3.1. La sobreexpresión de NOR-1 en CMLVs reduce la calcificación *in vitro*

En primer lugar, analizamos si el efecto de NOR-1 observado en CMLVs humanas se corroboraba en CMLVs de ratón. Para ello se obtuvieron CMLVs de ratones que sobreexpresan NOR-1 en CMLVs (TgNOR-1^{CMLV}) y CMLVs de sus compañeros de camada con genotipo salvaje (WT). Se comprobó que las CMLVs de ratones TgNOR-1^{CMLV} sobreexpresaban el transgén humano. Tanto los niveles de ARN como los niveles de proteína (*Western Blot* e inmunocitoquímica) mostraron la sobreexpresión de NOR-1 en células transgénicas (Figura 33 A-C). Los análisis inmunohistoquímicos demostraron que la sobreexpresión iba dirigida de manera específica a las CMLVs de la media (Figura 33D). Finalmente, determinamos que la transgénesis de NOR-1 no repercutía sobre la expresión endógena de los 3 miembros de la familia NR4A (Figura 33E).

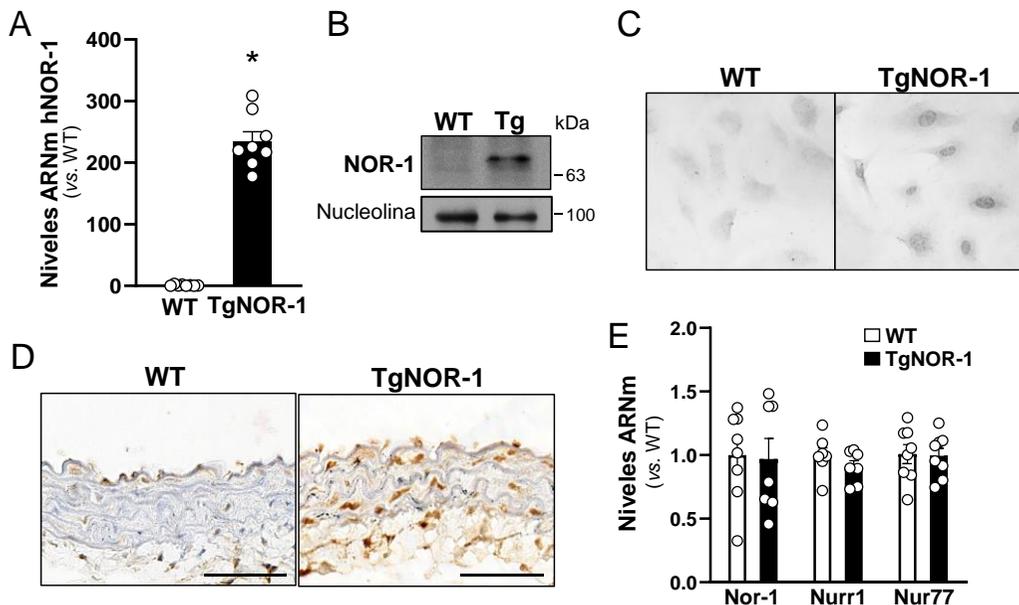


Figura 33. NOR-1 está sobreexpresado de manera específica en CMLVs en el ratón TgNOR-1^{CMLV}(TgNOR-1). (A) Niveles de ARNm de NOR-1 humano en CMLVs de aortas de ratones WT y TgNOR-1. Los niveles de NOR-1 humano en las células WT eran indetectables, pero se le atribuyó un valor arbitrario de 1 para realizar la comparación. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n= 8). *p<0,001; vs. ratones WT. (B) Imágenes representativas del análisis por *Western Blot* que muestran los niveles de proteína de NOR-1 en el extracto nuclear de CMLVs de aortas de ratones

WT y TgNOR-1. Los niveles de nucleolina se muestran como control de carga. (C) Los análisis inmunocitoquímicos de NOR-1 evidenciaron la tinción nuclear sobre todo en CMLVs de ratones TgNOR-1. (D) Expresión de NOR-1 (coloración marrón) en secciones aórticas de ratones transgénicos. Barra: 50 μ m. (E) Expresión endógena de *Nor-1*, *Nurr1* y *Nur77* analizada mediante PCR a tiempo real en CMLVs de ratones WT (barras blancas) y TgNOR-1 (barras negras). Los resultados se expresan como media \pm SEM (n= 7-8).

Las CMLVs de ratones TgNOR-1 y WT se expusieron a OM lo que promovió la deposición de calcio (Figura 34A). Coherentemente con los resultados obtenidos en VICs y CMLVs humanas, la sobreexpresión de NOR-1 atenuó de manera significativa la mineralización de la MEX (Figura 34A). La inducción osteogénica también aumentó la expresión de *Nor-1* endógeno en las CMLVs de ambos genotipos (Figura 34B).

De igual modo, analizamos los niveles de ARNm de estas células expuestas a condiciones procalcificantes. El medio OM indujo la expresión de los marcadores de calcificación (*Alpl*, *Bmp2*, *Opn* e *Il-6*) en las células WT, mientras que la sobreexpresión de NOR-1 redujo su expresión incluso por debajo de los valores obtenidos en células control en condiciones basales (Figura 34C). De hecho, la expresión basal de estos marcadores era significativamente menor en las CMLVs de ratones transgénicos (Figura 34C).

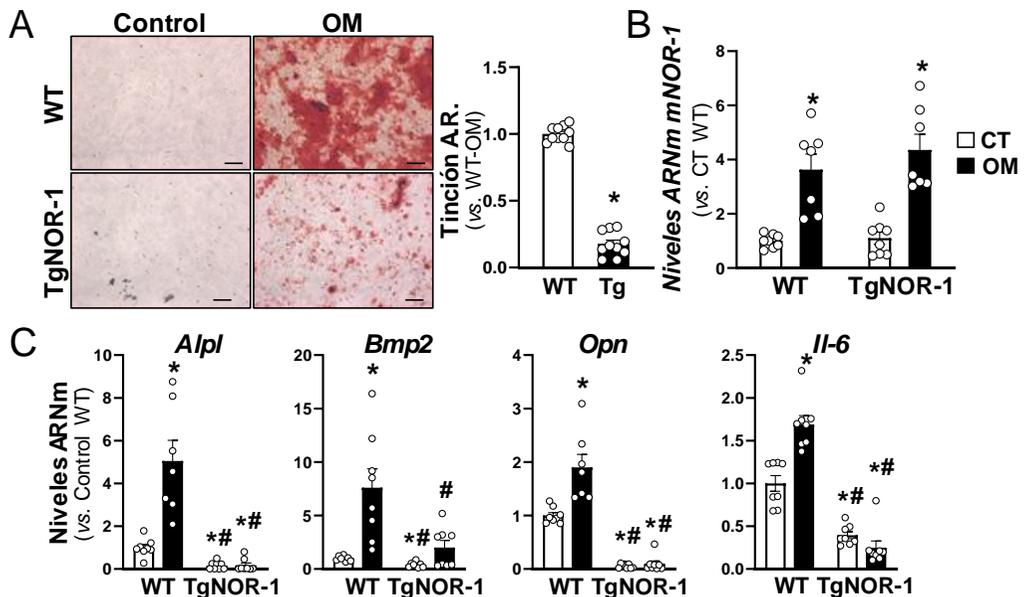


Figura 34. La transgénesis de NOR-1 atenuó la calcificación de las CMLVs. (A-C) CMLVs aisladas de ratones WT y TgNOR-1^{CMLV} (TgNOR-1) se cultivaron en condiciones control (CT, barras blancas) y osteogénicas (OM, barras negras). (A) Imágenes representativas de la tinción con rojo de alizarina en estas células a los 10 días de la inducción osteogénica. Barras: 100 μ m. El gráfico de barras representa la cuantificación de dicha tinción. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n= 10). *p<0,05 vs. CMLVs WT/OM. (B-C) Niveles de ARNm de *Nor-1* murino (B) y marcadores

Resultados

osteogénicos (*Alpl*, *Bmp2* y osteopontina [*Opn*]) e *Il-6* (C) analizados mediante PCR a tiempo real a los 6 días de inducción osteogénica. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n= 7-8). * $p < 0,05$ vs. CMLVs WT/CT; # vs. CMLVs WT/OM.

1.3.2. La sobreexpresión de NOR-1 reduce la mineralización *ex vivo* en anillos aórticos

Analizamos el efecto de la sobreexpresión de NOR-1 *ex vivo* utilizando anillos aórticos de ratones WT y TgNOR-1^{CMLV} que expusimos a medio osteogénico. Las aortas extraídas en fresco de animales WT y TgNOR-1^{CMLV} se seccionaron en anillos de aproximadamente 1 mm de grosor y se incubaron con medio de calcificación (233). Transcurridos 6 días de la inducción osteogénica se tiñeron con rojo de alizarina. La deposición de calcio fue significativamente menor en los anillos de ratones transgénicos (Figura 35).

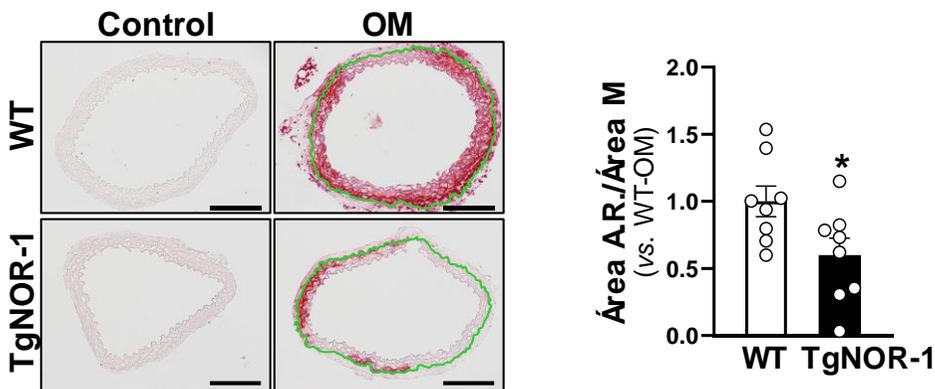


Figura 35. La transgénesis de NOR-1 disminuyó la deposición de calcio en anillos aórticos *ex vivo*. Imágenes representativas de la tinción con rojo de alizarina (A.R.) en anillos aórticos de ratones WT y TgNOR-1^{CMLV} (TgNOR-1) expuestos a condiciones osteogénicas durante 6 días. El gráfico de barras representa el resultado de los análisis cuantitativos del área de tinción positiva respecto al área total de la capa media (área M) relativizadas al grupo control (anillos WT expuestos a OM). Las líneas verdes delimitan el área considerada en el análisis cuantitativo. Barras: 200 μ m. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n= 8). * $p < 0,05$ vs. anillos aórticos WT en medio OM.

1.3.3. La transgénesis de NOR-1 reduce el desarrollo de aterosclerosis y la calcificación

Finalmente, analizamos el impacto de NOR-1 en el desarrollo de la aterosclerosis y la calcificación vascular *in vivo*. Para ello se indujo hiperlipidemia y aterosclerosis a ratones WT y TgNOR-1^{CMLV} mediante la inyección intravenosa de virus adenoasociados (AAV) que contienen una forma mutada de ganancia de función de la proteína PCSK9 humana (PCSK9^{D374Y}) y se alimentaron con una dieta rica en grasa y colesterol durante 20 semanas (Figura 36A). La dieta aterogénica promovió un incremento progresivo del peso corporal en todos los grupos experimentales sin que se observaran diferencias significativas entre ellos (Figura 36B).

En los animales transducidos con PCSK9^{D374Y}, se confirmó el incremento de los niveles circulantes de la PCSK9 humana desde la primera semana de la inyección y que no se veían afectados por la transgénesis de NOR-1 (Figura 36C). La sobreexpresión hepática de la PCSK9^{D374Y} redujo de manera drástica los niveles de la proteína LDLR hepática tanto en los animales WT como en los TgNOR-1^{CMLV} (Figura 36D). Asimismo, la dieta produjo un incremento significativo de los niveles plasmáticos de colesterol total y triglicéridos en los animales transducidos con AAV-PCSK9^{D374Y} en comparación con los controles con suero salino, aumento significativo desde la primera semana (Figura 36 E y F).

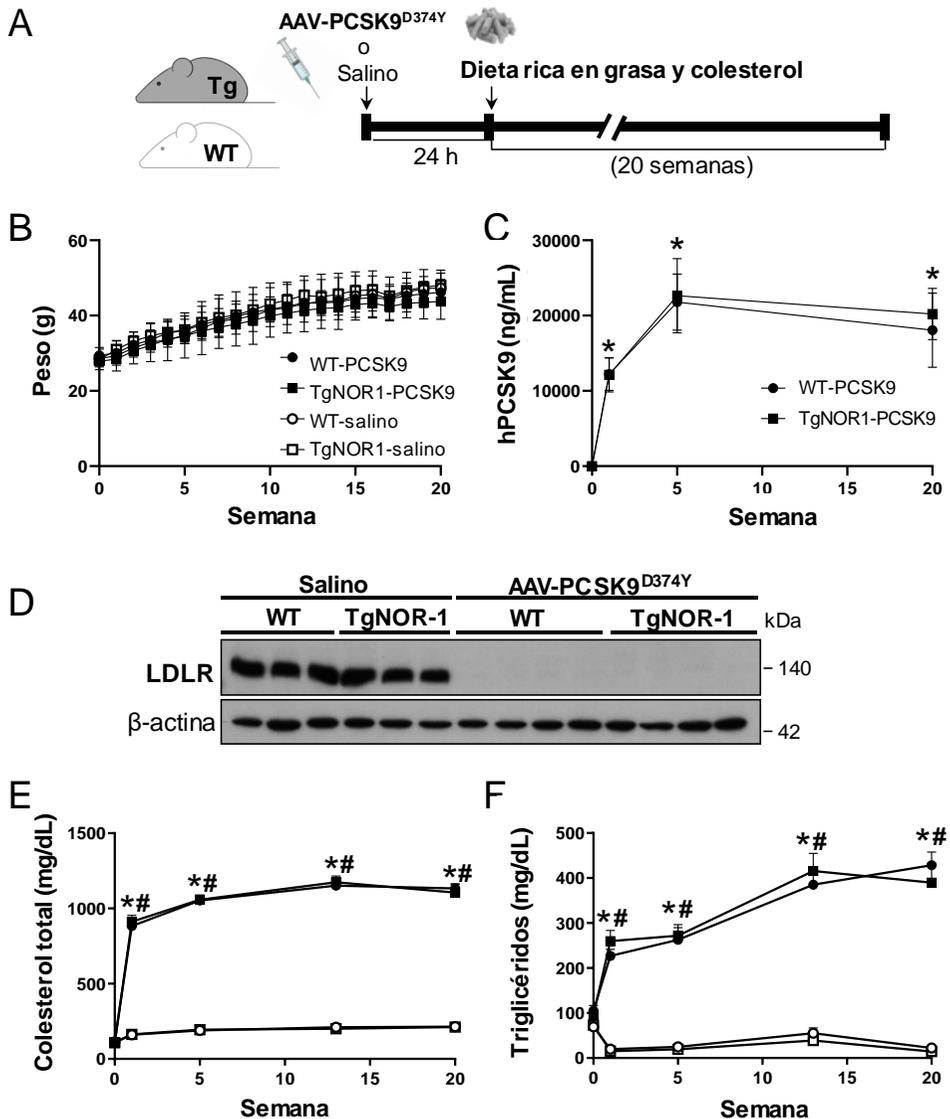


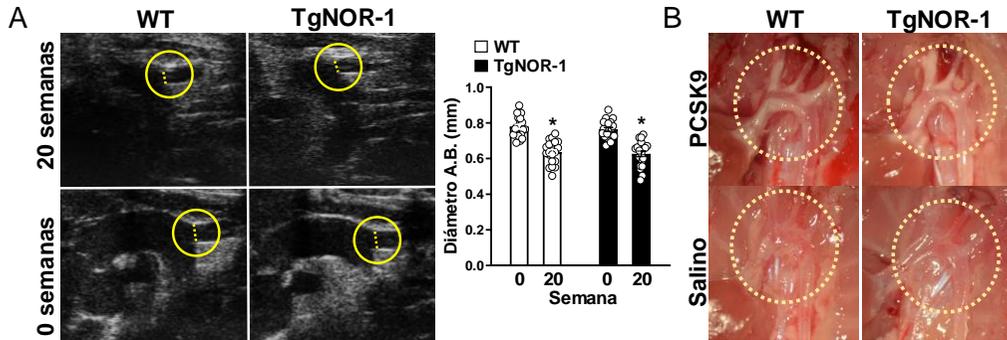
Figura 36. Inducción de hiperlipidemia y aterosclerosis mediante la inyección de virus adenoasociados (AAV) que codifican para una forma mutada de ganancia de función de la

Resultados

PCSK9 (PCSK9^{D374Y}) combinada con una dieta rica en grasa y colesterol. Se inyectó (vía intravenosa) AAV-PCSK9^{D374Y} o suero salino a los ratones WT y TgNOR-1^{CMLV} (TgNOR-1) a los que se administró una dieta rica en grasa y colesterol durante 20 semanas. (A) Esquema representativo del diseño experimental. (B) Seguimiento del peso corporal de los diferentes grupos experimentales. (C) Niveles plasmáticos de la proteína PCSK9 humana (hPCSK9) en los ratones transducidos con AAV-PCSK9^{D374Y}. (D) Niveles de proteína del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) a nivel hepático mediante *Western Blot*. Los niveles de β -actina se muestran como control de carga. (E y F) Niveles plasmáticos de colesterol total (E) y triglicéridos (F). Los resultados se expresan como media \pm SEM (Salino n= 8, PCSK9^{D374Y} n= 15). p<0,01: *vs. t=0; # vs. ratones del grupo salino.

1.3.3.1. NOR-1 atenúa el desarrollo de placas ateroscleróticas

Transcurridas 20 semanas y antes de realizar el sacrificio de los animales, se realizó una ultrasonografía a nivel del arco aórtico y de la arteria braquiocefálica. Esta ecografía nos permitió confirmar que la administración de AAV-PCSK9^{D374Y} junto con la dieta aterogénica desencadenaron una estenosis luminal significativa que indicaba la presencia de lesiones ateroscleróticas (Figura 37A). Además, se midió el diámetro de la luz de la arteria braquiocefálica que disminuyó significativamente y de forma similar en ambos grupos (WT y TgNOR-1^{CMLV}) en comparación con el diámetro a tiempo inicial (Figura 37A).



La confirmación mediante ultrasonografía de la presencia de lesiones ateroscleróticas a las 20 semanas nos impulsó a finalizar el experimento y a

completar los análisis. De hecho, durante el sacrificio se apreciaban a simple vista las lesiones ateroscleróticas en el arco aórtico de los animales transducidos con AAV-PCSK9^{D374Y} y alimentados con dieta aterogénica (Figura 37B). En cambio, los ratones a los que se administró suero salino aunque consumieron la misma dieta presentaban aortas libres de placas ateroscleróticas (Figura 37B).

Así, nos propusimos analizar de manera más exhaustiva el efecto de la transgénesis de NOR-1 en el desarrollo de la aterosclerosis. Para ello, caracterizamos la presencia de lesiones ateroscleróticas a lo largo de toda la aorta expuesta *en face* mediante la tinción de O.R.O. (Figura 38A). Los ratones TgNOR-1^{CMLV} presentaron significativamente menor área de lesión aterosclerótica a lo largo de toda la aorta en comparación con los ratones WT (15,41±1,72 *vs.* 22,61±2,41) (Figura 38B). Dividimos la aorta en tres sectores (arco aórtico, aorta torácica y aorta abdominal) y evaluamos el efecto de la sobreexpresión de NOR-1 en el desarrollo de aterosclerosis en cada uno de ellos. Los resultados evidenciaban que las diferencias eran más notorias en el arco aórtico y la aorta torácica frente a la región abdominal (Figura 38B).

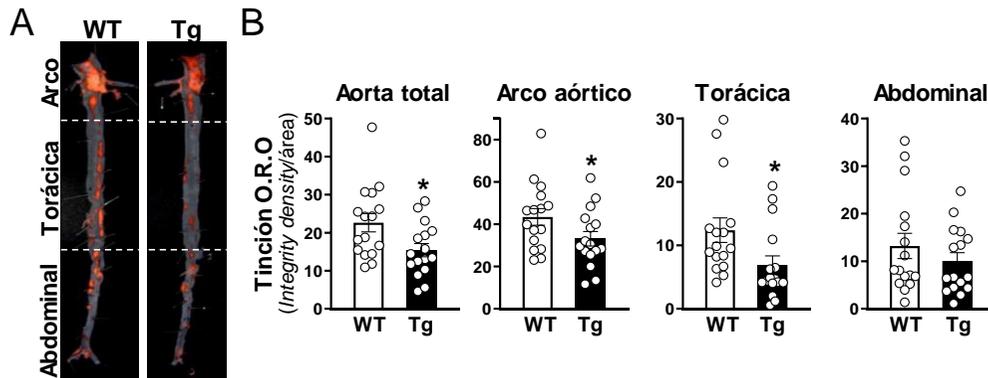


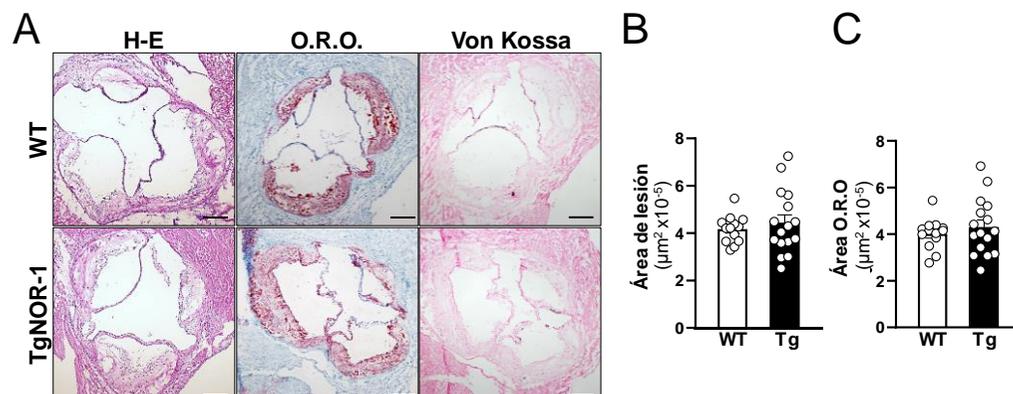
Figura 38. La transgénesis de NOR-1 redujo el desarrollo de aterosclerosis. (A) Imágenes representativas de la tinción O.R.O. en aortas expuestas *en face* de ratones WT y TgNOR-1^{CMLV} (Tg). Las líneas de puntos blancos representan la sectorización de la aorta en: arco aórtico, aorta torácica y aorta abdominal. (B) Análisis planimétrico de la cuantificación de la tinción O.R.O. en toda la aorta y en las regiones mencionadas. Los resultados se expresan como media±SEM (n= 16). *p<0,05: *vs.* WT-PCSK9^{D374Y}.

1.3.3.1.1. La transgénesis de NOR-1 no afecta al desarrollo de aterosclerosis a nivel de raíz aórtica

También analizamos la aterosclerosis en secciones de otros lechos vasculares. Primeramente, en cortes transversales de la raíz aórtica. Estos cortes mostraban la presencia de lesiones en ambos grupos experimentales, aunque no se observaron diferencias significativas en la extensión de la lesión entre ellos

Resultados

(Figura 39B). La cuantificación del contenido lipídico de estas lesiones mediante la tinción O.R.O. evidenció el mismo resultado (Figura 39C). Además, la tinción de von Kossa demostró que a nivel de raíz aórtica no se apreciaba calcificación en ningún caso (Figura 39A). Por lo tanto, no observamos ningún efecto de la sobreexpresión de NOR-1 en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas a nivel de raíz aórtica, región en la que en este modelo no se produce calcificación al tiempo estudiado.



1.3.3.1.2. NOR-1 reduce la lesión aterosclerótica y el infiltrado inflamatorio a nivel de arco aórtico

El segundo lecho vascular que analizamos fue el arco aórtico en cortes longitudinales. Este plano longitudinal nos permitió estudiar toda la lesión aterosclerótica presente en la curvatura del arco.

El análisis de la extensión de estas lesiones reveló que las placas ateroscleróticas de ratones TgNOR-1^{CMLV} eran significativamente más pequeñas que las lesiones de ratones WT lo que sugería que NOR-1 reducía o retrasaba su desarrollo (Figura 40A). Además, detectamos una disminución del infiltrado inflamatorio, en base a la tinción para el marcador de macrófagos CD68, en las lesiones de los ratones transgénicos (Figura 40 A y B). Asimismo, los niveles de expresión de ARNm de marcadores inflamatorios (*Il1β*, *Mcp1* e *Il-6*) en la aorta de los animales TgNOR-1^{CMLV} eran significativamente más bajos (Figura 41). De hecho, en los grupos que recibieron suero salino la expresión de la *Il-6* ya era inferior en aortas de ratones TgNOR-1^{CMLV} respecto los WT (Figura 41). Por lo

tanto, se evidenció un efecto antiinflamatorio claro de NOR-1 en el desarrollo de las placas ateroscleróticas.

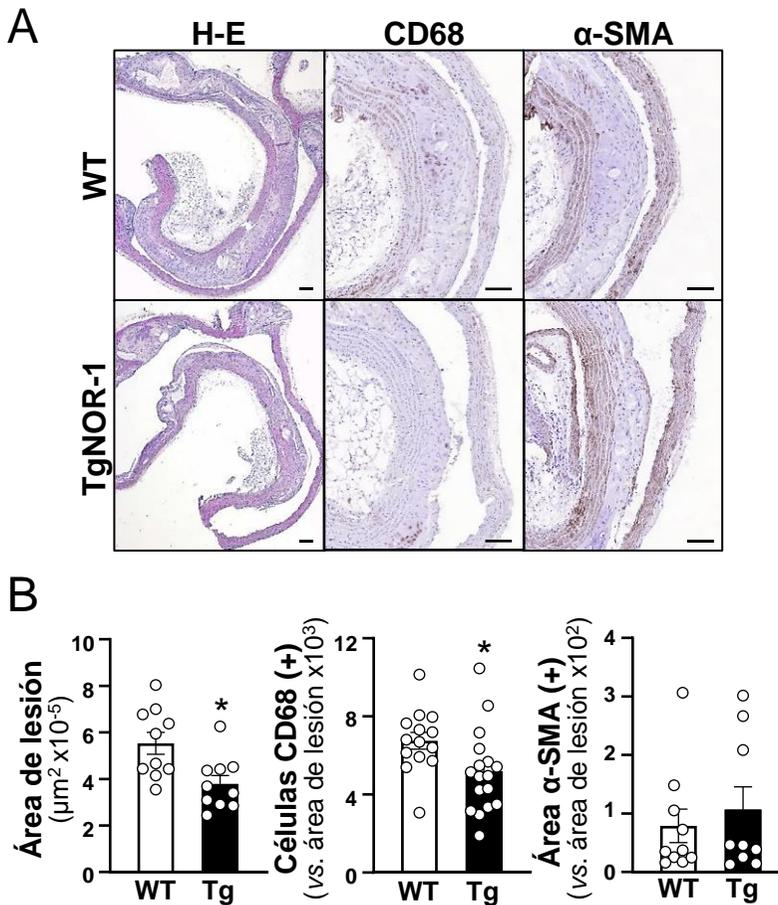


Figura 40. Análisis del área, el infiltrado inflamatorio y el contenido de CMLVs de lesiones ateroscleróticas del arco aórtico. (A) Imágenes representativas de la tinción hematoxilina-eosina (H-E) y de los análisis inmunohistoquímicos en el arco aórtico de animales WT y TgNOR-1^{CMLV} (Tg) para determinar el área de lesión (n= 10), contenido de macrófagos (CD68; WT [n= 14] y TgNOR-1 [n= 17]) y el área positiva para el marcador de CMLVs (α actina de músculo liso [α -SMA]; WT [n= 10] y TgNOR-1 [n= 9]). (B) Los gráficos de barras representan el análisis cuantitativo de las tinciones indicadas. Los resultados se expresan como media \pm SEM *p<0,05; vs. ratones WT transducidos con PCSK9^{D374Y}. Barras: 100 μ m.

También analizamos el contenido de CMLVs de estas lesiones. No observamos diferencias significativas en el contenido de CMLVs (área positiva para α -SMA) entre los dos grupos de los animales transducidos con AAV-PCSK9^{D374Y} (Figura 40B).

Resultados

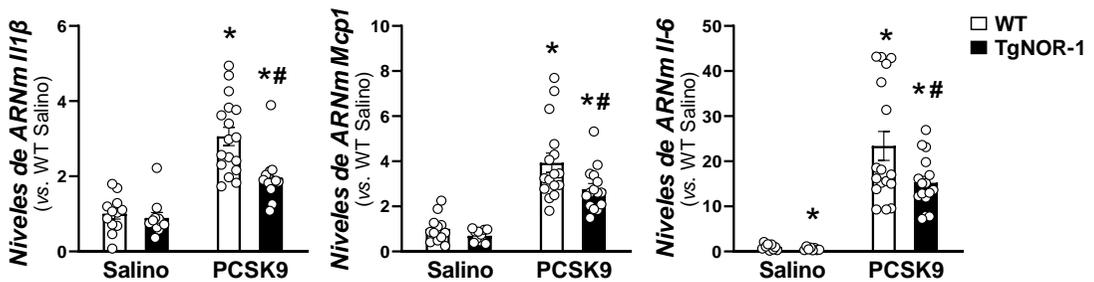


Figura 41. La transgénesis de NOR-1 atenuó la expresión de marcadores inflamatorios en la aorta aterosclerótica. Al final del experimento, se analizaron los niveles de ARNm de *Il1β*, *Mcp1* e *Il-6* mediante PCR a tiempo real en aortas de ratones WT y TgNOR-1^{CMLV} (TgNOR-1) transducidos con AAV-PCSK9^{D374Y} o con suero salino. Los resultados se expresan como media±SEM (salino n= 8-12; PCSK9 n= 12-17). p<0,05: *vs. ratones del grupo salino; # vs. ratones WT transducidos con AAV-PCSK9^{D374Y}.

1.3.3.1.3. NOR-1 redujo el tamaño de las lesiones ateroscleróticas de la arteria braquiocefálica y su infiltrado inflamatorio

Finalmente, caracterizamos las lesiones ateroscleróticas de la arteria braquiocefálica, principal ramificación del arco aórtico.

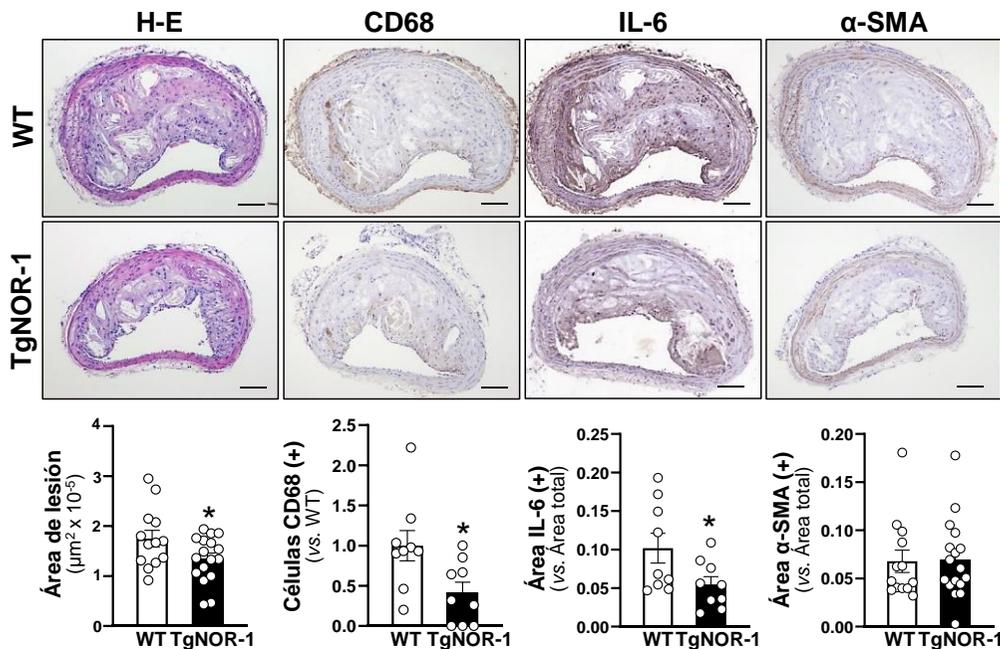


Figura 42. Impacto de la transgénesis de NOR-1 en la aterosclerosis de la arteria braquiocefálica. Las arterias braquiocefálicas se tiñeron con hematoxilina-eosina (H-E) (WT n= 13; TgNOR-1 n= 17) y se realizaron estudios inmunohistoquímicos para determinar el contenido de CD68 (n= 9), IL-6 (n= 9) y α-actina de músculo liso (α-SMA) (WT n= 13; TgNOR-1 n= 17). Los gráficos de barras

(paneles inferiores) representan los análisis cuantitativos de las tinciones indicadas. Los resultados se expresan como media \pm SEM * p <0,05: *vs.* ratones WT transducidos con PCSK9^{D374Y}. Barras: 100 μ m.

Como en el arco aórtico, las lesiones ateroscleróticas de la arteria braquiocefálica de los ratones TgNOR-1^{CMLV} mostraban una extensión significativamente menor que la de los ratones WT (Figura 42). Además, las lesiones de animales transgénicos tenían un menor infiltrado inflamatorio, menos células positivas para CD68 y menor expresión de IL-6 (Figura 42).

El análisis del contenido de CMLVs (área α -SMA positiva) de las lesiones reveló que la sobreexpresión de NOR-1 no afectó a este parámetro (Figura 42).

1.3.3.2. *NOR-1 reduce la calcificación asociada a la aterosclerosis*

Analizamos el efecto de la transgénesis de NOR-1 sobre la calcificación asociada a la aterosclerosis. Para ello, utilizamos una sonda fluorescente (OsteoSense™ 680EX), bifosfonato que se une con alta afinidad a los cristales de hidroxiapatita, y que administramos 24 horas antes del sacrificio. Se extrajo la aorta unida al corazón y se determinó la emisión de fluorescencia de la aorta *ex vivo* mediante NIRF. La señal fluorescente captada se correspondía con la presencia de cristales de fosfato cálcico y, preferentemente, en fases cristalinas (como hidroxiapatita) en la aorta de estos animales. Observamos que la mayor parte de la señal se localizaba en la zona del arco aórtico y, que, los ratones transgénicos presentaban una emisión de radiación significativamente inferior a los ratones WT (Figura 43).

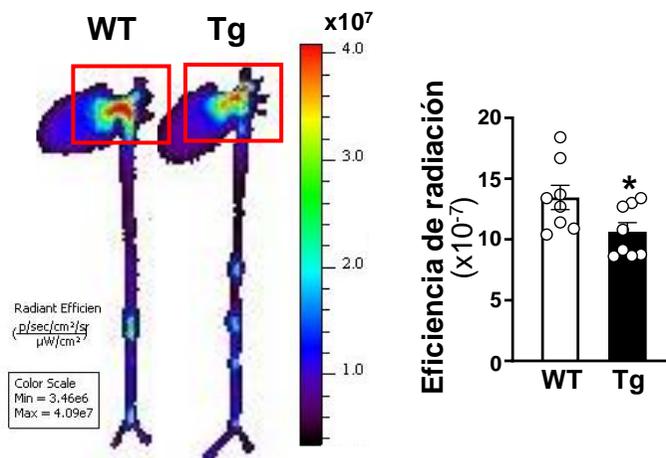


Figura 43. La transgénesis de NOR-1 redujo la calcificación de las lesiones ateroscleróticas de la aorta determinada mediante la sonda OsteoSense 680EX. Imágenes representativas de la señal NIRF en aortas de ratones WT y TgNOR-1^{CMLV} (Tg) a los que se había administrado el trazador de calcio OsteoSense™ 680 EX 24 horas antes del sacrificio. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n= 8). * p <0,05: *vs.* ratones WT.

Resultados

1.3.3.2.1. La transgénesis de NOR-1 reduce la mineralización de las placas ateroscleróticas del arco aórtico

Analizamos la calcificación de las lesiones ateroscleróticas mediante tinción de secciones de varios lechos vasculares. En primer lugar, analizamos la mineralización de las placas de los arcos aórticos mediante la tinción von Kossa y la tinción fluorescente OsteoSense 680 EX. Con ambas tinciones detectamos una disminución significativa de la deposición de calcio en las lesiones de los animales transgénicos respecto a los animales WT (Figura 44).

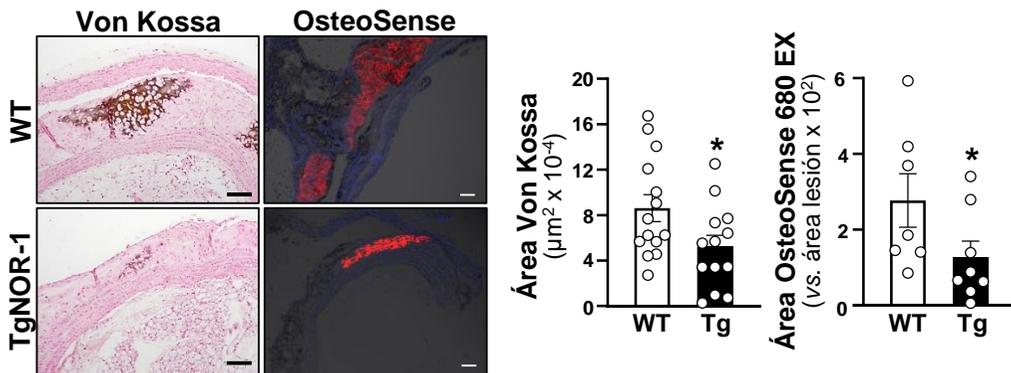


Figura 44. La transgénesis de NOR-1 redujo la calcificación de las lesiones ateroscleróticas en el arco aórtico. Imágenes representativas de la tinción von Kossa (WT n= 14; TgNOR-1 n= 13) y OsteoSense 680 EX (WT n= 7; TgNOR-1 n= 8) para determinar la calcificación de las lesiones del arco aórtico de ratones WT y TgNOR-1 transducidos con AAV-PCSK9^{D374Y}. Los gráficos de barras muestran el análisis cuantitativo de ambas tinciones. Los resultados se expresan como media \pm SEM. * $p < 0,05$: vs. ratones WT-PCSK9^{D374Y}. Barras: 100 μm .

Además, mediante inmunohistoquímicas analizamos los niveles de marcadores característicos de la calcificación en estas lesiones. Observamos menor expresión de los marcadores osteogénicos OPN y RUNX2 en las lesiones del arco aórtico de los animales transgénicos (Figura 45). También observamos que las placas de los animales transgénicos presentaban un menor contenido de glucosaminoglicanos, biomoléculas estructurales presentes en el tejido conectivo y óseo (teñido con azul alcian en la tinción de pentacrómico de Movat), así como menor entrecruzamiento de colágeno maduro (tinción de rojo sirio visualizada bajo luz polarizada) (Figura 45).

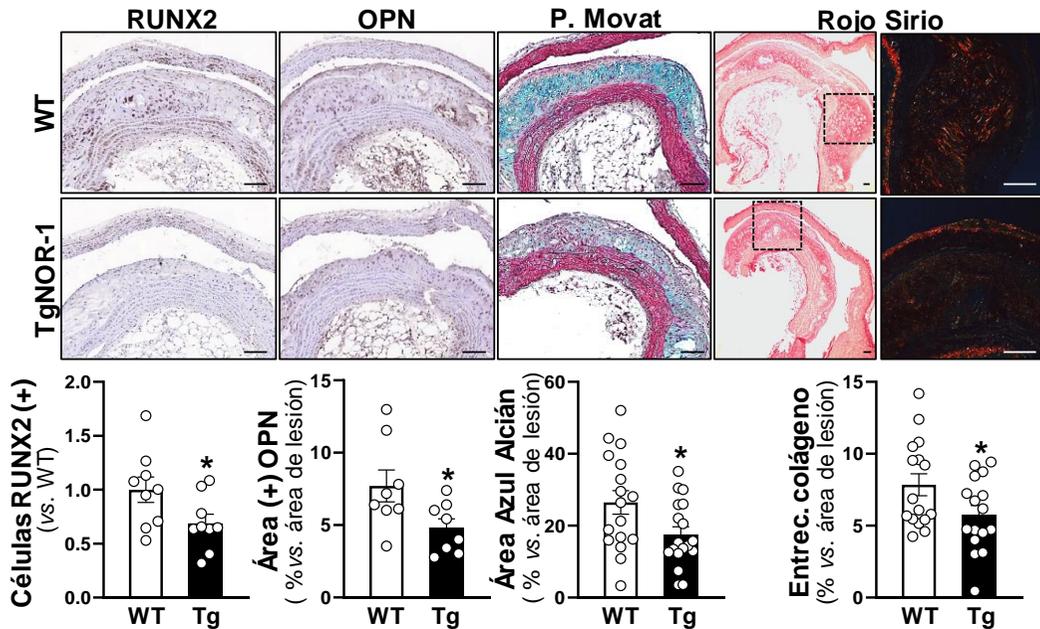


Figura 45. La transgénesis de NOR-1 disminuyó los niveles de los marcadores de calcificación, la presencia de glucosaminoglicanos y el entrecruzamiento de colágeno. Imágenes representativas de los análisis inmunohistoquímicos para RUNX2 (n= 9) y OPN (n= 8), y de las tinciones de pentacrómico de Movat (WT n= 17, TgNOR-1 n= 18) y de rojo sirio (n= 16) realizadas en las lesiones del arco aórtico. El rojo sirio se captó con luz visible (paneles de la izquierda) y con luz polarizada para estimar el grado de entrecruzamiento de las fibras de colágeno (paneles de la derecha). Los gráficos de barras de la parte inferior muestran los análisis cuantitativos de las tinciones descritas. Los resultados se expresan como media ± SEM. *p<0,05: vs. ratones WT. Barras: 100 µm.

El análisis de los niveles de ARNm y proteína por PCR a tiempo real y por *Western Blot*, respectivamente, reveló una inducción significativamente inferior del marcador de calcificación OPN en animales transgénicos respecto a los ratones WT transducidos con AAV-PCSK9^{D374Y} (Figura 46), lo que era coherente con los resultados de los análisis inmunohistoquímicos.

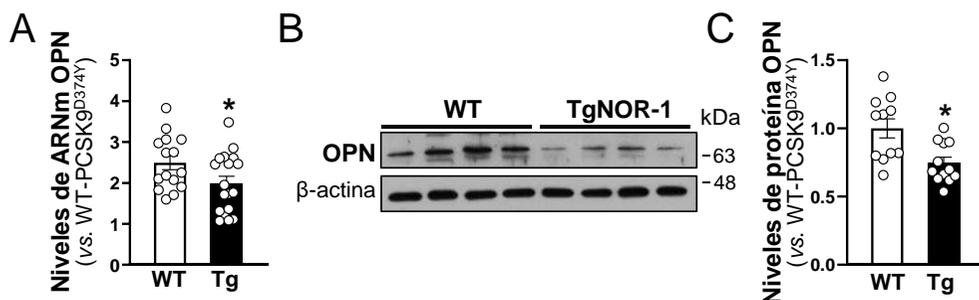


Figura 46. Análisis de la expresión de la osteopontina (OPN) en ratones transducidos con AAV-PCSK9^{D374Y}. (A-C) Niveles de expresión de la OPN en aortas de ratones WT y TgNOR-1^{CMLV} (Tg)

Resultados

determinados mediante PCR a tiempo real (ARNm; WT n= 15; Tg n= 18) (A) y *Western Blot* (Proteína; WT n= 11; Tg n= 12) (B y C). (B) Imágenes representativas de *Western Blot*. Los niveles de β -actina se muestran como control de carga. Los resultados se expresan como media \pm SEM. * $p < 0,05$: vs. ratones WT-PCSK9^{D374Y}.

1.3.3.2.2. NOR-1 disminuye la calcificación de las lesiones ateroscleróticas de las arterias braquiocefálicas

Aunque la incidencia de la calcificación en la arteria braquiocefálica fue muy baja, observamos menor incidencia de calcificación en el grupo de animales transgénicos (10%) respecto a los WT (20%) (Figura 47). Además, el análisis de la extensión de la mineralización (mediante tinción de von Kossa y Osteosense 680 EX) de las arterias braquiocefálicas calcificadas puso de manifiesto que en las arterias de los animales transgénicos la extensión de la mineralización también era significativamente menor que en las de los ratones WT (Figura 47).

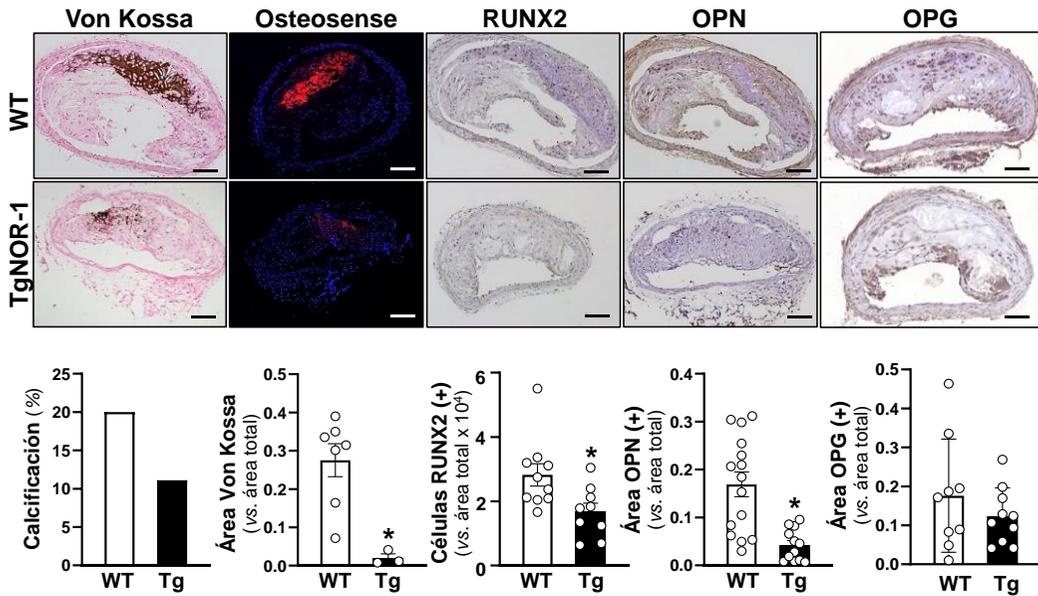


Figura 47. Efecto de la sobreexpresión de NOR-1 sobre la calcificación de la arteria braquiocefálica. Se analizó la incidencia de calcificación y su extensión con la tinción de von Kossa y OsteoSense 680 EX (WT n= 7; TgNOR-1 n= 3). Se determinaron las células positivas para RUNX2 (WT n= 10; TgNOR-1 n= 9) y el área positiva para OPN (WT n= 15, TgNOR-1 n= 12) y OPG (WT n= 9; TgNOR-1 n= 10). Los gráficos de barras muestran los análisis cuantitativos. Barra: 100 μ m. Los resultados se expresan como media \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. WT-PCSK9^{D374Y}.

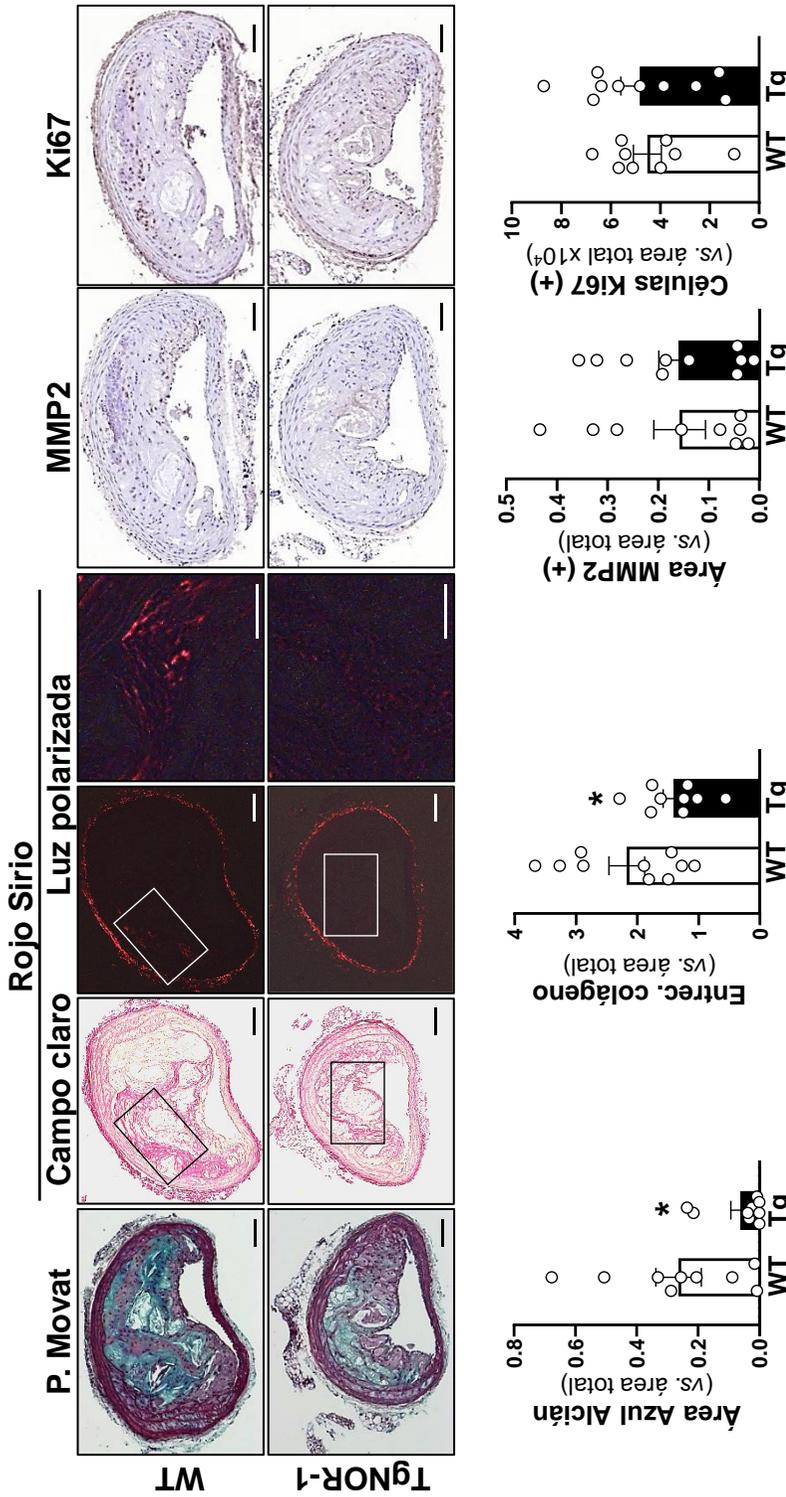


Figura 48. Análisis de los componentes de la MEX de las arterias braquiocefálicas. Imágenes representativas de la tinción de pentacrómico de Movat, rojo sirio y de los análisis inmunohistoquímicos para MMP2 y Ki67. Los gráficos de barras muestran los análisis cuantitativos de: el área de glucosaminoglicanos que corresponde al área azul en el pentacrómico de Movat (n= 9), el entrecruzamiento de colágeno (WT n= 10; TgNOR-1 n= 9), el nivel de la MMP2 (WT n= 9; TgNOR-1 n= 10) y el marcador de proliferación Ki67 (WT n= 9; TgNOR-1 n= 10). Barra: 100 μ m. Los resultados se expresan como media \pm SEM. * p <0,05; vs. WT-PCSK9^{D374Y}.

Resultados

Para analizar en mayor profundidad el proceso de calcificación en estas lesiones, realizamos análisis inmunohistoquímicos que revelaron una disminución significativa de los marcadores de calcificación RUNX2 y OPN entre ambos grupos experimentales (Figura 47). Sin embargo, no detectamos diferencias en la expresión del marcador de calcificación osteoprotegerina (OPG) (Figura 47).

Finalmente, para caracterizar las propiedades de la MEX de las placas ateroscleróticas realizamos las tinciones de pentacrómico de Movat y rojo sirio, que evidenciaron menor contenido de glucosaminoglicanos y menor grado de entrecruzamiento de colágeno en las arterias braquiocefálicas de los animales transgénicos (Figura 48). En cambio, no detectamos cambios significativos en la expresión de la metaloproteína 2 (MMP2), enzima implicada en el remodelado de la MEX, ni en el marcador de proliferación celular Ki67 (Figura 48).

1.3.3.2.3. La transgénesis de NOR-1 no afecta a los niveles plasmáticos de los marcadores de calcificación

Analizamos los niveles circulantes de marcadores de calcificación en animales TgNOR-1^{CMLV} y WT antes de iniciar el experimento y 20 semanas después de la inyección de adenovirus y dieta aterogénica. A tiempo final observamos una disminución similar de los niveles circulantes del inhibidor de la calcificación DKK-1 y un incremento de los mediadores procalcificantes OPG y fosfato en ambos grupos experimentales (Figura 49). Los niveles plasmáticos de calcio permanecieron invariables en los dos grupos (WT y TgNOR-1^{CMLV}) respecto a los valores en condiciones basales (Figura 49).

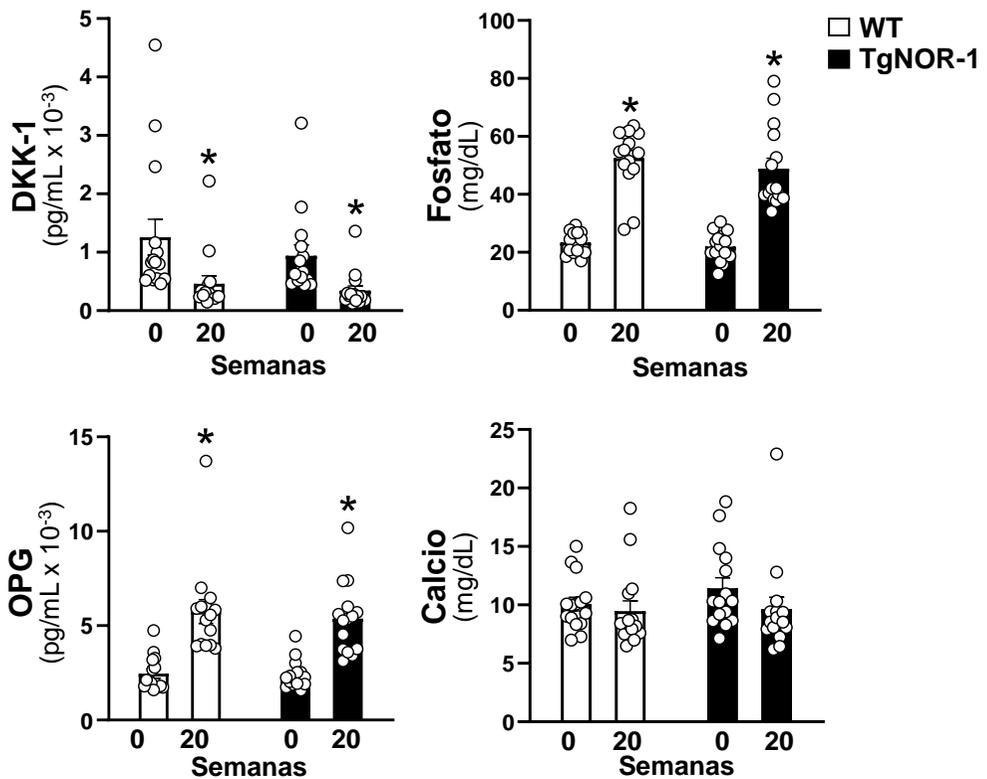


Figura 49. Parámetros circulantes relacionados con el metabolismo mineral en los animales a los que se indujo aterosclerosis. Niveles plasmáticos de DKK-1, fosfato, osteoprogerina (OPG) y calcio de ratones WT (barras blancas) y ratones transgénicos para NOR-1 (TgNOR-1; barras negras) a nivel basal y 20 semanas después de la inducción osteogénica. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n= 15). *p<0,05: vs. ratones del mismo genotipo a t=0.

1.3.3.2.4. *La transgénesis de NOR-1 no afecta a los niveles de la enzima LOX implicada en la maduración de matriz en las lesiones ateroscleróticas*

Nuestro grupo había descrito la participación de la enzima LOX en la transdiferenciación osteoblástica de CMLVs humanas y murinas en cultivo (233). La LOX es una enzima que cataliza el entrecruzamiento de las fibras de colágeno y elastina que resulta fundamental para la maduración de la MEX ya que determina sus propiedades estructurales y biomecánicas (183). Los hallazgos descritos en las lesiones ateroscleróticas de ratones TgNOR-1^{CMLV} evidencian un menor grado entrecruzamiento de las fibras de colágeno por lo que decidimos analizar los niveles de LOX en las lesiones de ratones WT y TgNOR-1^{CMLV}.

Analizamos los niveles de ARNm de *Lox* en las aortas de ambos grupos mediante PCR a tiempo real. El análisis no evidenció diferencias significativas en los niveles de *Lox* entre WT y TgNOR-1^{CMLV} transducidos con AAV-PCSK9^{D374Y}

Resultados

(Figura 50A). Los análisis inmunohistoquímicos para LOX tampoco detectaron diferencias en el contenido de LOX en el arco aórtico y en la arteria braquiocefálica de ambos genotipos (Figura 50B).

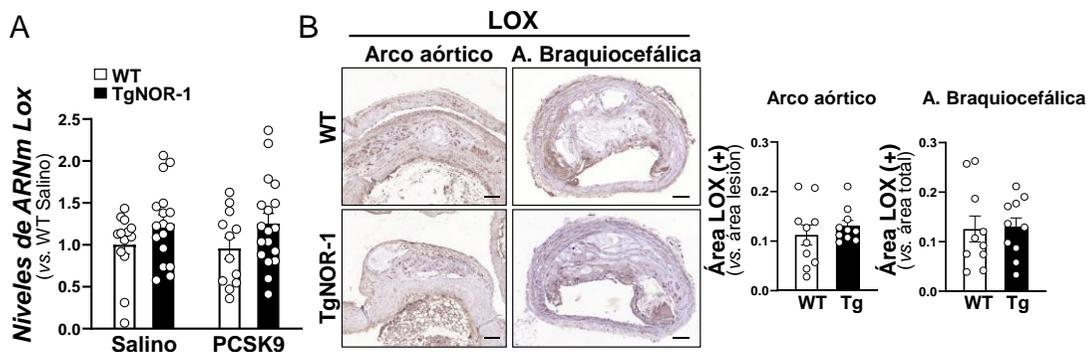


Figura 50. La transgénesis de NOR-1 no afecta a los niveles de LOX en las lesiones ateroscleróticas. (A) Niveles de expresión de *Lox* en aortas de ratones WT y TgNOR-1^{CMLV} determinados mediante PCR a tiempo real (salino n= 12-13; AAV-PCSK9^{D374Y} n= 17-18). (B) Imágenes representativas y cuantificación de área positiva para LOX en los análisis inmunohistoquímicos en secciones longitudinales de arco aórtico (n= 10) y en cortes de arteria braquiocefálica (n= 10). Los resultados se expresan como media±SEM. Barras: 100 μ m.

2. Análisis de los mecanismos que vinculan a la LOX con la aterosclerosis y la calcificación cardiovascular

Nuestro grupo describió la implicación de la enzima LOX en el proceso de transdiferenciación osteoblástica de CMLVs humanas y murinas en cultivo (233). Esta enzima se inducía en presencia de estímulos procalcificantes y en experimentos de ganancia o pérdida de su función, se favorecía o bien se retrasaba la mineralización de las CMLVs, respectivamente. Además, se documentó la presencia de LOX en arterias femorales humanas calcificadas y la correlación de LOX con el grado de calcificación de estas lesiones (233).

Por ello nos propusimos estudiar en más detalle el papel de esta enzima en la calcificación cardiovascular. Para ello, analizamos la expresión de la LOX en válvulas humanas calcificadas, estudiamos la dependencia de la calcificación de la actividad LOX extracelular en células en cultivo y, finalmente, caracterizamos la calcificación asociada a la aterosclerosis en un modelo de ratón que sobreexpresaba LOX en las CMLVs.

2.1. La LOX y otras isoenzimas están inducidas en válvulas y arterias humanas calcificadas

Nuestro grupo ya había reportado un aumento de la expresión de LOX en arterias femorales humanas calcificadas. Realizamos un análisis más exhaustivo de la expresión de LOX en válvulas aórticas humanas calcificadas de dos cohortes de pacientes y en arterias coronarias y femorales humanas calcificadas.

2.1.1. La expresión de LOX está aumentada en válvulas humanas calcificadas

Analizamos la expresión de LOX y otras isoformas de la familia LOX en válvulas aórticas calcificadas y válvulas control de una cohorte de pacientes del Hospital Universitario de Navarra. Esta cohorte estaba formada por dos grupos de estudio: válvulas sanas o control que provenían de autopsias y no presentaban calcificación (edad media 76 ± 10) y válvulas calcificadas obtenidas de cirugías de reemplazo valvular en el Hospital Universitario de Navarra, cuyas características clínicas se describen en la Tabla 15. Se trata de una cohorte de 31 pacientes con una media de edad avanzada (69 ± 12) y la mayoría de ellos hipertensos.

Resultados

Tabla 15. Variables clínicas de los pacientes con válvulas aórticas calcificadas de la cohorte de pacientes del Hospital Universitario de Navarra.

Variables	Total
n	31
Edad (media±SD)	69,3 ± 12,6
Hombre, n (%)	23 (74%)
Altura (media±SD)	164,8 ± 8,3
Peso (media±SD)	74,2 ± 15
Superficie corporal (media±SD)	1,8 ± 0,2
DM, n (%)	5 (16%)
HTA, n (%)	20 (64,5%)
Fármacos	
ACEI, n (%)	5 (16%)
ARB, n (%)	6 (19%)
Diuréticos, n (%)	21 (59%)
B-bloqueantes, n (%)	7 (22%)
Estatinas, n (%)	21 (68%)
Parámetros ecocardiográficos	
Gradiente Pico máximo (media±SD)	80,5 ± 22
Gradiente medio (media±SD)	52,2 ± 14,6
EF% (media±SD)	64,7 ± 16,6

SD: desviación estándar; DM: Diabetes mellitus; HTA: Hipertensión arterial; ACEI: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARB: bloqueadores de los receptores de angiotensina II; EF: Fracción de eyección.

Se analizaron los niveles de ARNm de LOX y las demás isoenzimas de la familia LOX. El resultado evidenció que la LOX y las 4 isoenzimas LOXL estaban inducidas en las válvulas calcificadas respecto a las válvulas control (Figura 51). Cabe destacar que el enzima cuya expresión estaba aumentada en mayor medida fue la LOX que también era la que se más expresaba en las válvulas sanas (Figura 51).

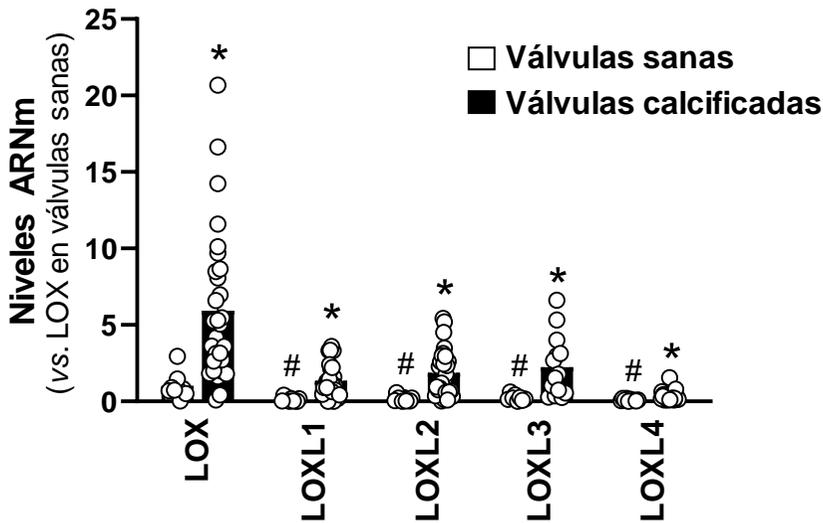


Figura 51. Niveles de expresión de ARNm de LOX y de las isoenzimas de esta familia LOX en válvulas sanas y calcificadas de la cohorte del Hospital Universitario de Navarra. Niveles de ARNm de LOX y LOXL1-4 en válvulas sanas (n= 10) y calcificadas (n= 14-31) analizados mediante PCR a tiempo real. Los resultados se expresan como media \pm SEM. $p < 0,05$: *vs. válvulas sanas, # vs. expresión LOX en válvulas sanas.

En las válvulas calcificadas pudimos identificar 3 regiones: una región poco calcificada, una región con calcificación moderada y una región muy calcificada. Los niveles de LOX estaban aumentados sobre todo en la región muy calcificada (Figura 52). En cambio, con las demás isoformas no observamos diferencias significativas entre estas tres zonas (Figura 52).

Con estos resultados observados nos propusimos analizar únicamente la expresión de la isoenzima LOX en muestras de válvulas aórticas humanas calcificadas de una segunda cohorte de pacientes intervenidos en el servicio de cirugía cardíaca del HSCSP. Se recogieron válvulas (n= 77) que se clasificaron dependiendo de su grado de calcificación en PC y MC (Figura 18). Las características de esta cohorte están descritas en el apartado 1.1.1. de esta misma sección (Tabla 14). Las variables clínicas del grupo de válvulas MC de esta cohorte son muy similares a las características clínicas de las válvulas calcificadas de la cohorte del Hospital Universitario de Navarra (Tabla 15) ya que la mayoría de los pacientes son hipertensos y los valores de los parámetros ecocardiográficos relativos a la función valvular están igualmente elevados respecto a los del grupo de válvulas MC (Tabla 14). No se aprecian diferencias notables en la altura, el género, el peso, la diabetes *mellitus* o el tratamiento farmacológico entre las dos cohortes.

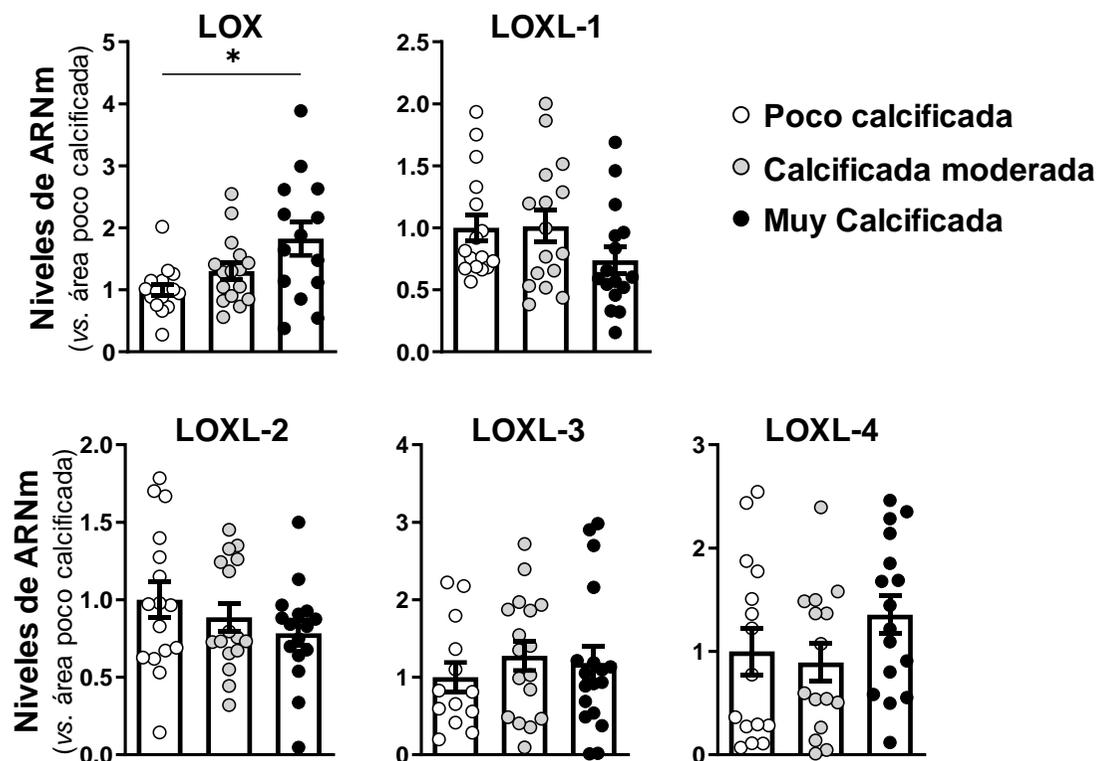


Figura 52. Niveles de expresión de LOX y las demás isoformas de la familia LOX en la región poco, moderada y muy calcificada de las válvulas aórticas humanas. Los niveles de ARNm se analizaron mediante PCR a tiempo real (n= 13-16). Los resultados se muestran como media \pm SEM. * $p < 0,05$: vs. región poco calcificada.

El análisis de los niveles de ARNm reveló un incremento significativo de la expresión de LOX en el grupo de válvulas MC respecto a las válvulas PC (Figura 53A). También se observó un incremento significativo de los niveles de expresión de los marcadores de calcificación RUNX2 y OPN en las válvulas MC (Figura 53A). El análisis por *Western Blot* mostró un resultado muy similar ya que se observó un aumento de los niveles de LOX, RUNX2 y OPN en las válvulas MC (Figura 53B).

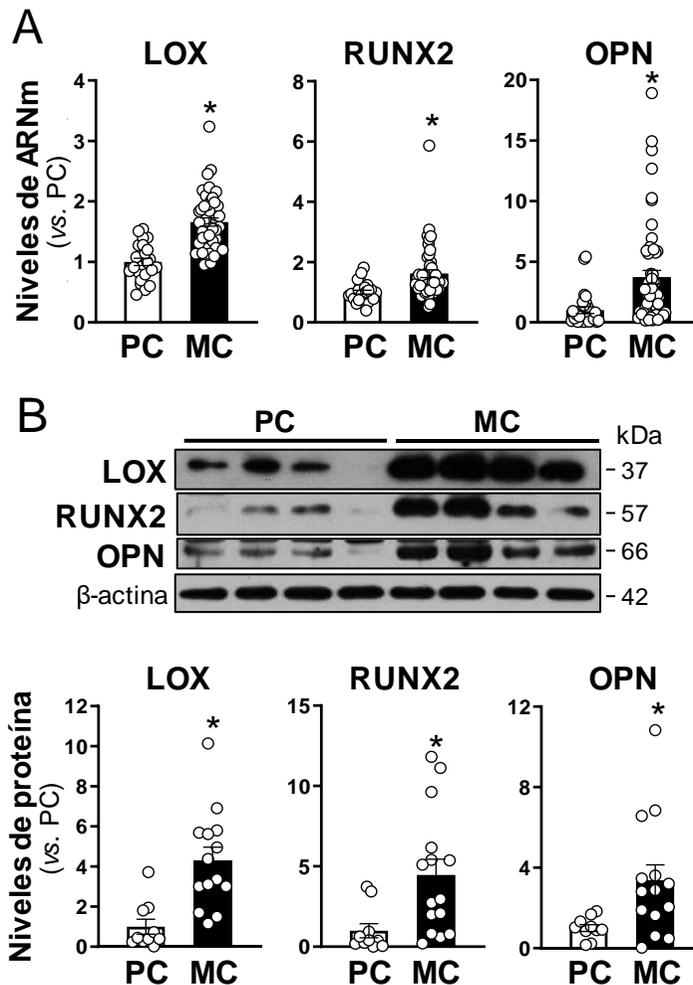


Figura 53. Expresión de LOX en válvulas humanas calcificadas. (A) Niveles de ARNm de LOX, RUNX2 y osteopontina (OPN) en válvulas poco calcificadas (PC, n= 26) y muy calcificadas (MC, n= 47-55) analizados mediante PCR a tiempo real. Los resultados se expresan como media \pm SEM * $p < 0,0001$: vs. PC. (B) Imágenes representativas de *Western Blot* que muestran los niveles de LOX, RUNX2 y OPN y las gráficas del resultado de su cuantificación densitométrica. Se muestran también los niveles de β -actina como control de carga. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n= 10-15). * $p < 0,05$ vs. PC.

Los análisis inmunohistoquímicos en válvulas MC mostraron expresión de LOX próxima a las zonas de calcificación (tinción de von Kossa) colocalizando con células positivas para RUNX2 y vimentina (células VICs) (Figura 54). En cambio, en las válvulas PC, tanto LOX como RUNX2 fueron prácticamente indetectables (Figura 54).

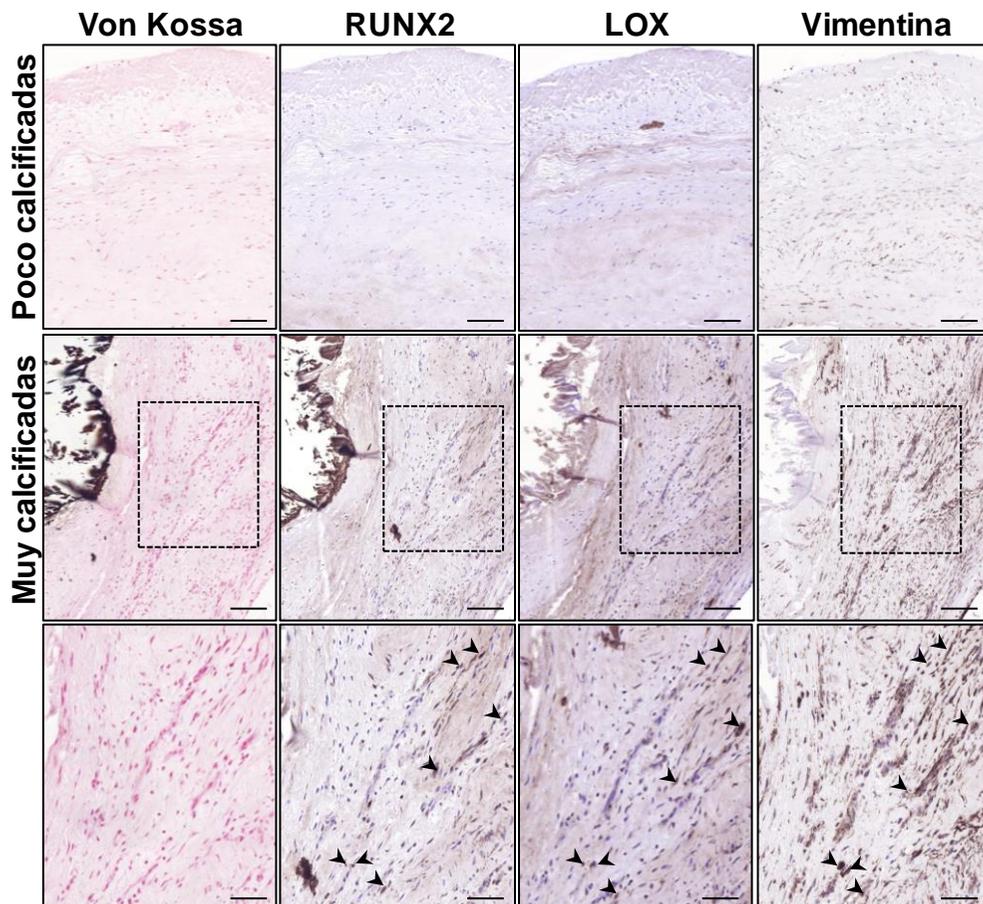


Figura 54. Expresión de LOX en áreas calcificadas de válvulas aórticas humanas. Imágenes representativas de la tinción von Kossa y los análisis inmunohistoquímicos para LOX, RUNX2 y vimentina en válvulas aórticas humanas poco (panel superior) y muy calcificadas (panel central e inferior). Los paneles inferiores corresponden a la magnificación de las áreas indicadas en los paneles centrales. Las flechas negras indican células positivas para LOX, RUNX2 y vimentina en secciones consecutivas. Barras: 100 μm (panel superior y central) y 50 μm (panel inferior).

La mayor actividad LOX se relaciona de manera directa con el estrés oxidativo ya que uno de los productos de la reacción que cataliza es el H_2O_2 . Por ello, analizamos el estrés oxidativo en las válvulas con diferente grado de calcificación. La tinción con DHE de válvulas PC y MC evidenció que las válvulas MC presentaban niveles más altos del anión superóxido que las PC (Figura 55). Por tanto, un mayor grado de calcificación parece estar relacionado con mayor expresión de LOX y mayor estrés oxidativo.

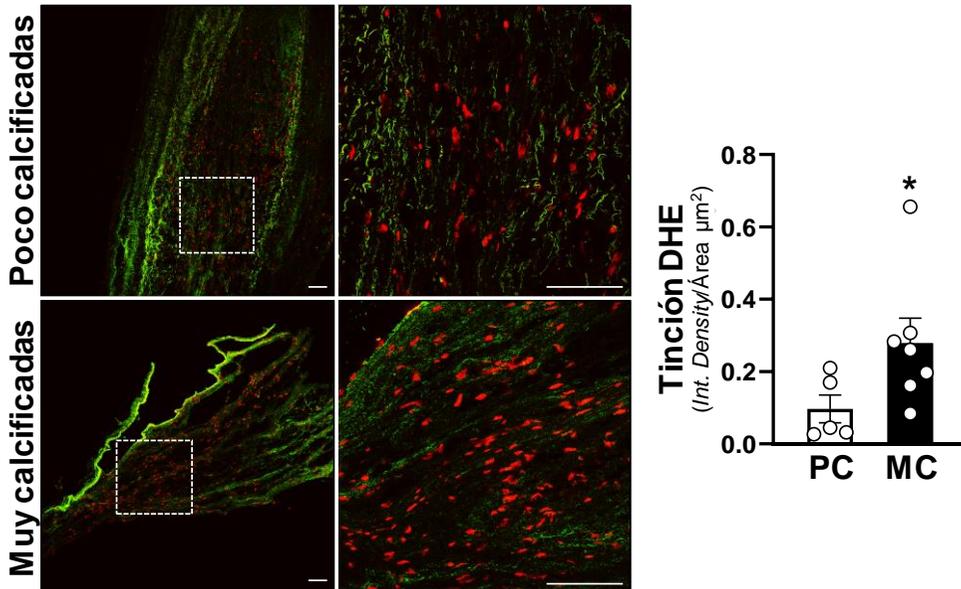


Figura 55. Niveles de anión superóxido en las válvulas calcificadas. Imágenes representativas de la tinción DHE en válvulas poco (paneles superiores) y muy calcificadas (paneles inferiores) obtenidas mediante microscopia confocal. Los paneles de la derecha representan imágenes magnificadas de las áreas indicadas en los paneles de la izquierda. El gráfico de barras muestra la cuantificación utilizando el parámetro *integrity density* de la tinción. Barras: 100 μm . Los resultados se expresan como media \pm SEM. (PC n= 5; MC n= 7). * $p < 0,05$ vs. PC.

2.1.2. Mayor expresión de LOX en arterias ateroscleróticas humanas

Analizamos la expresión de la LOX en cortes consecutivos de arterias femorales humanas con aterosclerosis y calcificación. Observamos mayor expresión de esta enzima en las regiones próximas a la calcificación (Figura 56A). El marcaje de LOX colocalizaba con células positivas para RUNX2 y α -SMA (Figura 56A).

Paralelamente, analizamos LOX en arterias coronarias humanas con aterosclerosis y calcificación. Obtuvimos resultados muy similares a los observados en la arteria femoral ya que detectamos LOX en zonas próximas a la calcificación donde colocalizó con marcaje positivo para RUNX2 y α -SMA (Figura 56B).

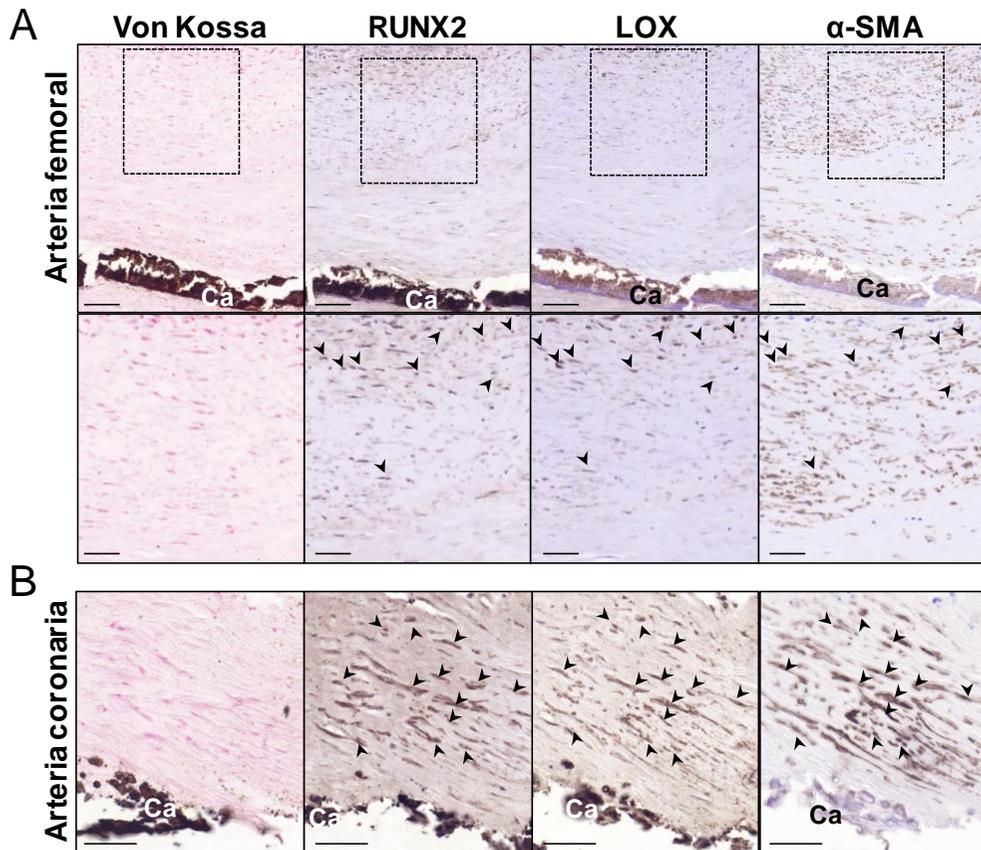


Figura 56. Expresión de LOX y RUNX2 en arterias humanas calcificadas. Imágenes representativas de la tinción von Kossa y análisis inmunohistoquímicos para RUNX2, LOX y α -actina de musculo liso (α -SMA) en arterias humanas: femoral (A) y arterias coronarias (B). Las flechas negras indican células con marcaje positivo para RUNX2, LOX y α -SMA en cortes consecutivos. Barras: 100 μ m (A) y 50 μ m (B).

2.2. Efecto de la maduración de la MEX dependiente de la actividad LOX en la calcificación ectópica

Quisimos analizar el papel de la LOX en la calcificación de VICs en cultivo y, en particular, su impacto en la maduración de la MEX como proceso clave en la mineralización.

2.2.1. La LOX se induce y aumenta la deposición de colágeno I en la calcificación de VICs en cultivo

Estudios previos de nuestro grupo evidenciaron que la sobreexpresión o el silenciamiento de LOX afectaba a la calcificación de las CMLVs en cultivo (233).

Indujimos calcificación en VICs en cultivo para determinar si el proceso observado en CMLVs podía hacerse extensivo a estas células. La exposición a

medio OM indujo la mineralización de la MEX (Figura 57A), incrementó la actividad TNAP (Figura 57B) y aumentó la deposición y la organización de colágeno I de la MEX (Figura 57C).

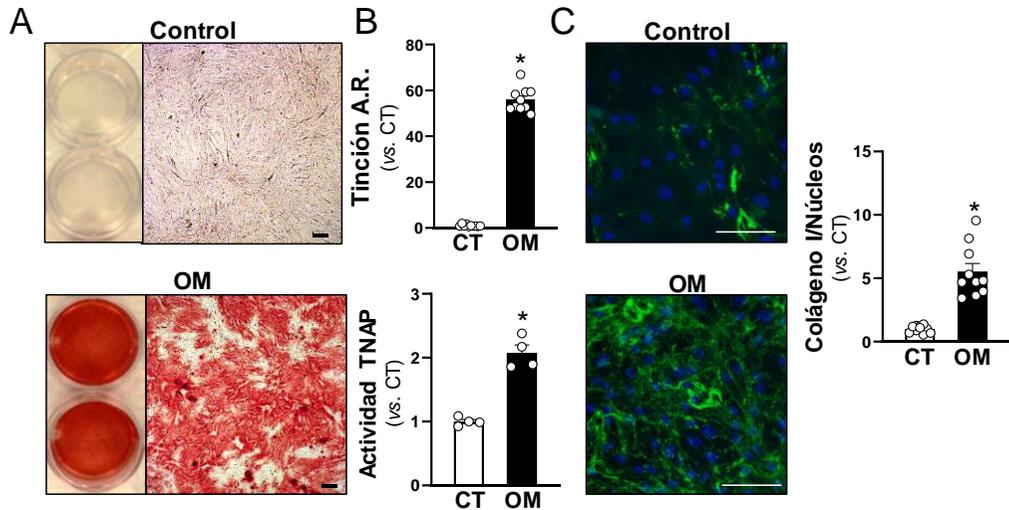


Figura 57. El medio osteogénico indujo la calcificación, aumentó la actividad TNAP y la deposición de colágeno I de las VICs. VICs humanas se cultivaron en medio control (CT, barras blancas) o medio osteogénico (OM, barras negras). (A) Imágenes representativas de la tinción rojo de alizarina en VICs a los 14 días de la inducción osteogénica. Barras: 100 μ m. (B) El gráfico de barras del panel superior representa la cuantificación del marcaje positivo de la tinción rojo de alizarina en condiciones CT y OM. El gráfico de barras del panel inferior corresponde al análisis de la actividad fosfatasa alcalina inespecífica de tejido (TNAP). Los resultados se expresan como media \pm SEM (tinción A.R. n= 10 y actividad TNAP n= 4). * p <0,05 vs. CT. (C) Imágenes representativas del análisis inmunocitoquímico de la deposición de colágeno I en VICs expuestas a medio CT y OM durante 10 días. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n= 10). * p <0,01 vs. CT.

El análisis de los niveles de proteína por *Western Blot* en VICs cultivadas en condiciones osteogénicas reveló un incremento significativo de la expresión de los marcadores de calcificación RUNX2 y OPN (Figura 58A). Asimismo, detectamos un aumento de la secreción de LOX al medio extracelular en las células expuestas a medio OM (Figura 58 A y B).

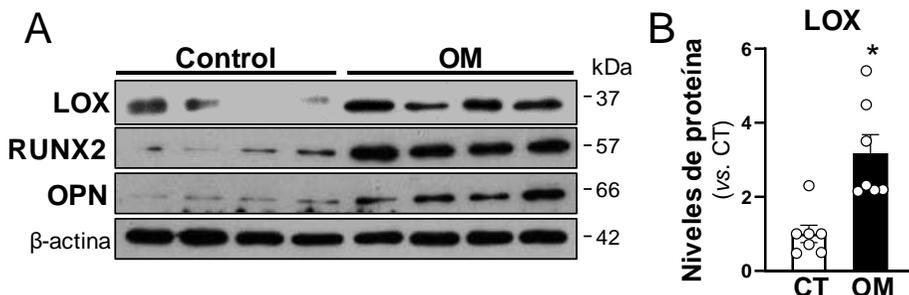


Figura 58. Aumento en la secreción de la LOX al inducir la calcificación en las VICs. (A) Imágenes representativas de los niveles de RUNX2 y OPN a nivel intracelular y LOX evaluada en el

Resultados

sobrenadante de estas células mediante *Western Blot*. (B) El gráfico de barras muestra la cuantificación densitométrica de los niveles de proteína LOX secretados al espacio extracelular de VICs cultivadas en medio CT (barras blancas) y OM (barras negras). Los niveles de β -actina se muestran como control de carga. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=7). * $p < 0,05$ vs. CT.

2.2.2. La inhibición de la actividad LOX reduce la calcificación de las VICs

Para profundizar en el estudio del papel de LOX en la calcificación de las VICs, inhibimos su actividad enzimática de manera irreversible utilizando BAPN. El tratamiento con BAPN atenuó significativamente la deposición de colágeno I y disminuyó la mineralización de la MEX en VICs expuestas a medio OM (Figura 59A y B).

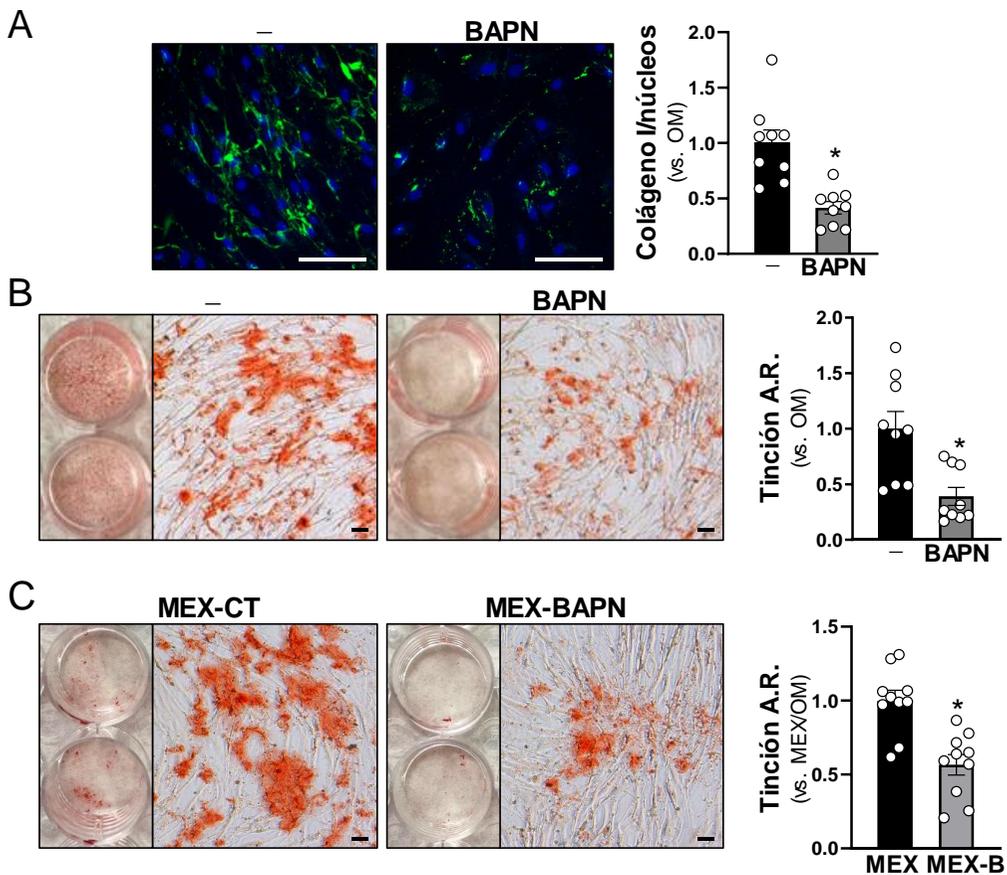


Figura 59. La inhibición de la LOX con BAPN redujo significativamente la calcificación de las VICs. Las VICs se cultivaron en medio OM en ausencia (barras negras) o presencia (barras grises) de 0,5 mM de BAPN (β -aminopropionitrilo; inhibidor de la actividad LOX). (A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia que muestra la deposición de colágeno I al cabo de 10 días. El gráfico de barras muestra el análisis cuantitativo de la inmunofluorescencia. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=9). * $p < 0,05$ vs. OM. (B) Imágenes representativas de la tinción rojo de alizarina durante 14 días. El gráfico de barras muestra el análisis cuantitativo de la tinción rojo de alizarina (A.R.). Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=9). * $p < 0,05$ vs. OM. (C)

Imágenes representativas de la tinción rojo de alizarina en VICs sembradas sobre la MEX de células tratadas (MEX-BAPN) o no (MEX-CT) con BAPN y posteriormente cultivadas en medio OM. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n= 10). * $p < 0,05$ vs. MEX. Barras: 100 μ m.

A continuación, sembramos VICs sobre matrices generadas por células tratadas o no con BAPN e indujimos calcificación. El resultado evidenció que las células sembradas sobre la MEX generada por células tratadas con BAPN y, por lo tanto, menos entrecruzada, calcificaban significativamente menos que las sembradas sobre una MEX control (Figura 59C). Estos resultados sugieren un papel clave del procesamiento de la MEX por LOX que actúa como sustrato favoreciendo el inicio y la propagación de la mineralización.

2.2.3. La sobreexpresión de LOX exagera la calcificación de las VICs

Para confirmar los resultados del apartado anterior, realizamos la estrategia contraria de manera que sobreexpresamos lentiviralmente la LOX en VICs a las que indujimos calcificación. En primer lugar, mediante PCR a tiempo real confirmamos la sobreexpresión de LOX que se indujo de forma muy significativa y aumentó su secreción al espacio extracelular en las VICs transducidas con pLVX/hLOX (Figura 60).

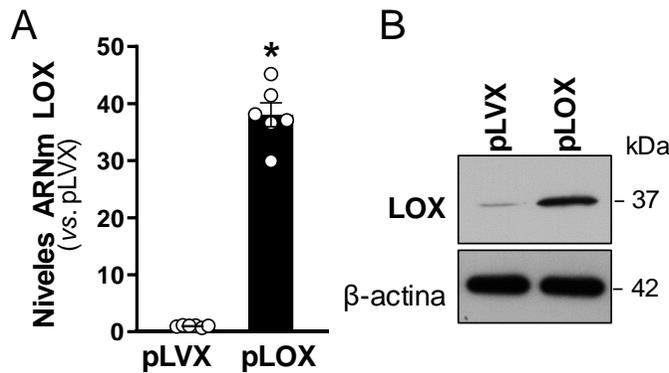


Figura 60. Expresión de LOX en VICs transducidas lentiviralmente. (A) Se analizaron los niveles de ARNm de LOX en VICs humanas transducidas con el vector pLVX/LOX (pLOX) o con el vector control (pLVX). Los resultados se expresan como media \pm SEM (n= 6). * $p < 0,001$: vs. VICs transducidas con pLVX. (B) Imágenes representativas de *Western Blot* que muestran los niveles de LOX en el medio de cultivo de las células transducidas con pLVX y pLOX.

La sobreexpresión de LOX potenció la maduración de la MEX tal y como evidenció la mayor deposición de colágeno I y la mayor organización de sus fibrillas, y exacerbó la calcificación de las VICs expuestas a medio osteogénico (Figura 61A y B).

Análogamente, generamos matrices producidas por células que sobreexpresaban LOX (transducidas con pLVX/LOX) o células control (transducidas con pLVX) y sembramos VICs sobre esta MEX que expusimos a

Resultados

medio de calcificación. La MEX de células que sobreexpresaban LOX, más madura y entrecruzada, favoreció la calcificación (Figura 62A).

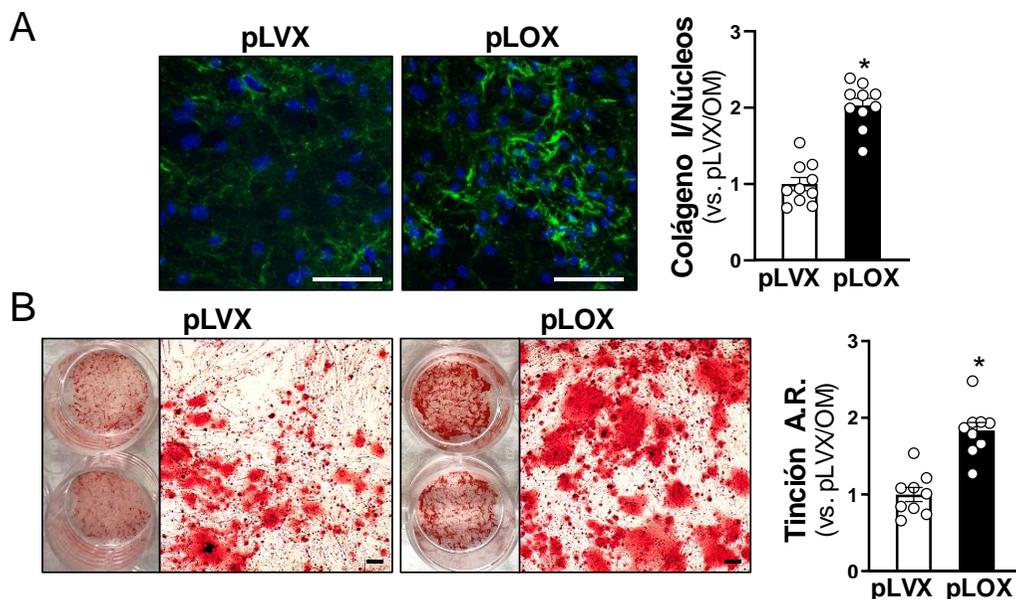


Figura 61. La sobreexpresión de LOX potenció la calcificación de las VICs. Las VICs humanas se transdujeron con lentivirus pLVX (vector vacío) y pLVX-LOX (pLOX) y se cultivaron en condiciones osteogénicas. (A) Imágenes representativas de la deposición de colágeno I mediante inmunofluorescencia (n= 10) al cabo de 10 días. (B) Imágenes representativas de la tinción rojo de alizarina (A.R.) en células cultivadas durante 10 días en medio osteogénico (n= 9). Los resultados se expresan como media \pm SEM. * $p < 0,001$: vs. pLVX. Barras: 100 μ m.

Finalmente, recogimos sobrenadantes enriquecidos en LOX generados por células que sobreexpresaban esta enzima o bien sobrenadantes control de células transducidas con pLVX. Al inducir calcificación con la suplementación (33,33%) de uno u otro medio condicionado observamos que el medio con elevado contenido en LOX exacerbaba la deposición de calcio (Figura 62B). Por lo tanto, se evidenció que la actividad LOX potencia la calcificación de la MEX.

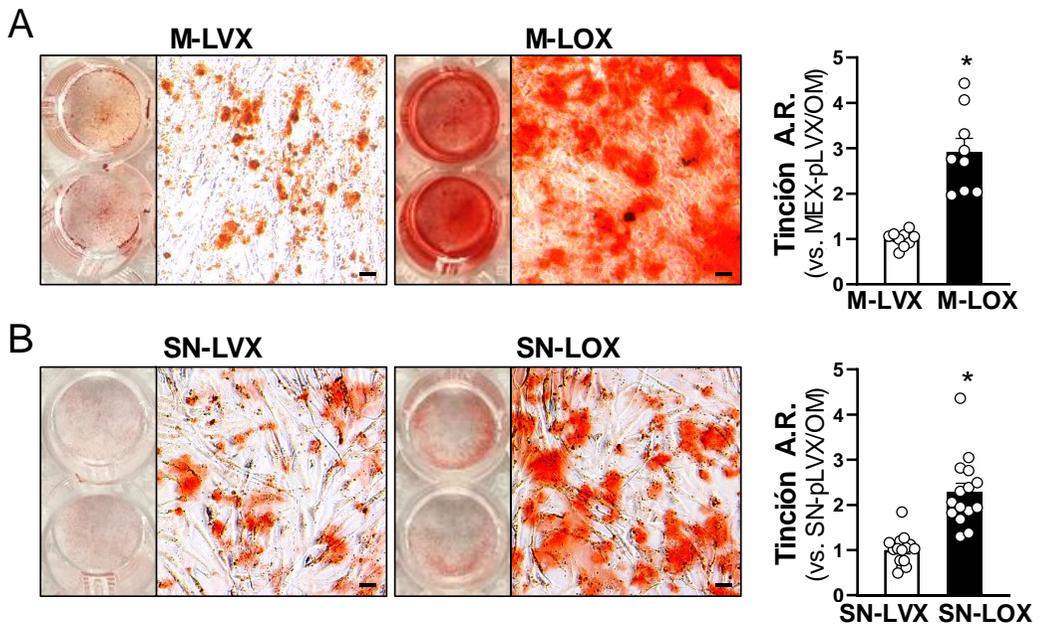


Figura 62. La mayor presencia de LOX en el espacio extracelular agravó la mineralización de las VICs. (A) VICs humanas se transdujeron con lentivirus pLVX (vector vacío) y pLVX-LOX (pLOX), se cultivaron durante 6 días y posteriormente se lisaron. Sobre la MEX generada se sembraron VICs que se expusieron a condiciones osteogénicas. Se muestran imágenes representativas de la tinción rojo de alizarina, así como el análisis de su cuantificación mostrado en el gráfico de barras (n= 9). Los resultados se expresan como media \pm SEM. * $p < 0,001$: vs. M-LVX. (B) VICs se expusieron a medio OM suplementado con el 33,33% del medio condicionado de células transducidas con pLVX (SN-LVX) o pLVX-LOX (SN-LOX). Se muestran imágenes representativas de la tinción rojo de alizarina de VICs expuestas a medio OM así como su cuantificación (n= 15). Los resultados se expresan como media \pm SEM. * $p < 0,001$: vs. SN-LVX. Barras: 100 μ m.

2.3. La transgénesis de LOX dirigida a CMLVs potenció el desarrollo de aterosclerosis y calcificación vascular

Los resultados expuestos en los apartados anteriores sugerían un papel importante de la LOX en la calcificación de las VICs, al menos en células en cultivo, por lo que decidimos analizar si la LOX también tenía un papel relevante en modelos *in vivo*. Para ello, utilizamos un modelo de ratón generado por nuestro grupo que sobreexpresaba la LOX en las CMLVs (TgLOX^{CMLV}). A estos ratones y a sus hermanos de camada de genotipo salvaje (WT) les indujimos aterosclerosis e hiperlipidemia mediante la inyección intravenosa de partículas AAV-PCSK9^{D374Y} junto a la administración de una dieta rica en grasa y colesterol durante 20 semanas (Figura 63A). En paralelo, se administró suero salino a los grupos control formados por ratones WT y TgLOX^{CMLV} que se alimentaron con la misma dieta (Figura 63A).

Resultados

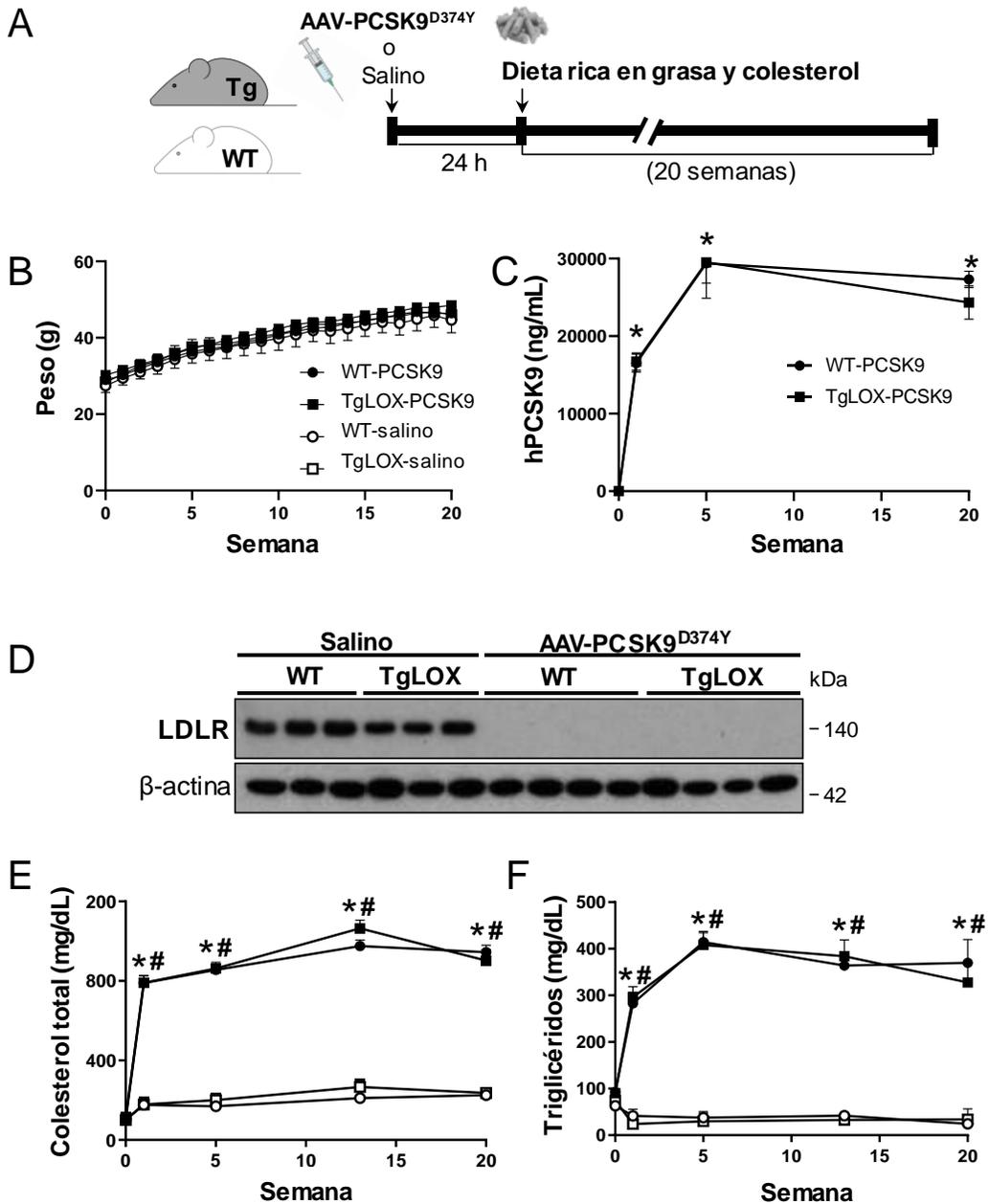


Figura 63. Inducción de hiperlipidemia y aterosclerosis mediante inyección de virus adenoasociados (AAV) que codifican para una forma mutada de ganancia de función de la PCSK9 (PCSK9^{D374Y}) combinada con una dieta rica en grasa y colesterol. Se inyectó por vía intravenosa AAV-PCSK9^{D374Y} o suero salino a los ratones control (WT) y transgénicos de LOX (TgLOX) y se administró una dieta rica en grasa y colesterol durante 20 semanas. (A) Esquema representativo del diseño experimental. (B) Seguimiento del peso corporal de los diferentes grupos experimentales. (C) Niveles plasmáticos de la proteína PCSK9 humana (hPCSK9) en los ratones transducidos con AAV-PCSK9^{D374Y}. (D) Niveles proteicos del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) a nivel hepático determinados por *Western Blot*. Se muestran los niveles de β -

actina como control de carga. (E y F) Niveles plasmáticos de colesterol total (E) y triglicéridos (F). Los resultados se expresan como media±SEM. (Suero salino n= 6, PCSK9^{D374Y} n= 15). p<0,01: *vs. t=0; # vs. ratones salino.

Durante el experimento se realizó seguimiento semanal del peso corporal, que evidenció un incremento progresivo en los cuatro grupos experimentales sin diferencias significativas entre ellos (Figura 63B). La forma humana de la proteína PCSK9 aumentó en el plasma de los animales a los que se administró el vector adenoviral desde la primera semana de la inyección y se mantuvo estable hasta el final del experimento (Figura 63C). Asimismo, la sobreexpresión de PCSK9^{D374Y} redujo de manera drástica los niveles hepáticos del receptor de LDLs que fueron virtualmente indetectables por *Western Blot* en estos animales (Figura 63D). Los animales PCSK9^{D374Y} mostraron niveles plasmáticos de colesterol total y triglicéridos significativamente superiores al grupo control desde la primera semana de la inyección (Figura 63 E y F).

2.3.1. La transgénesis de LOX potenció el desarrollo de aterosclerosis

Transcurridas 20 semanas de experimento, se realizó ultrasonografía para determinar la presencia de lesiones ateroscleróticas a nivel de arco aórtico (Figura 64A). Los análisis de ultrasonografía revelaron la presencia de lesiones en el arco y en las tres principales ramificaciones. El diámetro luminal de la arteria braquiocefálica disminuyó significativamente en ambos grupos experimentales (WT y TgLOX^{CMLV}) respecto al diámetro luminal basal lo que indicaba la presencia de lesiones ateroscleróticas (Figura 64A). Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales a tiempo final (Figura 64A). Tras el sacrificio, pudimos apreciar que los animales transducidos con PCSK9^{D374Y} y sometidos a dieta presentaban lesiones ateroscleróticas en el arco aórtico a diferencia de los animales control (Figura 64B).

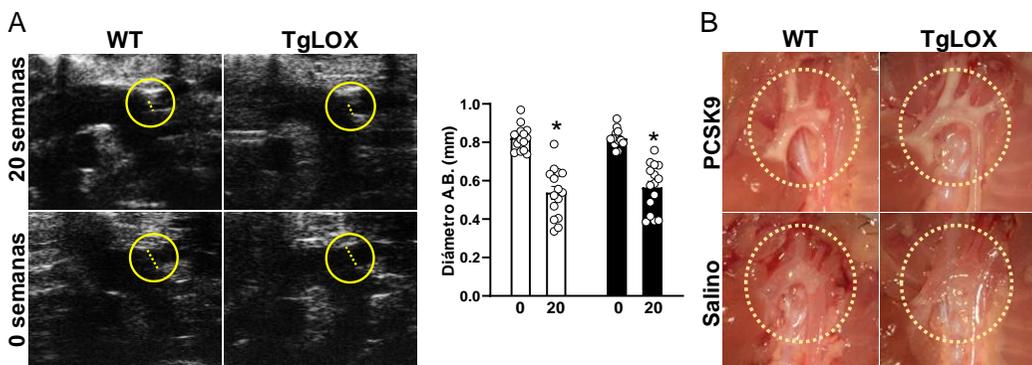


Figura 64. Ultrasonografía y examen *post mortem* del desarrollo de lesiones ateroscleróticas en los animales a los que se administró adenovirus y dieta aterogénica. (A) Imágenes representativas de ultrasonografía de la arteria braquiocefálica en ratones WT y TgLOX^{CMLV} transducidos con PCSK9^{D374Y} y alimentados con una dieta aterogénica durante 20 semanas. El gráfico de barras

Resultados

muestra el análisis del diámetro de la luz de la arteria braquiocefálica al inicio y al cabo de 20 semanas de tratamiento de los ratones WT (barras blancas) y TgLOX^{CMLV} (barras negras). Los resultados se muestran como media±SEM (n= 15). *p<0,05: vs. t=0. (B) Imágenes macroscópicas representativas de las aortas durante el sacrificio en las que se aprecian lesiones en los animales transducidos con PCSK9^{D374Y} durante 20 semanas.

Analizamos de manera más exhaustiva el efecto de la transgénesis de LOX en el desarrollo de aterosclerosis mediante la tinción O.R.O. de aortas expuestas *en face* (Figura 65A). El análisis reveló que la sobreexpresión de LOX favoreció el desarrollo de la aterosclerosis (Figura 65B). La sectorización de la aorta en 3 regiones (arco aórtico, aorta torácica y aorta abdominal) permitió apreciar que las diferencias más significativas se producían a nivel de la aorta abdominal (Figura 65B).

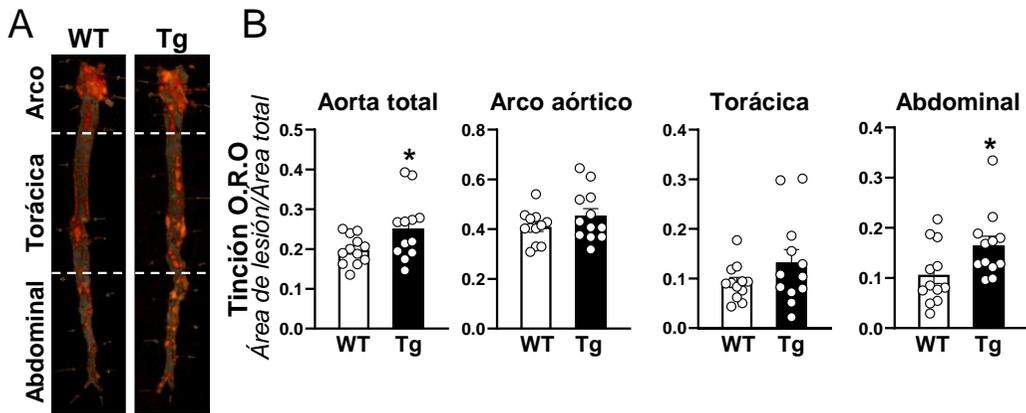


Figura 65. La transgénesis de LOX potenció el desarrollo de aterosclerosis. (A) Imágenes representativas de la tinción O.R.O. de aortas expuestas *en face* de ratones WT y TgLOX^{CMLV} (Tg). Las líneas de puntos blancos representan la sectorización de la aorta en: arco aórtico, aorta torácica y aorta abdominal. (B) Análisis planimétrico de la cuantificación de la tinción O.R.O. en toda la aorta y en las regiones mencionadas. Los resultados se expresan como media±SEM (n= 12). *p<0,05: vs. WT-PCSK9^{D374Y}.

2.3.1.1. La transgénesis de LOX promovió mayor entrecruzamiento de colágeno y estrés oxidativo en lesiones de las raíces aórticas

Analizamos las características de las lesiones ateroscleróticas de diferentes lechos vasculares. En primer lugar, nos centramos en las lesiones presentes en la raíz aórtica de estos animales (Figura 66A). El análisis de la extensión de las lesiones no reveló diferencias significativas entre los ratones WT y TgLOX^{CMLV} (Figura 66B). Sin embargo, las lesiones de ratones transgénicos presentaban un mayor grado de entrecruzamiento de colágeno tal como determinó la tinción rojo sirio bajo luz polarizada (Figura 66C). La tinción de von Kossa evidenció la ausencia de mineralización en este lecho vascular en ambos grupos experimentales (Figura 66A).

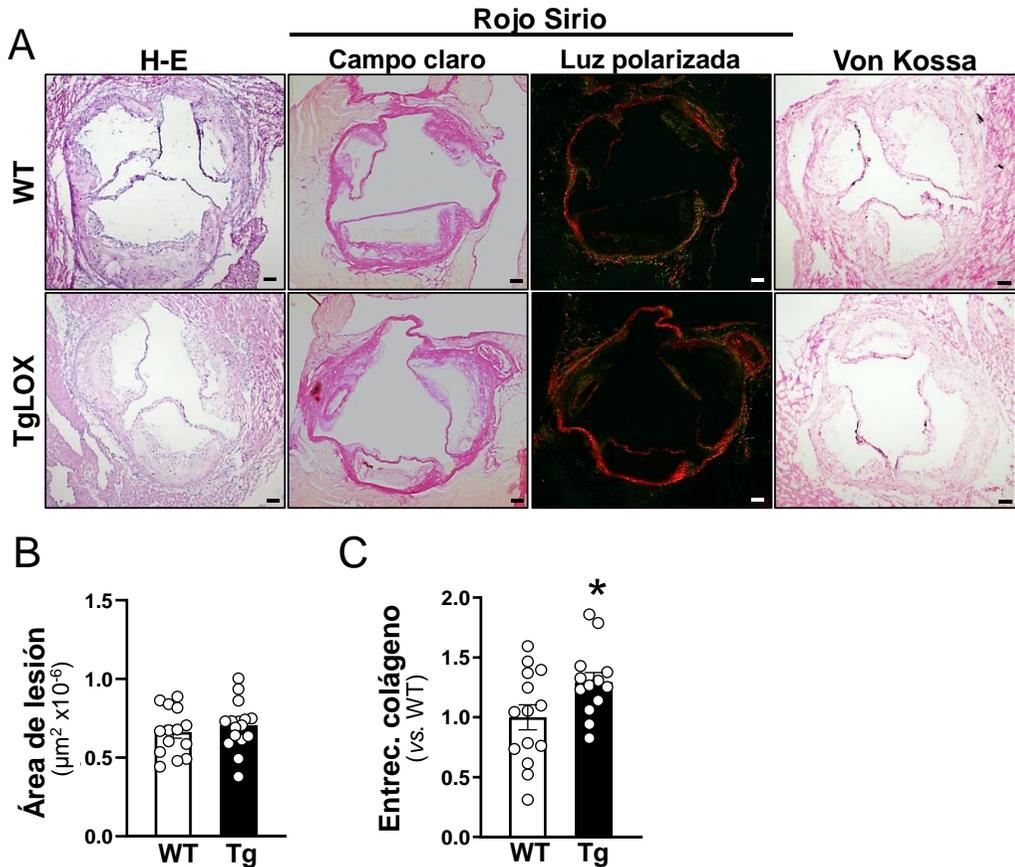


Figura 66. La sobreexpresión LOX promovió el entrecruzamiento de colágeno en las lesiones ateroscleróticas de la raíz aórtica. (A) Imágenes representativas de secciones de raíces aórticas teñidas con hematoxilina-eosina (H-E), rojo sirio y von Kossa de animales control (WT) y TgLOX^{CMLV} (Tg). Barra: 100 μm . (B) Cuantificación del área de lesión aterosclerótica de los ratones WT (barras blancas) y TgLOX^{CMLV} (barras negras). (C) Cuantificación del grado de entrecruzamiento del colágeno visualizado con luz polarizada. Los resultados se expresan como media \pm SEM (WT n= 14; TgLOX^{CMLV} n= 13-16). * $p < 0,05$; vs. WT-PCSK9^{D374Y}.

Debido a que las lesiones de animales que sobreexpresaban LOX presentaban un colágeno más entrecruzado, relacionado con la mayor actividad de esta enzima, decidimos evaluar el estrés oxidativo en esta región mediante la tinción DHE (Figura 67). Cabe destacar que trata de una región sometida a elevado estrés por las fuerzas hemodinámicas que operan en esta zona. A pesar de esto, observamos un aumento en el nivel del anión superóxido en las lesiones de ratones TgLOX^{CMLV} respecto a los WT (Figura 67) lo que sugería la contribución de la LOX a este mayor estrés oxidativo.

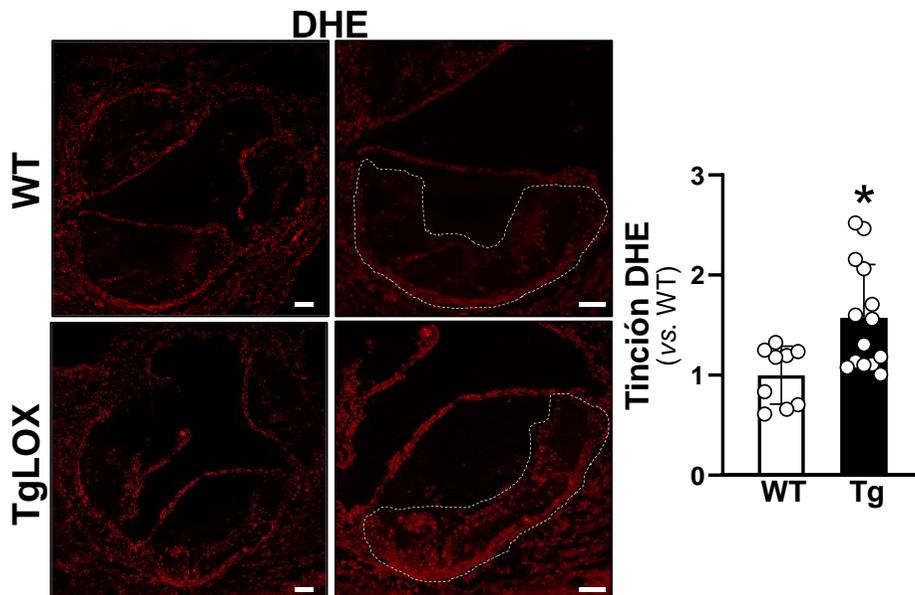


Figura 67. Niveles de anión superóxido en lesiones ateroscleróticas de raíces aórticas. Imágenes representativas de la fluorescencia detectada tras la tinción con DHE y el resultado de su cuantificación en secciones de raíces aórticas de animales control (WT, barras blancas) y TgLOX^{CMLV} (Tg; barras negras) captadas mediante microscopía confocal. Las líneas de puntos blancas delimitan el área considerada en el análisis cuantitativo. Barra: 100 μ m. Los resultados se expresan como media \pm SEM (WT n= 9; TgLOX^{CMLV} n= 14). *p<0,05; vs. WT-PCSK9^{D374Y}.

2.3.1.2. *La transgénesis de LOX promovió mayor infiltrado inflamatorio en lesiones ateroscleróticas del arco aórtico*

Analizamos secciones longitudinales del arco aórtico para determinar las características de las lesiones. La extensión de las lesiones fue similar en animales TgLOX^{CMLV} y WT (Figura 68A). Sin embargo, las lesiones de los ratones transgénicos presentaban un mayor infiltrado inflamatorio (células CD68 positivas) (Figura 68B). El contenido de CMLVs (α -SMA +) en estas lesiones también era mayor (área α -SMA +) (Figura 68C).

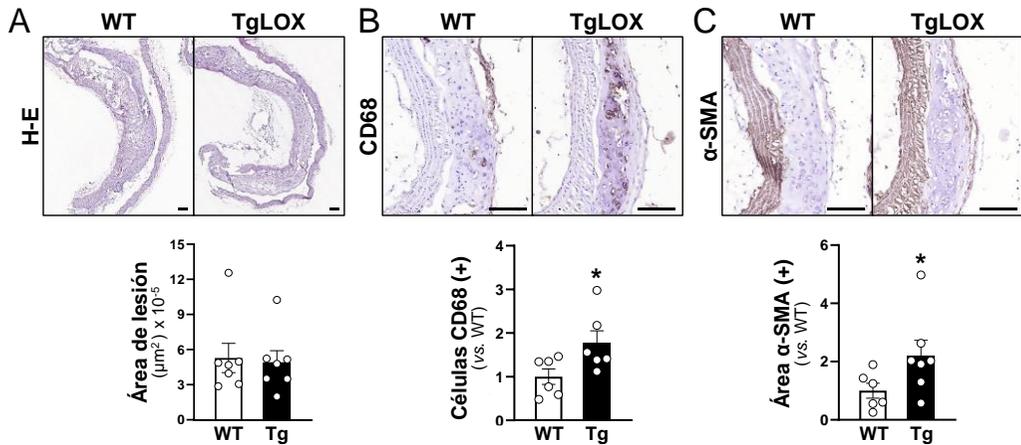


Figura 68. Análisis del área de la lesión, el infiltrado inflamatorio y el contenido de CMLVs en placas ateroscleróticas del arco aórtico. (A) Imágenes representativas de la tinción hematoxilina-eosina y cuantificación de la extensión de la lesión (n= 7). (B-C) Imágenes representativas de la inmunohistoquímica para determinar el contenido de células CD68 positivas (n= 6) y α -SMA positiva (WT n= 6 y TgLOX n= 7) así como su cuantificación, B y C respectivamente. Los resultados se expresan como media \pm SEM *p<0,05: vs. ratones WT-PCSK9^{D374Y}. Barras: 100 μm .

2.3.1.3. *La transgénesis de LOX favorece la formación de lesiones con mayor infiltrado inflamatorio y mayor cubierta fibrosa en la arteria braquiocefálica*

Finalmente, analizamos las características de las lesiones desarrolladas en la arteria braquiocefálica (Figura 69). Como en el arco aórtico, no se observaron diferencias significativas en el tamaño de la lesión (Figura 69). Sin embargo, se detectó un incremento significativo del infiltrado inflamatorio (MCP1 y CD68) en las lesiones de los ratones transgénicos (Figura 69). Lo más destacado, sin embargo, fue que el contenido de CMLVs (área α -SMA +) era significativamente mayor en las lesiones de los animales TgLOX^{CMLV} (Figura 69).

Resultados

El mayor contenido de CMLVs de las lesiones ateroscleróticas, nos llevó a analizar la cubierta fibrosa de las placas. Medimos el grosor de esta capa en las lesiones. Las cubiertas fibrosas de las lesiones de los animales transgénicos eran significativamente más gruesas que las de los animales control (Figura 70). Además, determinamos que las cubiertas fibrosas de las lesiones de los animales transgénicos presentaban más infiltrado inflamatorio y mayor marcaje de 8-oxo-deoxiguanosina, un marcador de daño en el ADN causado por estrés oxidativo (Figura 70).

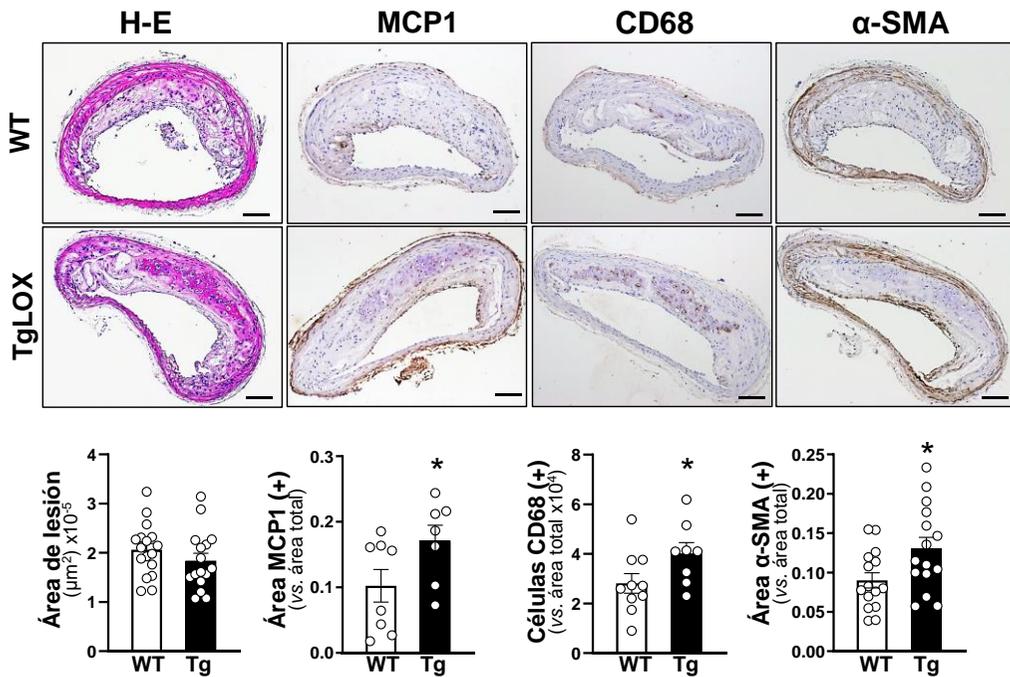


Figura 69. Impacto de la transgénesis de LOX en la aterosclerosis de la arteria braquiocéfálica. Las arterias braquiocéfálicas se tiñeron con hematoxilina-eosina (H-E) (WT n= 17; TgLOX n= 16) y se realizaron inmunotinciones para determinar la expresión de MCP1 (WT n= 8; TgLOX n= 7), el contenido de células positivas para CD68 (WT n= 10; TgLOX n= 8) y para α -actina de músculo liso (WT n= 15; TgLOX n= 15). Los gráficos de barras (paneles inferiores) representan los análisis cuantitativos de las tinciones indicadas. Los resultados se expresan como media \pm SEM. *p<0,05: vs. ratones WT transducidos con PCSK9^{D374Y}. Barras: 100 μm .

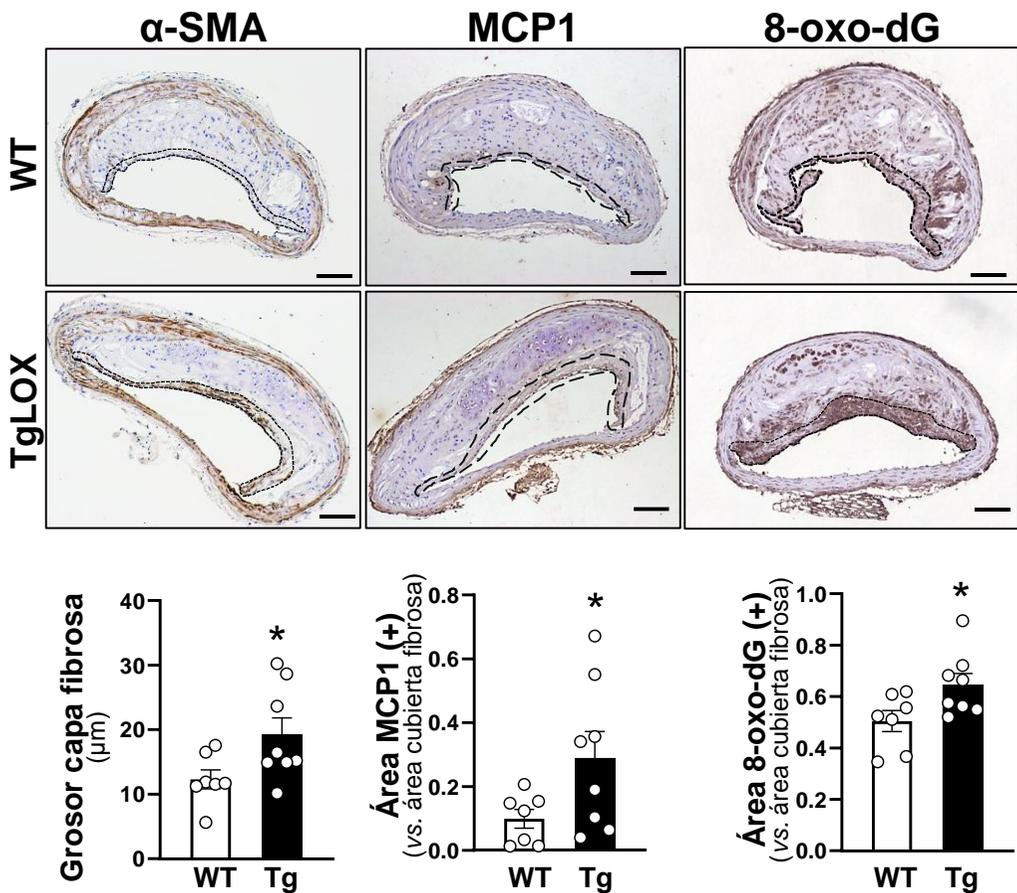


Figura 70. Efecto de la transgénesis de LOX en las características de la cubierta fibrosa de las placas ateroscleróticas. Se realizaron análisis inmunohistoquímicos para determinar la presencia de CMLVs en la cubierta fibrosa y estimar su grosor (WT n= 7, TgLOX n= 8), así como determinamos la expresión de MCP1 (WT n= 7, TgLOX n= 8) y el contenido en células positivas para 8-oxo-deoxiguanosina (8-oxo-Dg) (WT n= 7, TgLOX n= 8) en arterias braquiocefálicas de ratones WT o TgLOX (Tg). Los gráficos de barras (paneles inferiores) representan los análisis cuantitativos de las tinciones indicadas. Los resultados se expresan como media \pm SEM. * $p < 0,05$; vs. ratones WT transducidos con PCSK9^{D374Y}. Barras: 100 μm .

2.3.2. La transgénesis de LOX aumentó la mineralización de las lesiones ateroscleróticas

Analizamos el efecto de la transgénesis de LOX sobre la calcificación asociada a la aterosclerosis en los animales transducidos con AAV-PCSK9^{D374Y} alimentados con una dieta aterogénica. Para ello, evaluamos la presencia de calcio en la aorta de los ratones después a las 20 semanas de inducción de aterosclerosis. Así, utilizamos la sonda fluorescente de calcio OsteoSense 680EX, que se une con alta afinidad a los cristales de hidroxapatita. Este compuesto se administró 24 horas antes del sacrificio. Se extrajo y se fijó el conjunto aorta-corazón y se determinó

Resultados

la señal fluorescente mediante NIRF. Observamos que la deposición de calcio era mayor en las aortas de los ratones TgLOX^{CMLV} (Figura 71).

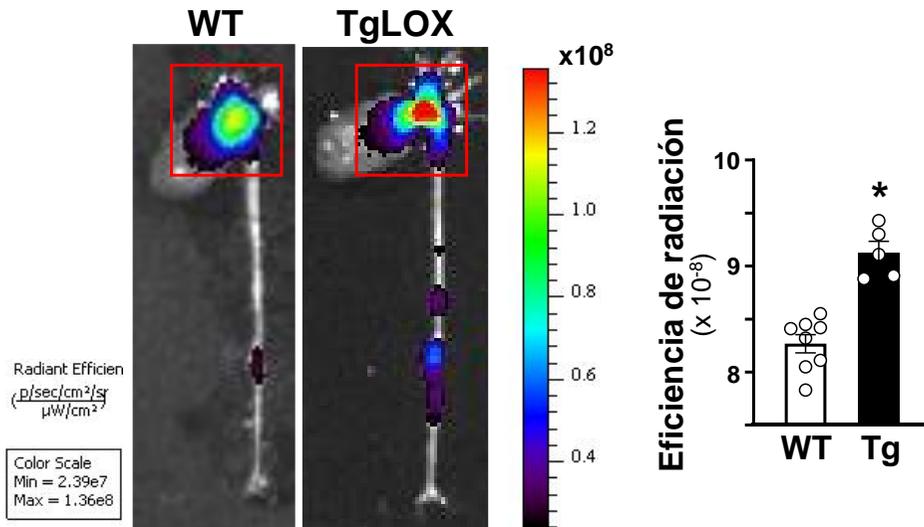


Figura 71. La transgénesis de LOX aumentó la calcificación en las lesiones ateroscleróticas. Imágenes representativas obtenidas mediante NIRF en aortas de ratones control (WT) y TgLOX^{CMLV} (Tg) a los que se había administrado el trazador de calcio OsteoSense™ 680 ex 24 horas antes del sacrificio y transcurridas 20 semanas de la inducción de aterosclerosis mediante partículas adenovíricas y dieta aterogénica. Los resultados se expresan como media \pm SEM (WT n= 8; Tg n= 5). *p<0,05: vs. ratones control.

También, analizamos los niveles de expresión de marcadores implicados en el proceso de calcificación como *Runx2*, *Opn*, *Alpl* en las aortas de estos animales. Observamos un incremento similar de la expresión de estos marcadores en ambos grupos transducidos con adenovirus respecto los grupos a los que se administró suero salino (Figura 72A).

De manera similar, detectamos un aumento de la expresión de marcadores relacionados con el remodelado de la MEX (*Lox*, Colágeno IaI y la enzima *Plod* (Lisina hidroxilasa 1)) y de mediadores inflamatorios (*Il1 β* , *Mcp1* e *Il-6*) en ambos grupos transducidos con adenovirus respecto a los que se administró salino, sin diferencias significativas entre ellos (Figura 72 By C).

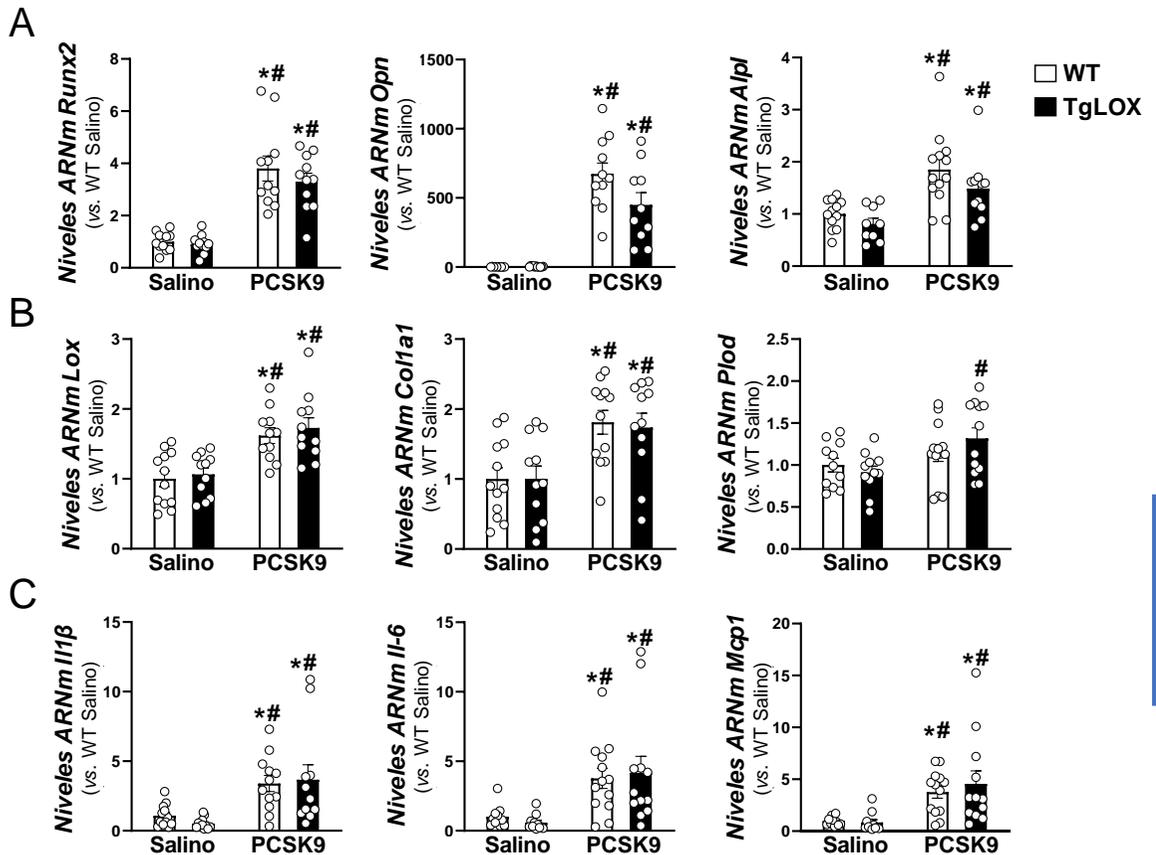


Figura 72. Niveles de expresión de marcadores de calcificación, de entrecruzamiento de colágeno y de inflamación en aortas de ratones control y TgLOX^{CMLV}. Niveles de ARNm de (A) marcadores de calcificación (*Runx2*, *Opn*, *Alpl*), (B) marcadores relacionados con el entrecruzamiento de colágeno (*Lox*, *Col1a1*, *Plod*) y (C) marcadores inflamatorios (*Il1β*, *Mcp1* e *Il-6*) mediante PCR a tiempo real en aortas de ratones control (WT) y TgLOX^{CMLV} transducidos con AAV-PCSK9^{D374Y} o tratados con suero salino y sometidos a una dieta aterogénica (20 semanas). Los resultados se expresan como media±SEM (salino n= 9-12; PCSK9 n= 10-13). p<0,05: *vs. ratones WT del grupo salino; # vs. ratones salino TgLOX^{CMLV}.

2.3.2.1. La transgénesis de LOX aumentó la mineralización de las lesiones ateroscleróticas del arco aórtico

Los resultados obtenidos con la sonda Osteosense 680EX evidenciaron que la calcificación se producía sobre todo a nivel del arco aórtico. Analizamos también la mineralización de las placas ateroscleróticas en cortes longitudinales de esta región. Tras la tinción de von Kossa y la incubación con la sonda fluorescente OsteoSense 680EX observamos mayor área calcificada en los arcos de ratones transgénicos respecto a los WT (Figura 73).

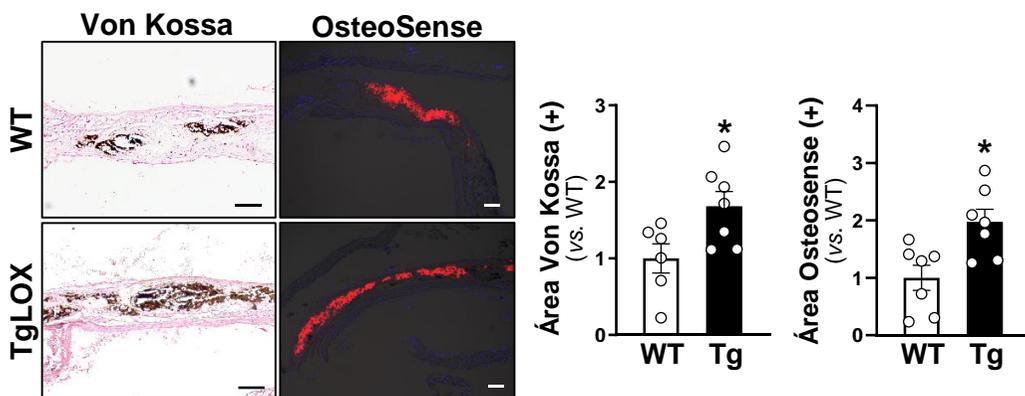


Figura 73. La transgénesis de LOX favoreció la calcificación de las lesiones ateroscleróticas. Imágenes representativas de la tinción von Kossa (WT n= 6; TgLOX n= 7) y Osteosense™ 680 EX (WT n= 7; TgLOX n= 7) para determinar la calcificación de las lesiones ateroscleróticas del arco aórtico de ratones control (WT) y TgLOX transducidos con AAV-PCSK9^{D374Y} y alimentados con dieta aterogénica. Los gráficos de barras muestran el análisis cuantitativo de la calcificación. Los resultados se expresan como media ± SEM. *p<0,05; vs. ratones control. Barras: 100 μm.

Decidimos caracterizar estas lesiones, así como las propiedades de la MEX. Los análisis inmunohistoquímicos evidenciaron un mayor contenido del marcador de calcificación RUNX2 en lesiones de animales transgénicos (Figura 74), que también presentaban mayor contenido de glucosaminoglicanos (área azul de la tinción de pentacrómico de Movat) y de colágeno más entrecruzado (Figura 74).

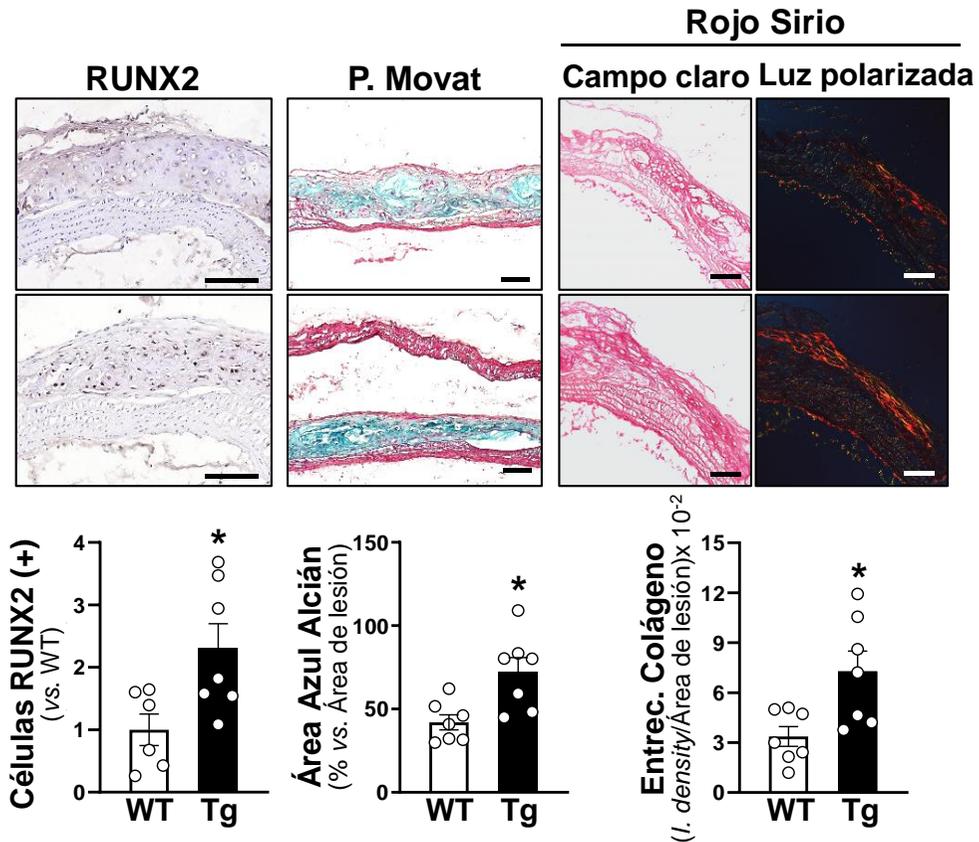


Figura 74. La transgénesis de LOX aumentó el nivel del marcador osteogénico RUNX2, el contenido de glucosaminoglicanos y el entrecruzamiento de colágeno en las lesiones ateroscleróticas del arco aórtico. Imágenes representativas de los análisis inmunohistoquímicos para RUNX2 (WT n= 6 y TgLOX^{CMLV} n= 7) y las tinciones de pentacrómico de Movat (n= 7) y rojo sirio (n=7) de lesiones de arco aórtico de animales control (WT, barras blancas) y TgLOX^{CMLV} (barras negras). El rojo sirio se captó con luz visible (paneles de la izquierda) y luz polarizada para estimar el grado de entrecruzamiento del colágeno (paneles de la derecha). Los gráficos de barras de la parte inferior muestran los análisis cuantitativos. Los resultados se expresan como media ± SEM. *p<0,05; vs. ratones WT. Barras: 100 μ m.

2.3.2.2. *LOX favorece la calcificación de las lesiones ateroscleróticas de las arterias braquiocefálicas*

Evaluamos el impacto de la transgénesis de LOX en la mineralización de las placas ateroscleróticas de la arteria braquiocefálica. Como ya se ha indicado la incidencia de calcificación en este lecho vascular es baja. No obstante, tanto la tinción de von Kossa como la de la sonda fluorescente OsteoSense 680EX evidenciaron un incremento en la incidencia de calcificación en las lesiones de los animales transgénicos 75% vs. 27,27%. Además, el área calcificada era

Resultados

significativamente mayor en las arterias braquiocefálicas de los animales TgLOX^{CMLV} (Figura 75).

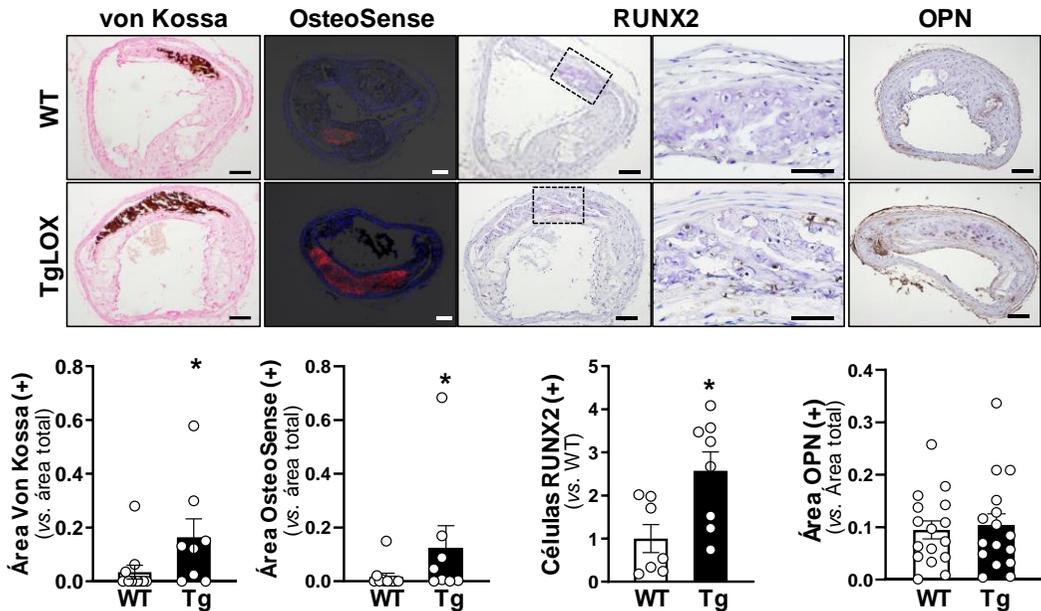


Figura 75. Impacto de la transgénesis de LOX en la calcificación de la arteria braquiocefálica. Se analizó la presencia de calcificación y su extensión con la tinción de von Kossa y la sonda OsteoSense 680 EX (WT n= 11; TgLOX n= 8) así como las células positivas para RUNX2 (WT n= 7; TgLOX n= 8) y el área positiva para OPN (WT n= 16, TgLOX n= 16). Se muestra un campo de la lesión tras la inmunotinción para RUNX2 a más aumento (imagen de la derecha). Los gráficos de barras muestran los análisis cuantitativos. Barra: 100 μ m. Los resultados se expresan como media \pm SEM. * $p < 0,05$; vs. WT-PCSK9^{D374Y}.

El análisis inmunohistoquímico de marcadores de calcificación evidenció un resultado similar ya que las lesiones de ratones TgLOX^{CMLV} tenían un mayor contenido de células RUNX2 positivas respecto a las lesiones WT (Figura 75). Sin embargo, no observamos diferencias en el contenido de OPN entre ambos grupos experimentales (Figura 75).

Las lesiones ateroscleróticas de las arterias braquiocefálicas de animales transgénicos mostraron un mayor contenido glucosaminoglicanos y colágeno más entrecruzado (Figura 76). El análisis del marcador de proliferación Ki67 no evidenció diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 76).

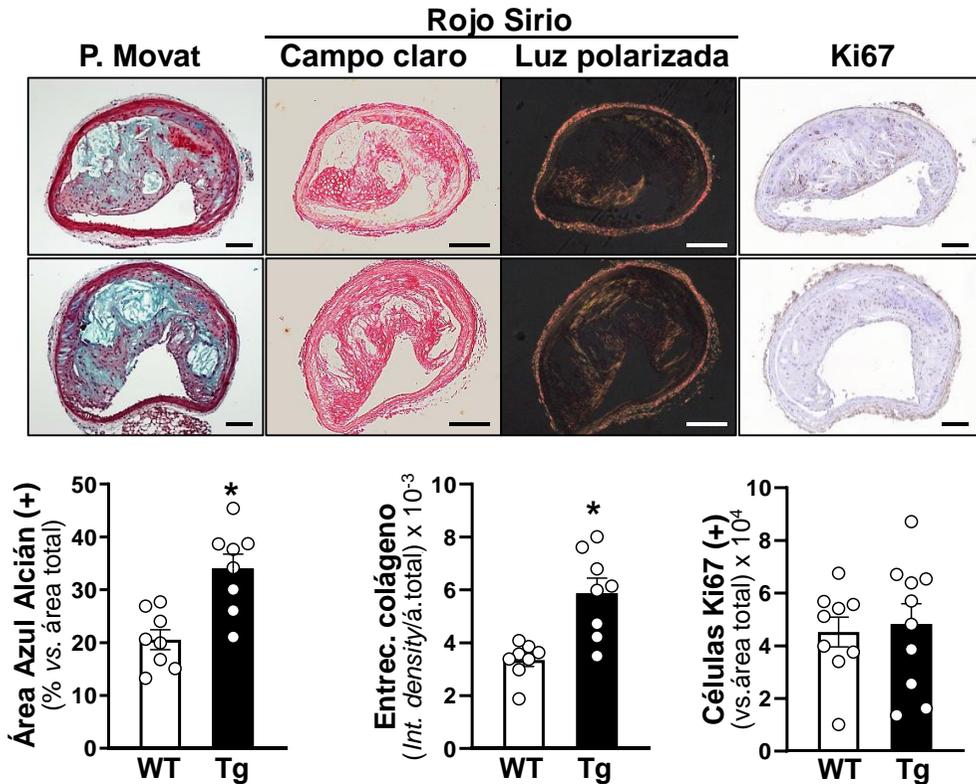


Figura 76. La transgénesis de LOX promovió un aumento de contenido de glucosaminoglicanos y un mayor entrecruzamiento de colágeno en las lesiones ateroscleróticas de la arteria braquiocefálica. Se cuantificó el área de glucosaminoglicanos (área azul en el pentacrómico de Movat) (n= 8), el entrecruzamiento de colágeno (n= 8) y el marcador de proliferación Ki67 (WT n= 9; TgLOX n= 10). Los gráficos de barras muestran los análisis cuantitativos. Barra: 100 μ m. Los resultados se muestran como media \pm SEM. *p<0,05: vs. WT-PCSK9^{D374Y}.

2.3.2.2.1. La transgénesis de LOX no afecta a los niveles plasmáticos de los marcadores de calcificación

Además, medimos los niveles circulantes de parámetros relacionados con el metabolismo mineral. Los resultados evidenciaron que, transcurridas 20 semanas, tanto los animales WT como TgLOX^{CMLV} presentaban niveles significativamente incrementados de osteoprotegerina (OPG) y fosfato, factores procalcificantes (Figura 77). En cambio, ambos grupos presentaron una disminución similar del inhibidor de la calcificación DKK-1 (Figura 77). No se observaron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de calcio.

Resultados

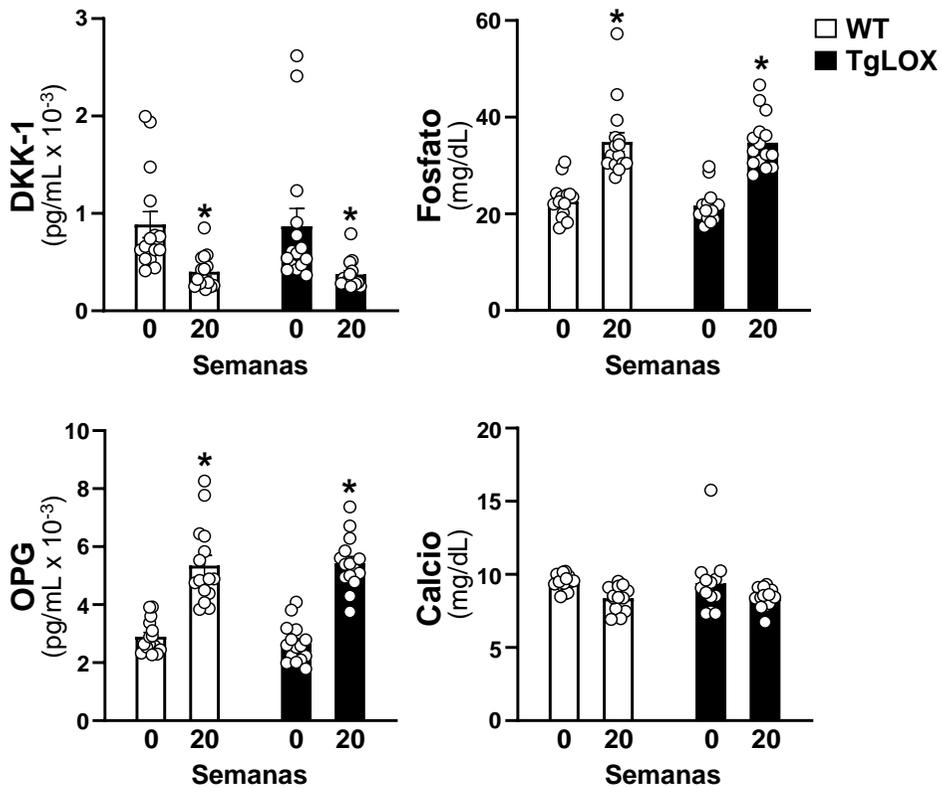


Figura 77. Parámetros circulantes relacionados con el metabolismo mineral en los animales a los que se indujo aterosclerosis. Niveles plasmáticos de DKK-1, fosfato, osteoprotegerina (OPG) y calcio de animales control (WT, barras blancas) y transgénicos para LOX (TgLOX; barras negras) antes y después de 20 semanas de transducción con AAV-PCSK9^{D374Y} y dieta aterogénica. Los resultados se expresan como media±SEM (n= 13-15). *p<0,05: vs. ratones del mismo genotipo a tiempo inicial.

DISCUSIÓN

1. Implicación del receptor nuclear NOR-1 en la aterosclerosis y la calcificación cardiovascular

La calcificación cardiovascular se ha convertido en un importante problema de salud con alta mortalidad y cuya prevalencia va en aumento (244). Desafortunadamente, no existen estrategias terapéuticas dirigidas a su prevención o tratamiento (245). De hecho, en la calcificación cardiovascular la única opción terapéutica es la cirugía invasiva que supone un considerable desembolso económico para el sistema nacional de salud y, además, no es efectiva para todos los tipos de calcificación (244). El desarrollo de calcificación es un proceso activo en el cual participan diversas vías de señalización y procesos celulares, por lo que puede considerarse que existen múltiples potenciales dianas terapéuticas (244). Entre los procesos biológicos implicados se incluye el remodelado de la MEX, el estrés del retículo endoplasmático, la alteración del metabolismo lipídico y mineral, la autofagia, la inflamación, la apoptosis, la pérdida de la inhibición de la mineralización, la alteración de la resorción mineral, la senescencia celular y las vesículas extracelulares (244). Estudios previos desarrollados por nuestro grupo han descrito la implicación de NOR-1 en la fisiopatología de una gran variedad de enfermedades cardiovasculares (81,88). Sin embargo, se desconocía si NOR-1 participa en la calcificación cardiovascular.

RUNX2 es un factor de transcripción fundamental que dirige el proceso de calcificación valvular en las etapas iniciales a través del control de la transdiferenciación osteogénica, ya que promueve la activación de mediadores y marcadores de calcificación como OPN y ALPL (246,247). En este contexto, analizamos la relación del factor de transcripción NOR-1 con la calcificación valvular en válvulas con bajo y alto grado de calcificación de pacientes sometidos a cirugía valvular. Los análisis de *Western Blot* revelaron un incremento significativo de la expresión de NOR-1 en las válvulas muy calcificadas que fue concomitante con el aumento de los marcadores característicos de la calcificación, RUNX2 y OPN. Los estudios histológicos revelaron un resultado similar ya que se apreció una elevada expresión de NOR-1 en zonas muy próximas a la calcificación (áreas von Kossa positivas). Además, el marcaje positivo de NOR-1 se localizaba en regiones que presentaban elevada expresión de RUNX2 y vimentina (marcador de VICs). Coherentemente, en las válvulas con bajo grado de calcificación no se detectó expresión significativa de ambos factores de transcripción (NOR-1 y RUNX2). Estos resultados sugieren una posible relación entre la expresión de NOR-1 y el proceso de calcificación dirigido por RUNX2. Sin embargo, no indican en qué sentido ya que podría ser un mediador de la

Discusión

calcificación o bien podría participar en un mecanismo de retroalimentación negativa del proceso.

Por ello, profundizamos en los mecanismos implicados en la calcificación en cultivos de VICs en las que la inducción de calcificación aumentó la expresión de NOR-1 de forma concomitante con el aumento de expresión de los marcadores osteogénicos (RUNX2, OPN, BGLAP). Además, abordamos estrategias de ganancia y pérdida de función que evidenciaron que NOR-1 sería un regulador negativo de la calcificación. Así, el silenciamiento génico de NOR-1 en VICs expuestas a medio de calcificación potenció la inducción de marcadores osteogénicos y la mineralización de la MEX. Sin embargo, la sobreexpresión lentiviral de este factor de transcripción indujo el efecto contrario ya que atenuó la calcificación de la MEX así como la inducción de los marcadores osteogénicos. Curiosamente el estímulo de calcificación indujo los niveles de expresión de la IL-6, marcador proinflamatorio implicado en la transdiferenciación osteogénica (243). La IL-6 es una citoquina proinflamatoria cuya expresión está aumentada en las válvulas calcificadas. Esta citoquina se expresa y secreta durante el proceso de mineralización como factor procalcificante (243,248,249) regulada por NF- κ B, vía de señalización relacionada con el proceso de calcificación (249). Por lo tanto, los resultados sugieren que NOR-1 jugaría un papel importante como modulador que previene o reduce la calcificación. La calcificación es un proceso complejo en el que se produce un desequilibrio entre los factores que promueven la calcificación y aquellos que la inhiben (32). En este contexto, NOR-1 actuaría sobre ese balance atenuando la mineralización.

Existe una estrecha relación entre la aterosclerosis y la calcificación vascular, de hecho, esta última suele ser evidente en etapas avanzadas del proceso aterosclerótico (7,56). Nuestro grupo describió anteriormente el incremento de la expresión de NOR-1 en lesiones ateroscleróticas de arterias coronarias de pacientes con cardiopatía isquémica (91). No obstante, se desconoce la posible relación entre este factor de transcripción y la calcificación asociada a la aterosclerosis. Así, analizamos la expresión de NOR-1 en lesiones ateroscleróticas calcificadas de arterias femorales humanas y observamos una elevada expresión de este receptor nuclear en zonas cercanas a áreas calcificadas. Además, NOR-1 se localizaba en regiones que contenían CMLVs positivas para RUNX2 lo que apoya la hipótesis de la interrelación entre NOR-1 y RUNX2 durante el proceso osteogénico. En efecto, se confirmó que NOR-1, RUNX2, IL-6 y el resto de marcadores osteogénicos se inducen en CMLVs cultivadas en condiciones osteogénicas como sucedía en VICs calcificadas.

Nuestro grupo ha descrito que el factor de transcripción NOR-1 participa en la regulación de diferentes procesos implicados en el desarrollo de

la lesión aterosclerótica y modula la actividad de las células endoteliales, las CMLVs, las células inflamatorias y las células del sistema inmune (81,88). La sobreexpresión de NOR-1 promueve la proliferación de las CMLVs humanas lo que se constató en CMLVs murinas (91,148). De hecho, en un ratón transgénico que sobreexpresa NOR-1 humano específicamente en CMLVs determinamos que este factor de transcripción agrava el remodelado vascular inducido por ligadura de arteria carótida (148). Posteriormente y en concordancia, otros autores confirmaron el efecto proliferativo de NOR-1 a través de la regulación de genes clave en la progresión del ciclo celular (149,250). En el contexto de la calcificación vascular, la inducción de calcificación en CMLVs y anillos aórticos que sobreexpresaban NOR-1 evidenció una disminución de la inducción de los marcadores osteogénicos y una reducción de la deposición de calcio tanto *in vitro* como *ex vivo*, como sucedía en VICs. Se ha de destacar que en condiciones basales las CMLVs que sobreexpresaban NOR-1 tenían niveles de expresión más bajos de los marcadores osteogénicos que las células WT lo que también sugiere una regulación negativa de NOR-1 sobre la calcificación. Además, la sobreexpresión de NOR-1 disminuyó la expresión de la *Il-6* en las CMLVs murinas. Este hallazgo se relaciona con nuestros resultados previos que mostraban un efecto antiinflamatorio de NOR-1 en CMLVs a través de la interferencia de la vía de señalización NF- κ B y la consecuente disminución de la expresión de diversas citoquinas y quimioquinas, entre ellas la *Il-6* (88,93). En la calcificación juega un papel importante la inflamación y la activación de la vía NF κ B (249). Por lo tanto, estos resultados sugieren que NOR-1 podría interferir en la activación de NF- κ B en el proceso de mineralización. Esta atenuación de la diferenciación osteogénica mediada por NOR-1 difiere del efecto descrito para Nur77 en la calcificación (57,179). Sin embargo, no resulta sorprendente que los tres miembros de la familia NR4A se asocien con efectos dispares ya que se han descrito con frecuencia efectos antagónicos de Nur77 y NOR-1 sobre todo a nivel de la restenosis (251,252). En la calcificación inducida por lactato de las CMLVs se ha descrito la inducción de Nur77 que parece favorecer la transición osteoblástica y la deposición de calcio en la MEX (57,179). Además, en este estudio mostraron que Nur77 presenta mayor expresión en las arterias calcificadas de modelos animales (57). También se ha descrito la expresión de Nur77 en la diferenciación osteoblástica durante el mantenimiento de la homeostasis ósea (253). Asimismo, se ha propuesto a Nur77 como uno de los factores de transcripción que modulan la diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos que es imprescindible para la mineralización de la MEX (254). Nur77 también parece jugar un papel fundamental en la homeostasis de los osteoclastos ya que dificulta su reclutamiento y retrasa la osteopenia (180). Además, la expresión de Nur77 en osteoblastos, se ha asociado con procesos de maduración osteoblástica

Discusión

y osteoblastogénesis (255). Respecto a Nurr1, en el estudio Rotterdam se analizó la correlación de diferentes haplotipos de este factor de transcripción con la aparición de eventos cardiovasculares. Si bien no se observó relación de los haplotipos de Nurr1 con los eventos coronarios, el engrosamiento de la media o la aterosclerosis carotídea (256), sin embargo, se detectó una tendencia que parecía asociar los haplotipos de Nurr1 con la aparición de calcificación, aunque en el estudio no alcanzó significación estadística (256). También, se había descrito la regulación por Nurr1 del promotor de la OPN, gen implicado en el remodelado óseo, en líneas celulares de osteoblastos (253). Nurr1 se ha propuesto como gen de inducción temprana en osteoblastos tras la inducción de calcificación por la hormona paratiroidea (PTH) y como factor de transcripción que induce la expresión de FGF23, implicado en la calcificación de estas células (257). Asimismo, parece que la inducción de Nurr1 se acentúa en células osteoblásticas de cráneo de ratones COX-2^{-/-} que tienen mayor sensibilidad a la inducción de la calcificación por PTH (258). No obstante, no existen estudios en la literatura en los que se describa cómo afectan estos receptores nucleares a la calcificación cardiovascular, por lo tanto, los resultados mostrados en el presente estudio son novedosos y aportan información relevante para comprender la fisiopatología del proceso.

Además de evaluar el impacto del factor de transcripción NOR-1 en la mineralización de las CMLVs abordamos las consecuencias de la sobreexpresión de NOR-1 en la pared sobre la aterosclerosis y la calcificación *in vivo*. Para ello, utilizamos una estrategia innovadora que evita la necesidad de cruzar nuestros ratones transgénicos con animales susceptibles al desarrollo de aterosclerosis como los ratones ApoE^{-/-} y LDLR^{-/-} (239,259,260). Esta estrategia consiste en la administración de una única inyección de un vector vírico adenoasociado que contiene una forma mutada de ganancia de función de la proteína PCSK9 humana (AAV-PCSK9^{D374Y}) en combinación con una dieta aterogénica, una aproximación validada previamente como modelo de calcificación vascular en ratón (260). En nuestro caso, esta estrategia nos permitió estudiar el efecto de NOR-1 en la pared vascular en el contexto de hiperlipidemia y aterosclerosis a partir de nuestra colonia de ratones TgNOR-1^{CMLV}. Observamos que esta aproximación producía un incremento significativo de los niveles de lípidos (colesterol total y triglicéridos) circulantes y una reducción drástica de los niveles de LDRL a nivel hepático sin diferencias significativas entre animales WT y TgNOR-1^{CMLV}. Los niveles plasmáticos de la proteína PCSK9 humana también fueron similares en ambos genotipos lo que evidenció que la transgénesis de NOR-1 no interfirió en la sobreexpresión hepática de esta proteína.

Aunque la transgénesis de NOR-1 no afectó a los lípidos plasmáticos, sí observamos una disminución significativa de la extensión de la lesión aterosclerótica en los animales que sobreexpresaban NOR-1 analizada mediante la tinción O.R.O. en aortas expuestas *en face*. Sobre todo, se observó menor aterosclerosis en la región del arco aórtico y de la aorta torácica. Asimismo, la reducción de la aterosclerosis se confirmó en secciones longitudinales del arco aórtico y de la arteria braquiocefálica. En cambio, no observamos diferencias en la extensión de la lesión a nivel de la raíz aórtica. Estas diferencias podrían deberse al diferente origen embrionario de las células de los diversos lechos vasculares. Mientras las CMLVs de la aorta ascendente se generan a partir de la cresta neural y las de la aorta descendente derivan de somitos, las células valvulares derivan de células endocárdicas que se originan a partir del mesodermo lateral (261,262). Sus diferentes orígenes podrían afectar a la plasticidad de las CMLVs y a su susceptibilidad al desarrollo de aterosclerosis y la mineralización de la MEX.

En cuanto a la relación de NOR-1 y el desarrollo de aterosclerosis, otros autores habían descrito que la deficiencia de este factor de transcripción reducía la aterosclerosis en ratones hipercolesterolémicos de la cepa ApoE^{-/-} debido a la menor capacidad de adhesión de monocitos a la pared vascular (133). De hecho, estos autores relacionaban NOR-1 con la expresión moléculas de adhesión vascular (VCAM-1 e ICAM-1) que participan en la infiltración de monocitos durante la aterosclerosis. De esta manera, la deficiencia de NOR-1 reduciría la expresión de estas moléculas de adhesión y retrasaría el proceso aterosclerótico (133). Nuestros resultados, sin embargo, son más coherentes con los publicados posteriormente por el mismo grupo que determinó cómo la deficiencia de NOR-1 en células hematopoyéticas agravaba la aterosclerosis (159). La delección de NOR-1 en células hematopoyéticas parece que potencia las propiedades proaterogénicas de los macrófagos, promueve su proliferación y la formación de células espumosas lo que acelera la progresión de la lesión (159). Además, NOR-1 juega un papel clave en el sistema inmune ya que participa en el desarrollo y la función de las células T reguladoras, el balance Treg/Th17 y la respuesta de los linfocitos T al unirse las LDLox a CD69 lo que desencadena efectos antiateroscleróticos y antiinflamatorios (95,165). En los últimos años ha suscitado interés el impacto de NOR-1 en el remodelado y la aterosclerosis donde parece ejercer diferente papel dependiendo del tipo celular estudiado. Así, la sobreexpresión de NOR-1 de manera específica en CMLVs parece reducir la aterosclerosis inducida por la hiperlipidemia.

Las lesiones ateroscleróticas de los ratones TgNOR-1^{CMLV} mostraban un menor infiltrado inflamatorio, lo que resulta coherente con los resultados

obtenidos en células en cultivo. Los niveles de expresión de los mediadores inflamatorios en la pared vascular también eran significativamente inferiores en los ratones transgénicos. De hecho, basalmente ya se apreciaba menor expresión de estos marcadores en los ratones TgNOR-1^{CMLV}. Este efecto antiinflamatorio parece retrasar el desarrollo de la aterosclerosis ya que estos mediadores resultan esenciales en las etapas iniciales del proceso (7). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren un efecto antiinflamatorio de NOR-1 en la aterosclerosis. Nuestro grupo ya describió que la transgénesis de NOR-1 atenúa la respuesta inflamatoria de la pared vascular frente a un estímulo proinflamatorio como el LPS y lo relacionó con la atenuación de la activación de la vía NF- κ B (93). Otro de los procesos clave en la aterosclerosis es la migración y proliferación de CMLVs de la media hacia la íntima. Aunque la sobreexpresión de NOR-1 se ha relacionado con la proliferación y la migración de las CMLVs, en las lesiones ateroscleróticas de ratones TgNOR-1^{CMLV} de nuestro estudio no detectamos diferencias en el contenido de CMLVs respecto a las lesiones de los ratones WT. En concordancia con esto, no detectamos diferencias en la expresión de Ki67, marcador de proliferación celular.

Por último, caracterizamos las consecuencias de la transgénesis de NOR-1 sobre el desarrollo de calcificación. Para ello, medimos los niveles circulantes de parámetros relacionados con el metabolismo mineral en ratones transgénicos y WT. Los resultados mostraron una inducción de marcadores de calcificación (OPG y fosfato) y la disminución del inhibidor de calcificación DKK-1 en ambos genotipos sin diferencias significativas entre ellos, cambios previamente descritos (inyección de AAV-PCSK9^{D374Y} combinada con dieta rica en grasa) (260). El estudio de la calcificación vascular, utilizando la sonda fluorescente OsteoSense 680 EX, evidenció que los ratones que sobreexpresaban NOR-1 presentaban significativamente menos calcificación. La disminución de la mineralización se observó principalmente en la región del arco aórtico que se caracteriza por mostrar una alta susceptibilidad a la mineralización ectópica. Este resultado se confirmó al analizar la calcificación en secciones longitudinales de arco aórtico. También se pudo evidenciar menor mineralización en las lesiones de las arterias braquiocefálicas de los animales transgénicos, aunque la incidencia de calcificación en este lecho vascular era mucho menor (10% en transgénicos y 20% en WT). Como se ha publicado, para conseguir un alto grado de mineralización en las arterias braquiocefálicas hubiera sido necesario alargar el experimento a un mínimo de 60 semanas (263). Finalmente, no pudimos evaluar si NOR-1 afecta a la calcificación de la raíz aórtica ya que en nuestro abordaje experimental no se detectó deposición de calcio en este lecho vascular.

Las lesiones ateroscleróticas de los ratones TgNOR-1^{CMLV} con menor área calcificada presentaban también menor nivel de expresión de marcadores de calcificación (RUNX2 y OPN), como habíamos observado en las lesiones ateroscleróticas humanas. Coherentemente, se determinó que la sobreexpresión de NOR-1 reducía significativamente la expresión de OPN a nivel de ARNm y de proteína, tanto en inmunoblot como en inmunohistoquímica. Estos resultados evidencian que NOR-1 ejerce una regulación sobre la OPN opuesta a la descrita para Nurr1, que ejerce una regulación positiva sobre el promotor de este gen (253).

La sobreexpresión de NOR-1 no solo redujo los marcadores osteogénicos, sino que alteró el remodelado de la MEX. La MEX es muy importante en el proceso de calcificación vascular ya que no sólo actúa como sustrato para la deposición de calcio, sino que se comporta como una entidad activa que modula la transdiferenciación osteogénica y la mineralización (233,264,265). De hecho, nuestro grupo ya había descrito una asociación entre la calcificación, el colágeno y los enzimas que se encargan de su entrecruzamiento (233). Observamos una reducción del entrecruzamiento de colágeno y menor contenido de glucosaminoglicanos en las lesiones ateroscleróticas de los animales transgénicos. Ambas características se relacionan con el retraso en la formación de nódulos fibroadiposos que preceden a la mineralización de las placas (263). En efecto, las lesiones ateroscleróticas de los ratones WT se caracterizaban por presentar elevado contenido de glucosaminoglicanos y un alto grado de entrecruzamiento de las fibras de colágeno. En cambio, no detectamos diferencias en la expresión de la enzima MMP2 en las placas ateroscleróticas entre ambos genotipos. En este contexto, algunos estudios han descrito que los receptores NR4A limitan la fibrosis ya que regulan negativamente la expresión de colágenos y por lo tanto la producción de MEX (266,267).

En resumen, la sobreexpresión del factor de transcripción NOR-1 disminuye la calcificación de células en cultivo y la calcificación asociada a la aterosclerosis inducida por la hiperlipidemia. Parece que NOR-1 no sólo afectaría a la expresión génica relacionada con la transdiferenciación osteogénica de las VICs y las CMLVs sino también a la organización de la MEX. Sería interesante continuar con esta línea de investigación para caracterizar mejor los mecanismos moleculares y los genes/proteínas regulados por NOR-1 críticos en este proceso, ya que podrían ser potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento de la calcificación cardiovascular.

2. Mecanismos que involucran a la LOX con la aterosclerosis y la calcificación cardiovascular

En la calcificación cardiovascular las válvulas experimentan importantes cambios fenotípicos ya que se engrosan, aumentan su rigidez y mineralizan. Todo ello desencadena cambios hemodinámicos con consecuencias catastróficas que conducen a la insuficiencia cardíaca, una enfermedad que si no se interviene de forma temprana puede producir la muerte a corto plazo (268). Por ello, se considera que la calcificación es un buen indicador de eventos cardiovasculares futuros y supone un gran problema de salud (269). Además, la mineralización de la pared vascular es un proceso activo y altamente regulado en el cual participan vías de señalización similares a las de la formación del hueso (270). En particular, la MEX juega un papel crucial en la patogénesis de la calcificación no sólo actúa como soporte pasivo para la deposición mineral sino como una entidad activa que participa en la señalización (264). Concretamente, se ha descrito que el colágeno tipo I, componente principal de la MEX, es un factor condicionante de la mineralización (270–273) que interviene como mediador de la señalización que dirige la distribución, la agregación y la nucleación de las vesículas que promueven la transdiferenciación de CMLVs a células con fenotipo osteoblástico (270). El mecanismo exacto por el cual las fibras de colágeno favorecen la mineralización se desconoce. Sin embargo, algunos autores apuestan por la contribución de los aminoácidos expuestos dentro y entre las fibras de colágeno como posibles reguladores del proceso. A su vez, la organización de sus fibrillas también puede favorecer la nucleación de los cristales de hidroxapatita (270). En este contexto, destaca la actividad LOX que cataliza la conversión de los residuos de lisina e hidroxilisina en aldehídos lo que desencadena el entrecruzamiento de las fibrillas de colágeno, y contribuye a la maduración de la MEX (183,270). Parece existir una estrecha relación entre la calcificación y la actividad LOX. Así, nuestro grupo describió que la LOX sería un factor crítico en la deposición de calcio y la transdiferenciación osteoblástica (183,233). Análogamente, otros estudios sugieren que el colágeno, y, sobre todo, su modificación post-traducciona favorece la mineralización ectópica (270,274).

La calcificación de las válvulas comparte mecanismos con la aterosclerosis como la infiltración lipídica y la inflamación (275). También se ha descrito una estrecha relación entre este tipo de calcificación y la fibrosis que experimenta el tejido (275). En este contexto, cobra especial importancia la LOX que al catalizar el entrecruzamiento de colágeno participa en el desarrollo de la fibrosis en una gran variedad de enfermedades (183,185). Sin embargo, existen muy pocos estudios que hayan analizado la contribución de la LOX a la

mineralización de VICs. Un trabajo previo que analizó los niveles de expresión de LOX en válvulas sanas y calcificadas, no halló diferencias significativas (276). Análisis histológicos, sin embargo, mostraron mayor expresión de la LOX en la capa fibrosa de válvulas calcificadas (276). En nuestro estudio nos propusimos analizar válvulas calcificadas de dos cohortes independientes de pacientes. Una de las cohortes, formada por muestras de pacientes del Hospital Universitario de Navarra, estaba compuesta por válvulas calcificadas procedentes de individuos con estenosis aórtica y por válvulas sanas de autopsias. El análisis de expresión evidenció que las válvulas calcificadas presentaban mayor expresión de todos los miembros de la familia de lisil oxidasas, siendo la LOX la enzima con mayor expresión. LOX también fue la isoenzima más expresada en las válvulas sanas. Al analizar la expresión de estas isoenzimas en las diferentes regiones de la válvula, la LOX fue el único miembro de esta familia que presentó diferencias de expresión entre la región muy calcificada y la poco calcificada. Estos resultados sugieren que la LOX podría jugar un papel más destacado que las LOXLs en el proceso de calcificación, por lo que, nuestras siguientes investigaciones se centraron exclusivamente en la LOX. En el análisis de la segunda cohorte, compuesta por muestras de válvulas de pacientes intervenidos en cirugías de reemplazo valvular en el HSCSP que incluye válvulas poco y muy calcificadas, observamos un incremento de la expresión de la LOX en las válvulas con mayor grado de calcificación. Además, éstas presentaban niveles más elevados de los marcadores osteogénicos, RUNX2 y OPN. Los análisis histológicos evidenciaron resultados coherentes ya que se detectó una fuerte expresión de LOX en zonas próximas a los núcleos de calcificación (zonas von Kossa positivas) donde colocalizaba con células positivas para RUNX2 y vimentina. Los análisis en cortes de válvulas poco calcificadas revelaron escasa tinción para LOX y RUNX2. Estos resultados ponen de manifiesto una asociación entre el grado de calcificación y el incremento de expresión de la LOX. Se ha descrito una relación entre el desarrollo de CCV con niveles elevados de ROS. El estrés oxidativo parece activar vías de señalización que favorecen la transdiferenciación osteoblástica y aceleran la mineralización (277–280). La actividad LOX contribuye a la generación de ROS (281–283). Observamos que las válvulas con mayor grado de calcificación y mayor expresión de LOX también tenían más estrés oxidativo que las válvulas poco calcificadas, lo que sugiere que la actividad LOX podría contribuir también al desarrollo de la calcificación valvular a través del aumento del estrés oxidativo.

Seguidamente, quisimos estudiar si la LOX está implicada en la calcificación de las VICs inducida por un medio rico en fosfato. Detectamos que la deposición de calcio se acompañaba por un incremento significativo de la secreción de LOX al medio de cultivo. Mediante estrategias de pérdida y ganancia de función pudimos confirmar la implicación activa de la LOX en la

Discusión

mineralización de la MEX. Así, la inhibición irreversible de la actividad LOX mediante BAPN, disminuyó la deposición de calcio. En cambio, su sobreexpresión promovió el efecto contrario ya que las células con mayor expresión de LOX presentaban una mineralización de la MEX más exacerbada. Estos resultados son coherentes y expanden los resultados previos de nuestro grupo que mostraban la contribución de la LOX a la calcificación de CMLVs humanas y murinas en cultivo (233).

Además, quisimos evaluar las características estructurales del colágeno depositado en la MEX de las VICs calcificadas. Las células expuestas a medio de calcificación que secretaban niveles elevados de LOX también presentaban mayor deposición y organización de colágeno, es decir, generaban MEX más madura. Las estrategias de pérdida y ganancia de función de LOX confirmaron su impacto en la deposición de colágeno. Así, la inhibición de la actividad LOX en células expuestas a medio de calcificación redujo de manera significativa la organización de las fibrillas de colágeno. En cambio, su sobreexpresión desencadenó el efecto contrario con una mayor deposición y organización del colágeno. Por lo tanto, la LOX es clave en la organización del colágeno de la MEX que a su vez resulta crítica en el inicio y nucleación de los cristales de hidroxiapatita (270).

En los últimos años, se han atribuido nuevas funciones a la LOX relacionadas con la existencia de formas nucleares y citosólicas activas (183,284–286). En este sentido, realizamos estudios con matrices obtenidas a partir de cultivos decelularizados, en las que previamente se había inhibido o sobreexpresado LOX, para evaluar la capacidad de inducir la transdiferenciación osteoblástica y la mineralización de la MEX. Así, las VICs sembradas sobre matrices generadas por células en las que se había inhibido la actividad LOX con BAPN evidenciaron una disminución de la deposición de calcio. En cambio, en las VICs sembradas sobre la MEX producida por células que sobreexpresaban LOX, matrices más entrecruzadas, se favoreció la nucleación y la propagación de la mineralización. De esta manera se establece una estrecha relación entre la deposición de calcio y la maduración de la MEX mediada por la LOX (182,281,287). Puesto que la actividad LOX conduce a una mayor rigidez de la matriz, estos resultados son coherentes con la calcificación espontánea observada en VICs porcinas cultivadas sobre sustratos rígidos (288,289). De hecho, algunos autores realizaron un abordaje similar en el cual evaluaron la transdiferenciación de las CMLVs sembradas sobre matrices calcificadas en el que se evidenció una mayor expresión de OPN y una menor expresión de α -SMA (290). Así, se confirmó la capacidad de la MEX para regular y promover la transdiferenciación de las células lo que subraya que la MEX no es un mero soporte estructural.

Además, demostramos que es la forma activa de LOX la que tiene un impacto en la mineralización de la MEX. Para ello, indujimos calcificación a las VICs con medio osteogénico suplementado con medio condicionado de células que sobreexpresaban LOX. La adición de esta enzima en el medio de calcificación exacerbó la mineralización de la MEX. Estos resultados confirmaron que la forma extracelular y activa de la LOX presenta propiedades procalcificantes. Por lo tanto, nuestros resultados indican que el remodelado de la MEX dependiente de la actividad LOX es clave en la propensión de las VICs a experimentar calcificación.

En los últimos años, nuestro grupo ha descrito el papel de la LOX en diferentes mecanismos relacionados con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares como la disfunción endotelial y el remodelado cardiovascular (183). En el contexto de la aterosclerosis, la alteración de la actividad LOX puede afectar a prácticamente todas las etapas del proceso aterosclerótico (183,184). De hecho, hemos descrito la participación de la LOX en el control de la homeostasis endotelial, la proliferación de las CMLVs y el engrosamiento de la capa íntima, así como su contribución al estrés oxidativo y la rigidez vascular en la hipertensión (221,222,281,282,291). Asimismo, en especímenes humanos obtenidos por endarterectomía carotídea se detectó una mayor expresión de LOX en las áreas con fibrogénesis activa en consonancia con la suposición que la mayor actividad LOX y el consiguiente aumento del entrecruzamiento del colágeno podrían favorecer la estabilización de las lesiones (292). En concordancia, nuestro grupo describió un incremento de la expresión de LOX en lesiones ateroscleróticas avanzadas de arterias femorales que correlacionó de manera positiva y muy significativa con el grado de calcificación de las arterias (233). En este contexto, este estudio confirmó estos hallazgos en lesiones ateroscleróticas humanas calcificadas de arteria femoral y arterias coronarias. Cabe destacar que el estudio de la calcificación de las arterias coronarias es de gran importancia e interés biomédico ya que el “score” de calcio se ha usado como indicador predictivo de eventos cardiovasculares graves futuros desde 1940 (55,67). El análisis de arterias femorales y coronarias humanas calcificadas reveló un incremento de la LOX en CMLVs positivas para RUNX2 en zonas adyacentes a la calcificación (regiones von Kossa positivas), lo que vincula la inducción de LOX con la transdiferenciación osteoblástica mediada por RUNX2. Estos resultados refuerzan y expanden los datos publicados por nuestro grupo en los que se evidenció que la LOX favorecía la transdiferenciación osteogénica de las CMLVs (233).

Estos estudios, sin embargo, no demuestran hasta qué punto la LOX *per se* podría afectar a la aterosclerosis y a la calcificación de las lesiones. Resultados

Discusión

previos sugerían que el desarrollo de aterosclerosis en ratones ApoE^{-/-} se acompañaba por un aumento de la rigidez arterial y que la inhibición de LOX atenúa la rigidez y limita la aterosclerosis (227). Cabe señalar, sin embargo, que la propia ApoE inhibe la expresión de LOX en CMLVs y que este mecanismo parece contribuir a mantener una correcta elasticidad vascular y a proteger el vaso de la aterosclerosis (227). Por lo tanto, la interferencia directa de la ApoE en la expresión de LOX descarta al ratón deficiente en ApoE como modelo adecuado para analizar el papel de LOX en la aterosclerosis y cuestiona la relevancia traslacional de los resultados previos en este modelo que vinculan la LOX y la aterosclerosis.

Debido a la disponibilidad de un ratón transgénico desarrollado por nuestro grupo que sobreexpresa la LOX en CMLVs (TgLOX^{CMLV}) consideramos conveniente este modelo para estudiar el papel de esta enzima en la aterosclerosis. Con esta finalidad, indujimos aterosclerosis e hiperlipidemia a los ratones WT y TgLOX^{CMLV} mediante la inyección intravenosa de AAV-PCSK9^{D374Y} junto a una dieta aterogénica, una estrategia previamente validada para el estudio de la calcificación cardiovascular (239,259,260) y que resultó eficaz en nuestro modelo TgNOR-1^{CMLV}. Se comprobaron los niveles plasmáticos de la proteína PCSK9 humana en los grupos a los que se administró AAV-PCSK9^{D374Y} que evidenciaron su incremento desde la primera semana del experimento tanto en ratones TgLOX^{CMLV} como en WT sin diferencias entre ellos. Además, se confirmó la eficacia de ganancia de función de la PCSK9^{D374Y} ya que se redujeron de manera drástica los niveles de LDLR hepáticos y se desencadenó hiperlipidemia en ambos grupos experimentales, manifiesta ya desde la primera semana de la inducción. El seguimiento del peso corporal evidenció un incremento progresivo semanal en los cuatro grupos experimentales (salino o PCSK9^{D374Y}) sometidos a dieta rica en grasa sin diferencias entre ellos.

La ultrasonografía de los animales después de 20 semanas de haber iniciado el tratamiento confirmó la presencia de lesiones ateroscleróticas en la región del arco aórtico en animales WT y TgLOX^{CMLV} transducidos con PCSK9^{D374Y} y sometidos a dieta rica en grasa. De hecho, el diámetro de la luz del vaso de la arteria braquiocefálica disminuyó significativamente respecto al tiempo inicial en ambos grupos, lo que confirmaba la presencia de lesiones. Evaluamos con mayor detalle la aterosclerosis en la aorta de animales WT y TgLOX^{CMLV} mediante la tinción O.R.O. Observamos que la transgénesis de LOX exacerbó el desarrollo de lesiones ateroscleróticas a lo largo de la aorta, específicamente en la región abdominal. Al analizar cortes de raíces aórticas, de arterias braquiocefálicas y de arcos aórticos en el plano longitudinal no detectamos cambios en el área de la lesión lo que parecía coherente con los

resultados observados en las aortas *en face* ya que las diferencias se focalizaban en la región abdominal de la aorta.

Sin embargo, la sobreexpresión de LOX sí que afectó a las características de las lesiones ateroscleróticas. Las placas de los ratones TgLOX^{CMLV} presentaban significativamente mayor contenido inflamatorio (MCP1 y CD68). Además, la cubierta fibrosa de las arterias TgLOX^{CMLV} fue significativamente más gruesa lo que en principio podría relacionarse con estudios que asocian la mayor expresión de LOX con una mayor estabilidad de las lesiones ateroscleróticas (292). Sin embargo, pese a esta cubierta más gruesa y al mayor contenido en CMLVs, las lesiones de los animales transgénicos mostraban mayor infiltrado inflamatorio que podría aumentar la vulnerabilidad de las placas.

Finalmente, evaluamos la calcificación asociada a la aterosclerosis de los animales WT y TgLOX^{CMLV}. Tradicionalmente, se ha utilizado la tinción von Kossa para detectar la calcificación ectópica en tejidos blancos, sin embargo, aunque detecta fosfato no es una tinción específica para hidroxapatita. El uso del marcador fluorescente OsteoSense 680 EX es una técnica alternativa y muy sensible que permite la detección y cuantificación de la mineralización en el tejido debido a su afinidad por la hidroxapatita (293,294). En nuestro estudio, administramos este marcador fluorescente por vía intravenosa 24 horas antes del sacrificio y posteriormente medimos la intensidad de la fluorescencia emitida por la sonda a nivel de la aorta. El marcaje con la sonda OsteoSense 680 EX evidenció que la transgénesis de LOX exacerba la calcificación medida por la señal NIRF. Asimismo, utilizamos esta sonda en secciones longitudinales de arco aórtico y de arteria braquiocéfálica en las que se observó un incremento significativo del área calcificada en las lesiones de los animales TgLOX^{CMLV}. Resultados similares se obtuvieron tras la tinción de von Kossa. En concordancia con estos resultados, estudios recientes en un modelo experimental de inducción de calcificación de la media por warfarina revelaron que la LOX estaba presente cerca de las áreas calcificadas y que su inhibición disminuyó significativamente la mineralización (265). Por lo tanto, la LOX parece tener un papel importante en la calcificación tanto de la media como de la íntima.

Diversos estudios han evidenciado la estrecha relación entre la inflamación y la calcificación vascular. La inflamación precede a la deposición de calcio, tanto en la patología humana como en modelos animales, lo que sugiere que la respuesta inflamatoria dirige la calcificación (37,295–297). En este sentido, nuestros resultados indican que la sobreexpresión de LOX además de asociarse con una mayor calcificación se relaciona con un mayor infiltrado inflamatorio de las lesiones. Sin embargo, nuestros resultados obtenidos a tiempo final no nos permiten establecer una relación temporal de estos procesos. La LOX presenta

propiedades quimioatrayentes para monocitos y CMLVs (298–301). Así, la sobreexpresión de LOX favorecería el reclutamiento de monocitos y la migración de las CMLVs durante el desarrollo de aterosclerosis lo que explicaría el mayor infiltrado de macrófagos y el engrosamiento de la cubierta fibrosa con mayor contenido de CMLVs en las placas de los ratones TgLOX^{CMLV} que detectamos en nuestro estudio. Aunque existe cierto consenso acerca de la capacidad de la LOX para inhibir la proliferación de CMLVs nuestros resultados indican que *in vivo* en este modelo de aterosclerosis prevalecería el efecto quimiotáctico de la LOX frente al efecto antiproliferativo para CMLVs (183).

Por último, cabe resaltar que la sobreexpresión de LOX favoreció un mayor grado de entrecruzamiento de colágeno y un contenido más elevado de glucosaminoglicanos en la MEX, propiedades que predisponen a la calcificación vascular. Así las lesiones de animales transgénicos presentan una MEX más madura que favorece la mineralización. Coherentemente, estudios previos de nuestro grupo mostraron que la calcificación de las CMLVs se acompaña por una mayor deposición de colágeno en sus formas más insolubles asociado a la inducción de la lisil hidroxilasa 1 y la LOX, implicadas en su procesamiento post-traduccional para generar una MEX madura e insoluble (233). De hecho, las CMLVs aisladas de animales TgLOX^{CMLV} exhibieron mayor deposición de colágeno en la MEX lo que favoreció la mineralización e indujo la expresión de los marcadores osteogénicos (233). Por lo tanto, los resultados obtenidos en nuestro modelo de inducción de aterosclerosis y calcificación vascular en ratones TgLOX^{CMLV} subrayan la importancia de la MEX en la mineralización y enfatizan el interés de la LOX como potencial diana terapéutica en la calcificación de la íntima asociada a la aterosclerosis. Además, cabe destacar que la transgénesis de LOX desencadenó un incremento significativo de estrés oxidativo en las lesiones ateroscleróticas de la raíz aórtica, lo que corrobora los resultados observados en válvulas humanas y pone de manifiesto que la actividad LOX se podría vincular con la calcificación cardiovascular a través de diferentes mecanismos.

Por lo tanto, nuestro estudio proporciona evidencias tanto *in vitro* como *in vivo* sobre la contribución de la LOX a la CCV y cómo el remodelado de la MEX mediado por la LOX es determinante en la mineralización de la matriz y sugiere la participación de otros mecanismos influenciados por LOX como la inflamación vascular y el estrés oxidativo. Futuras investigaciones caracterizaran en profundidad los mecanismos moleculares que subyacen al impacto de LOX en la CCV, sin embargo, el presente estudio sugiere que la CCV podría controlarse modulando localmente la organización de la MEX que origina los focos de calcificación.

CONCLUSIONES

En relación al **primer objetivo** se concluye que:

1. Los niveles de NOR-1 están aumentados en válvulas aórticas y placas ateroscleróticas humanas calcificadas en las que NOR-1 colocaliza con RUNX2.
2. La expresión de NOR-1 aumenta al inducir la calcificación de células vasculares intersticiales (VICs) o células musculares lisas vasculares (CMLVs) humanas con medio rico en fosfato.
3. En VICs expuestas a medio rico en fosfato, NOR-1 reduce la expresión de marcadores osteogénicos y la mineralización de la matriz extracelular (MEX).
4. Al inducir calcificación, la expresión de marcadores de diferenciación osteogénica y la mineralización de la MEX de CMLVs y de anillos aórticos de ratones que sobreexpresan NOR-1 en estas células (TgNOR-1^{CMLV}) es menor que en células y anillos de animales control.
5. Al inducir aterosclerosis mediante la administración de AAV-PCSK9^{D374Y} y dieta aterogénica, los ratones TgNOR-1^{CMLV} desarrollan menos aterosclerosis en la aorta, y lesiones de menor tamaño con menor infiltrado inflamatorio que los animales control.
6. Las placas ateroscleróticas de los ratones TgNOR-1^{CMLV} están menos calcificadas y presentan menor expresión de marcadores osteogénicos, menor grado de entrecruzamiento del colágeno y menor contenido de glucosaminoglicanos que las de los animales control.

Con relación al **segundo objetivo** se concluye que:

1. La expresión de LOX está aumentada en válvulas aórticas calcificadas y placas ateroscleróticas humanas en las que LOX colocaliza con RUNX2.
2. Al inducir calcificación de las VICs con medio rico en fosfato aumenta la secreción de LOX que promueve la maduración de la MEX y su mineralización de forma dependiente de su actividad catalítica.
3. Al inducir aterosclerosis mediante la administración de AAV-PCSK9^{D374Y} y dieta aterogénica, los ratones que sobreexpresan LOX en las CMLVs (TgLOX^{CMLV}) desarrollan más aterosclerosis en la aorta, y lesiones con mayor

Conclusiones

infiltrado inflamatorio, pero con una cubierta fibrosa más rica en CMLVs y más engrosada.

4. Las placas ateroscleróticas de los ratones TgLOX^{CMLV} están más calcificadas y presentan mayor expresión de marcadores osteogénicos, mayor grado de entrecruzamiento de colágeno y mayor contenido de glucosaminoglicanos que las de los animales control.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fuster V, Narula J. *Fuster and Hurst's The Heart, 15th Edition*. McGraw-Hill Education; 2022. <https://books.google.es/books?id=Zu-yzgEACAAJ>
2. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol*. 2020;76(25):2982-3021. doi:10.1016/J.JACC.2020.11.010/SUPPL_FILE/MMC3.DOCX
3. Schaftenaar F, Frodermann V, Kuiper J, Lutgens E. Atherosclerosis: The interplay between lipids and immune cells. *Curr Opin Lipidol*. 2016;27(3):209-215. doi:10.1097/MOL.0000000000000302
4. Falk E. Pathogenesis of Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47(8 SUPPL.):C7-C12. doi:10.1016/J.JACC.2005.09.068
5. Fan J, Watanabe T. Atherosclerosis: Known and unknown. *Pathol Int*. 2022;72(3):151-160. doi:10.1111/PIN.13202
6. Jebari-Benslainan S, Galicia-García U, Larrea-Sebal A, et al. Pathophysiology of Atherosclerosis. *Int J Mol Sci*. 2022;23(6):3346. doi:10.3390/ijms23063346
7. Libby P, Buring JE, Badimon L, et al. Atherosclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2019;5(1):56. doi:10.1038/S41572-019-0106-Z
8. Li JJ, Fang CH. Atheroscleritis is a more rational term for the pathological entity currently known as atherosclerosis. *Med Hypotheses*. 2004;63(1):100-102. doi:10.1016/j.mehy.2004.01.029
9. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407(6801):233-241. doi:10.1038/35025203
10. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011 473:7347. 2011;473(7347):317-325. doi:10.1038/NATURE10146
11. Jani B, Rajkumar C. Ageing and vascular ageing. *Postgrad Med J*. 2006;82(968):357-362. doi:10.1136/PGMJ.2005.036053
12. Britannica TE of E. artery. In: *Encyclopedia Britannica*. ; 2023. <https://www.britannica.com/science/artery>
13. Pescetelli I, Zimarino M, Ghirarduzzi A, De Caterina R. Localizing factors in atherosclerosis. *Journal of Cardiovascular Medicine*. 2015;16(12):824-830. doi:10.2459/JCM.0000000000000224

Bibliografía

14. Kobiyama K, Ley K. Atherosclerosis: A Chronic Inflammatory Disease with an Autoimmune Component. *Circ Res.* 2018;123(10):1118-1120. doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.313816
15. Libby P. The changing landscape of atherosclerosis. *Nature* . 2021;592(7855):524-533. doi:10.1038/S41586-021-03392-8
16. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 1994;89(5):2462-2478. doi:10.1161/01.CIR.89.5.2462
17. DeGraba TJ. Immunogenetic susceptibility of atherosclerotic stroke: Implications on current and future treatment of vascular inflammation. *Stroke.* 2004;35(11 SUPPL. 1):2712-2719. doi:10.1161/01.STR.0000143788.87054.85/FORMAT/EPUB
18. Bacakova L, Travnickova M, Filova E, et al. The Role of Vascular Smooth Muscle Cells in the Physiology and Pathophysiology of Blood Vessels. In: Sakuma K, ed. *Muscle Cell and Tissue.* IntechOpen; 2018. doi:10.5772/intechopen.77115
19. Basatemur GL, Jørgensen HF, Clarke MCH, Bennett MR, Mallat Z. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology* . 2019;16(12):727-744. doi:10.1038/S41569-019-0227-9
20. Neels JG, Leftheriotis G, Chinetti G. Atherosclerosis Calcification: Focus on Lipoproteins. *Metabolites.* 2023;13(3):457. doi:10.3390/metabo13030457
21. Lee SJ, Lee IK, Jeon JH. Molecular Sciences Vascular Calcification-New Insights into Its Mechanism. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8):2685. doi:10.3390/ijms21082685
22. Ceccherini E, Cecchetti A, Gisone I, Persiani E, Morales MA, Vozzi F. Vascular Calcification: In Vitro Models under the Magnifying Glass. *Biomedicines.* 2022;10(10):2491. doi:10.3390/BIOMEDICINES10102491
23. Villa-Bellosta R. Vascular Calcification: Key Roles of Phosphate and Pyrophosphate. *Int J Mol Sci.* 2021;22(24):13536. doi:10.3390/ijms222413536
24. Singh A, Tandon S, Tandon C. An update on vascular calcification and potential therapeutics. *Mol Biol Rep.* 2021;48:887-896. doi:10.1007/S11033-020-06086-Y/FIGURES/1

25. Karwowski W, Naumnik B, Szczepański M, Myśliwiec M. The mechanism of vascular calcification—a systematic review. *Med Sci Monit.* 2012;18(1):RA1.
26. Zaker B, Ardalan M. Vascular calcification; Stony bridge between kidney and heart. *J Cardiovasc Thorac Res.* 2020;12(3):165-171. doi:10.34172/jcvtr.2020.29
27. Quaglino D, Boraldi F, Lofaro FD. The biology of vascular calcification. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2020;354:261-353. doi:10.1016/bs.ircmb.2020.02.007
28. Nakahara T, Dweck MR, Narula N, Pisapia D, Narula J, Strauss HW. Coronary Artery Calcification: From Mechanism to Molecular Imaging. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2017;10(5):582-593. doi:10.1016/j.JCMG.2017.03.005
29. Cheong BYC, Wilson JM, Spann SJ, Pettigrew RI, Preventza OA, Muthupillai R. Coronary artery calcium scoring: an evidence-based guide for primary care physicians. *J Intern Med.* 2021;289(3):309-324. doi:10.1111/joim.13176
30. Leopold JA. Vascular Calcification: Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Cell Calcification. *Trends Cardiovasc Med.* 2015;25(4):267-274. doi:10.1016/j.tcm.2014.10.021
31. Liu W, Zhang Y, Yu CM, et al. Current understanding of coronary artery calcification. *Journal of Geriatric Cardiology.* 2015;12(6):668-675. doi:10.11909/j.issn.1671-5411.2015.06.012
32. Chen NX, Moe SM. Vascular Calcification: Pathophysiology and Risk Factors. *Curr Hypertens Rep.* 2012;14(3):228-237. doi:10.1007/s11906-012-0265-8
33. Savoia C, Burger D, Nishigaki N, Montezano A, Touyz RM. Angiotensin II and the vascular phenotype in hypertension. *Expert Rev Mol Med.* 2011;13:e11. doi:10.1017/S1462399411001815
34. Armstrong ZB, Boughner DR, Drangova M, Rogers KA. Angiotensin II type 1 receptor blocker inhibits arterial calcification in a pre-clinical model. *Cardiovasc Res.* 2011;90(1):165-170. doi:10.1093/cvr/cvq391
35. Mosch J, Gleissner CA, Body S, Aikawa E. Histopathological assessment of calcification and inflammation of calcific aortic valves from patients with and without diabetes mellitus. *Histol Histopathol.* 2017;32(3):293-306. doi:10.14670/HH-11-797

Bibliografía

36. Chen NX, Duan D, O'Neill KD, Moe SM. High glucose increases the expression of Cbfa1 and BMP-2 and enhances the calcification of vascular smooth muscle cells. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2006;21(12):3435-3442. doi:10.1093/NDT/GFL429
37. Aikawa E, Nahrendorf M, Figueiredo JL, et al. Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation*. 2007;116(24):2841-2850. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.732867
38. Chao C Ter, Yeh HY, Tsai YT, et al. Natural and non-natural antioxidative compounds: potential candidates for treatment of vascular calcification. *Cell Death Discovery* . 2019;5:145. doi:10.1038/s41420-019-0225-z
39. Sutra T, Morena M, Bargnoux AS, Caporiccio B, Canaud B, Cristol JP. Superoxide production: A procalcifying cell signalling event in osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells exposed to calcification media. *Free Radic Res*. 2008;42(9):789-797. doi:10.1080/10715760802400766
40. Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification: Pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res*. 2006;99(10):1044-1059. doi:10.1161/01.RES.0000249379.55535.21/FORMAT/EPUB
41. Demer LL. Vascular calcification and osteoporosis: inflammatory responses to oxidized lipids. *Int J Epidemiol*. 2002;31(4):737-741. doi:10.1093/IJE/31.4.737
42. Sakata N, Noma A, Yamamoto Y, et al. Modification of elastin by pentosidine is associated with the calcification of aortic media in patients with end-stage renal disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2003;18(8):1601-1609. doi:10.1093/NDT/GFG200
43. Jono S, McKee MD, Murry CE, et al. Phosphate Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Calcification. *Circ Res*. 2000;87(7):e10-e17. doi:10.1161/01.RES.87.7.E10
44. Krohn JB, Hutcheson JD, Martínez-Martínez E, Aikawa E. Extracellular vesicles in cardiovascular calcification: expanding current paradigms. *J Physiol*. 2016;594(11):2895-2903. doi:10.1113/JP271338
45. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, et al. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: A potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *Journal of the*

- American Society of Nephrology*. 2004;15(11):2857-2867. doi:10.1097/01.ASN.0000141960.01035.28
46. Ohtake T, Kobayashi S. Impact of vascular calcification on cardiovascular mortality in hemodialysis patients: clinical significance, mechanisms and possible strategies for treatment. *Renal Replacement Therapy* . 2017;3(1):1-11. doi:10.1186/S41100-017-0094-Y
 47. Bhadada SK, Rao SD. Role of Phosphate in Biomineralization. *Calcif Tissue Int*. 2021;108:32-40. doi:10.1007/S00223-020-00729-9/TABLES/3
 48. Kirsch T. Biomineralization-an active or passive process? *Connect Tissue Res*. 2012;53(6):438-445. doi:10.3109/03008207.2012.730081
 49. Disthabanchong S. Vascular calcification in chronic kidney disease: Pathogenesis and clinical implication. *World J Nephrol*. 2012;1(2):43-53. doi:10.5527/wjn.v1.i2.43
 50. Demer LL, Tintut Y. Inflammatory, metabolic, and genetic mechanisms of vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(4):715-723. doi:10.1161/ATVBAHA.113.302070
 51. Bakhshian Nik A, Hutcheson JD, Aikawa E. Extracellular Vesicles As Mediators of Cardiovascular Calcification. *Front Cardiovasc Med*. 2017;4:78. doi:10.3389/FCVM.2017.00078/BIBTEX
 52. Anderson HC, Sipe JB, Hessle L, et al. Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice. *Am J Pathol*. 2004;164(3):841-847.
 53. Zhu D, Mackenzie NCW, Farquharson C, Macrae VE, Fraser WD, Rosengren BE. Mechanisms and clinical consequences of vascular calcification. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:95. doi:10.3389/fendo.2012.00095
 54. Patel NJ, Ashraf A, Chung EJ. Extracellular Vesicles as Regulators of the Extracellular Matrix. *Bioengineering*. 2023;10(2):136. doi:10.3390/bioengineering10020136
 55. Chao C Ter, Hung KY. Vascular frailty, a proposal for new frailty type: A narrative review. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. 2023;39(4):318-325. doi:10.1002/kjm2.12664
 56. Alexopoulos N, Raggi P. Calcification in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6(11):681-688. doi:10.1038/nrcardio.2009.165

Bibliografía

57. Zhu Y, Han XQ, Sun XJ, Yang R, Ma WQ, Liu NF. Lactate accelerates vascular calcification through NR4A1-regulated mitochondrial fission and BNIP3-related mitophagy. *Apoptosis*. 2020;25(5-6):321-340. doi:10.1007/s10495-020-01592-7
58. Jinnouchi H, Sato Y, Sakamoto A, et al. Calcium deposition within coronary atherosclerotic lesion: Implications for plaque stability. *Atherosclerosis*. 2020;306:85-95. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2020.05.017
59. Otsuka F, Sakakura K, Yahagi K, Joner M, Virmani R. Has Our Understanding of Calcification in Human Coronary Atherosclerosis Progressed? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(4):724-736. doi:10.1161/ATVBAHA.113.302642
60. Toussaint ND, Kerr PG. Vascular calcification and arterial stiffness in chronic kidney disease: Implications and management. *Nephrology*. 2007;12(5):500-509. doi:10.1111/J.1440-1797.2007.00823.X
61. Goody PR, Hosen MR, Christmann D, et al. Aortic valve stenosis: From basic mechanisms to novel therapeutic targets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;40(4):885-900. doi:10.1161/ATVBAHA.119.313067/FORMAT/EPUB
62. Abramowitz Y, Jilaihawi H, Chakravarty T, Mack MJ, Makkar RR. Mitral Annulus Calcification. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66(17):1934-1941. doi:10.1016/J.JACC.2015.08.872
63. Murshed M, Schinke T, Mckee MD, Karsenty G. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J Cell Biol*. 2004;165(5):625-630. doi:10.1083/jcb.200402046
64. Smith ER, Hewitson TD, Holt SG. Diagnostic Tests for Vascular Calcification. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2019;26(6):445-463. doi:10.1053/J.ACKD.2019.07.001
65. Greenland P, Blaha MJ, Budoff MJ, Erbel R, Watson KE. Coronary Calcium Score and Cardiovascular Risk. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72(4):434-447. doi:10.1016/j.jacc.2018.05.027
66. Raggi P, O'Neill WC. Imaging for Vascular Calcification. *Semin Dial*. 2017;30(4):347-352. doi:10.1111/sdi.12596
67. Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M, Detrano R. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol*. 1990;15(4):827-832. doi:10.1016/0735-1097(90)90282-T

68. Criqui MH, Denenberg JO, Ix JH, et al. Calcium Density of Coronary Artery Plaque and Risk of Incident Cardiovascular Events. *JAMA: the journal of the American Medical Association*. 2014;311(3):271-278. doi:10.1001/JAMA.2013.282535
69. Mukai H, Dai L, Chen Z, et al. Inverse J-shaped relation between coronary arterial calcium density and mortality in advanced chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2020;35(7):1202-1211. doi:10.1093/NDT/GFY352
70. Rocha-Singh KJ, Zeller T, Jaff MR. Peripheral Arterial Calcification: Prevalence, Mechanism, Detection, and Clinical Implications. *Catheterization and Cardiovascular Interventions*. 2014;83(6):E212-E220. doi:10.1002/ccd.25387
71. Lin YL, Hsu BG. Vitamin K and vascular calcification in chronic kidney disease: An update of current evidence. *Tzu Chi Med J*. 2023;35(1):44-50. doi:10.4103/tcmj.tcmj_100_22
72. Ghorbanihaghjo A, Argani H, Golmohamadi Z, et al. Linkage of Fibroblast Growth Factor 23 and Phosphate in Serum: Phosphate and Fibroblast Growth Factor 23 Reduction by Increasing Dose of Sevelamer. *J Bone Metab*. 2018;25(3):153-159. doi:10.11005/jbm.2018.25.3.153
73. O'Neill WC, Lomashvili KA. Recent progress in the treatment of vascular calcification. *Kidney Int*. 2010;78(12):1232-1239. doi:10.1038/KI.2010.334
74. Balint E, Marshall CF, Sprague SM. Effect of the vitamin D analogues paricalcitol and calcitriol on bone mineral in vitro. *Am J Kidney Dis*. 2000;36(4):789-796. doi:10.1053/ajkd.2000.17667
75. Shen Y. Role of nutritional vitamin D in chronic kidney disease-mineral and bone disorder: A narrative review. *Medicine (Baltimore)*. 2023;102(14):e33477. doi:10.1097/MD.00000000000033477
76. Ferrer MD, Ketteler M, Tur F, et al. Characterization of SNF472 pharmacokinetics and efficacy in uremic and non-uremic rats models of cardiovascular calcification. *PLoS One*. 2018;13(5):e0197061. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0197061
77. Mazaira GI, Zgajnar NR, Lotufo CM, et al. The Nuclear Receptor Field: A Historical Overview and Future Challenges. *Nucl Receptor Res*. 2018;5:101320. doi:10.11131/2018/101320

Bibliografía

78. Weikum ER, Liu X, Ortlund EA. The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein Sci.* 2018;27(11):1876-1892. doi:10.1002/pro.3496
79. Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. *Pharmacol Rev.* 2006;58(4):685-704. doi:10.1124/pr.58.4.2
80. Helsen C, Claessens F. Looking at nuclear receptors from a new angle. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;382(1):97-106. doi:10.1016/j.mce.2013.09.009
81. Martínez-González J, Cañes L, Alonso J, et al. NR4A3: A Key Nuclear Receptor in Vascular Biology, Cardiovascular Remodeling, and Beyond. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21):11371. doi:10.3390/IJMS222111371
82. McEwan IJ. Nuclear receptors: one big family. *Methods Mol Biol.* 2009;505:3-18. doi:10.1007/978-1-60327-575-0_1/FIGURES/3_1
83. Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell.* 2014;157(1):255-266. doi:10.1016/J.CELL.2014.03.012
84. Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. General Molecular Biology and Architecture of Nuclear Receptors. *Curr Top Med Chem.* 2012;12(6):486-504.
85. Patel SR, Skafar DF. Modulation of nuclear receptor activity by the F domain. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;418(3):298-305. doi:10.1016/j.mce.2015.07.009
86. Paulsen RE, Granas K, Johnsen H, Rolseth V, Sterri S. Three Related Brain Nuclear Receptors, NGFI-B, Nurrl, and NOR-1, as Transcriptional Activators. *Journal of Molecular Neuroscience.* 1995;6(4):249-255.
87. Medzikovic L, de Vries CJM, de Waard V. NR4A nuclear receptors in cardiac remodeling and neurohormonal regulation. *Trends Cardiovasc Med.* 2019;29(8):429-437. doi:10.1016/J.TCM.2018.11.015
88. Ballester-Servera C, Cañes L, Alonso J, et al. El receptor nuclear NOR-1 (Neuron-derived Orphan Receptor-1) en el remodelado vascular patológico. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis.* 2022;34:229-243. doi:10.1016/j.arteri.2022.03.002
89. Martínez-González J, Badimon L. The NR4A subfamily of nuclear receptors: new early genes regulated by growth factors in vascular cells. *Cardiovasc Res.* 2005;65(3):609-618. doi:10.1016/J.CARDIORES.2004.10.002

90. Safe S, Jin UH, Morpurgo B, Abudayyeh A, Singh M, Tjalkens RB. Nuclear Receptor 4A (NR4A) Family – Orphans No More. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016;157:48-60. doi:10.1016/J.JSBMB.2015.04.016
91. Martínez-González J, Rius J, Castelló A, Cases-Langhoff C, Badimon L. Neuron-Derived Orphan Receptor-1 (NOR-1) Modulates Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *Circ Res*. 2003;92(1):96-103. doi:10.1161/01.RES.0000050921.53008.47
92. Nomiyama T, Nakamachi T, Gizard F, et al. The NR4A orphan nuclear receptor NOR1 is induced by platelet-derived growth factor and mediates vascular smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem*. 2006;281(44):33467-33476. doi:10.1074/JBC.M603436200
93. Calvayrac O, Rodríguez-Calvo R, Martí-Pamies I, et al. NOR-1 modulates the inflammatory response of vascular smooth muscle cells by preventing NFκB activation. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;80:34-44. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.12.015
94. Rius J, Martínez-González J, Crespo J, Badimon L. Involvement of Neuron-Derived Orphan Receptor-1 (NOR-1) in LDL-Induced Mitogenic Stimulus in Vascular Smooth Muscle Cells: Role of CREB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(4):697-702. doi:10.1161/01.ATV.0000121570.00515.dc
95. Tsilingiri K, de la Fuente H, Relaño M, et al. Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor in Lymphocytes Prevents Atherosclerosis and Predicts Subclinical Disease. *Circulation*. 2019;139(2):243-255. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034326/FORMAT/EPUB
96. Pei L, Castrillo A, Chen M, Hoffmann A, Tontonoz P. Induction of NR4A orphan nuclear receptor expression in macrophages in response to inflammatory stimuli. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(32):29256-29262. doi:10.1074/JBC.M502606200
97. Rius J, Martínez-González J, Crespo J, Badimon L. NOR-1 is involved in VEGF-induced endothelial cell growth. *Atherosclerosis*. 2006;184(2):276-282. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2005.04.008
98. Terashima R, Laoharatchathanin T, Kurusu S, Kawaminami M. Sequential preovulatory expression of a gonadotropin-releasing hormone-inducible gene, Nr4a3, and its suppressor Anxa5 in the pituitary gland of female rats. *Journal of Reproduction and Development*. 2021;67(3):217-221.
99. Martorell L, Rius J, Crespo J, Badimon L, Rodríguez C, Martínez-González J. El neuron-derived orphan receptor-1 previene la apoptosis inducida por

Bibliografía

- la hipoxia en las células endoteliales vasculares. *Clinica e Investigacion en Arteriosclerosis*. 2010;22(2):39-48. doi:10.1016/j.arteri.2009.12.002
100. Martorell L, Martínez-González J, Crespo J, Calvayrac O, Badimon L. Neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) is induced by thrombin and mediates vascular endothelial cell growth. *J Thromb Haemost*. 2007;5(8):1766-1773. doi:10.1111/J.1538-7836.2007.02627.X
 101. Martorell L, Gentile M, Rius J, et al. The Hypoxia-Inducible Factor 1/NOR-1 Axis Regulates the Survival Response of Endothelial Cells to Hypoxia. *Mol Cell Biol*. 2009;29(21):5828-5842. doi:10.1128/MCB.00945-09
 102. Alonso J, Galán M, Martí-Pàmies I, et al. NOR-1/NR4A3 regulates the cellular inhibitor of apoptosis 2 (cIAP2) in vascular cells: role in the survival response to hypoxic stress. *Sci Rep*. 2016;6:34056. doi:10.1038/SREP34056
 103. Bandoh S, Tsukada T, Maruyama K, Ohkura N, Yamaguchi K. Mechanical agitation induces gene expression of NOR-1 and its closely related orphan nuclear receptors in leukemic cell lines. *Leukemia*. 1997;11(9):1453-1458. doi:10.1038/sj.leu.2400800
 104. Miyakoshi J, Tsukada T, Tachiiri S, Bandoh S, Yamaguchi K, Takebe H. Enhanced NOR-1 gene expression by exposure of Chinese hamster cells to high-density 50 Hz magnetic fields. *Mol Cell Biochem*. 1998;181(1-2):191-195. doi:10.1023/A:1006828400868
 105. Katagiri Y, Hirata Y, Milbrandt J, Guroff G. Differential regulation of the transcriptional activity of the orphan nuclear receptor NGFI-B by membrane depolarization and nerve growth factor. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(50):31278-31284. doi:10.1074/JBC.272.50.31278
 106. Medunjanin S, Daniel JM, Weinert S, et al. DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) permits vascular smooth muscle cell proliferation through phosphorylation of the orphan nuclear receptor NOR1. *Cardiovasc Res*. 2015;106(3):488-497. doi:10.1093/CVR/CVV126
 107. Kang SA, Na H, Kang HJ, Kim SH, Lee MH, Lee MO. Regulation of Nur77 protein turnover through acetylation and deacetylation induced by p300 and HDAC1. *Biochem Pharmacol*. 2010;80(6):867-873. doi:10.1016/j.bcp.2010.04.026
 108. Arredondo C, Orellana M, Vecchiola A, Pereira LA, Galdames L. PIAS γ enhanced SUMO-2 Modification of Nurr1 Activation-Function-1 Domain Limits Nurr1 Transcriptional Synergy. *PLoS One*. 2013;8(1):e55035. doi:10.1371/journal.pone.0055035

109. Herring JA, Alison WS, Tessem JS. Function of nr4a orphan nuclear receptors in proliferation, apoptosis and fuel utilization across tissues. *Cells*. 2019;8(11):1373. doi:10.3390/cells8111373
110. Ferrán B, Martí-Pàmies I, Alonso J, et al. The nuclear receptor NOR-1 regulates the small muscle protein, X-linked (SMPX) and myotube differentiation. *Sci Rep*. 2016;6:25944. doi:10.1038/SREP25944
111. Maxwell MA, Muscat GEO. The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. *Nucl Recept Signal*. 2006;4:e002. doi:10.1621/nrs.04002
112. Pearen MA, Eriksson NA, Fitzsimmons RL, et al. The Nuclear Receptor, Nor-1, Markedly Increases Type II Oxidative Muscle Fibers and Resistance to Fatigue. *J Mol Endocrinol*. 2012;26(3):372-384. doi:10.1210/me.2011-1274
113. Pearen MA, Goode JM, Fitzsimmons RL, et al. Transgenic Muscle-Specific Nor-1 Expression Regulates Multiple Pathways That Effect Adiposity, Metabolism, and Endurance. *Molecular Endocrinology*. 2013;27(11):1897-1917. doi:10.1210/me.2013-1205
114. Goode JM, Pearen MA, Tuong ZK, et al. The Nuclear Receptor, Nor-1, Induces the Physiological Responses Associated With Exercise. *J Mol Endocrinol*. 2016;30(6):660-676. doi:10.1210/me.2015-1300
115. Vacca M, Murzilli S, Salvatore L, et al. Neuron-derived orphan receptor 1 promotes proliferation of quiescent hepatocytes. *Gastroenterology*. 2013;144(7):1518-1529. doi:10.1053/J.GASTRO.2013.02.027
116. Hawk JD, Bookout AL, Poplawski SG, et al. NR4A nuclear receptors support memory enhancement by histone deacetylase inhibitors. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3593-3602. doi:10.1172/JCI64145
117. Pei L, Castrillo A, Tontonoz P. Regulation of Macrophage Inflammatory Gene Expression by the Orphan Nuclear Receptor Nur77. *Molecular Endocrinology*. 2006;20(4):786-794. doi:10.1210/ME.2005-0331
118. Crean D, Murphy E. Targeting NR4A Nuclear Receptors to Control Stromal Cell Inflammation, Metabolism, Angiogenesis, and Tumorigenesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* . 2021;9:589770. doi:10.3389/fcell.2021.589770
119. Qing H, Liu Y, Zhao Y, et al. Deficiency of the NR4A Orphan Nuclear Receptor NOR1 in Hematopoietic Stem Cells Accelerates Atherosclerosis. *Stem Cells*. 2014;32(9):2419-2429. doi:10.1002/stem.1747

Bibliografía

120. Chao LC, Bensinger SJ, Villanueva CJ, Wroblewski K, Tontonoz P. Inhibition of Adipocyte Differentiation by Nur77, Nurr1, and Nor1. *J Mol Endocrinol.* 2008;22(12):2596-2608. doi:10.1210/me.2008-0161
121. Veum VL, Dankel SN, Gjerde J, et al. The nuclear receptors NUR77, NURR1 and NOR1 in obesity and during fat loss. *Int J Obes.* 2012;36(9):1195-1202. doi:10.1038/ijo.2011.240
122. Fu Y, Luo L, Luo N, Zhu X, Garvey WT. NR4A orphan nuclear receptors modulate insulin action and the glucose transport system: Potential role in insulin resistance. *Journal of Biological Chemistry.* 2007;282(43):31525-31533. doi:10.1074/jbc.M701132200
123. Ji L, Gong C, Ge L, et al. Orphan nuclear receptor Nurr1 as a potential novel marker for progression in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Exp Ther Med.* 2017;13(2):551-559. doi:10.3892/etm.2016.3968
124. Chen J, López-Moyado IF, Seo H, et al. Nr4a transcription factors limit CAR T cell function in solid tumors. *Nature.* 2019;567(7749):530-534. doi:10.1038/s41586-019-0985-x
125. Decressac M, Volakakis N, Björklund A, Perlmann T. NURR1 in Parkinson disease - From pathogenesis to therapeutic potential. *Nat Rev Neurol.* 2013;9(11):629-636. doi:10.1038/nrneurol.2013.209
126. Wilson TE, Fahrner TJ, Johnston M, Milbrandt J. Identification of the DNA Binding Site for NGFI-B by Genetic Selection in Yeast. *Science (1979).* 1991;252(5010):1296-1300.
127. Philips A, Lesage S, Gingras R, et al. Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells. *Mol Cell Biol.* 1997;17(10):5946. doi:10.1128/MCB.17.10.5946
128. Maira M, Martens C, Philips A, Drouin J. Heterodimerization between Members of the Nur Subfamily of Orphan Nuclear Receptors as a Novel Mechanism for Gene Activation. *Mol Cell Biol.* 1999;19(11):7549-7557. doi:10.1128/MCB.19.11.7549/FORMAT/EPUB
129. Zetterström RH, Solomin L, Mitsiadis T, Olson L, Perlmann T. Retinoid X Receptor Heterodimerization and Developmental Expression Distinguish the Orphan Nuclear Receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1. *Molecular endocrinology.* 1996;10(12):1655-1666. Accessed February 20, 2023. <https://academic.oup.com/mend/article/10/12/1656/2713392>

130. Perlmann T, Jansson L. A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev.* 1995;9(7):769-782.
131. Ohkura N, Ito M, Tsukada T, Sasaki K, Yamaguchi K, Miki K. Structure, mapping and expression of a human NOR-1 gene, the third member of the Nur77/NGFI-B family. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1308:205-214.
132. Wansa KDSA, Harris JM, Yan G, Ordentlich P, Muscat GEO. The AF-1 Domain of the Orphan Nuclear Receptor NOR-1 Mediates Transactivation, Coactivator Recruitment, and Activation by the Purine Anti-metabolite 6-Mercaptopurine. *Journal of Biological Chemistry.* 2003;278(27):24776-24790. doi:10.1074/jbc.M300088200
133. Zhao Y, Bruemmer D. NR4A Orphan Nuclear Receptors in Cardiovascular Biology. *Drug Discov Today Dis Mech.* 2009;6(1-4):e43-e48. doi:10.1016/J.DDMEC.2009.06.001
134. Baker KD, Shewchuk LM, Kozlova T, et al. The Drosophila orphan nuclear receptor DHR38 mediates an atypical ecdysteroid signaling pathway. *Cell.* 2003;113(6):731-742. doi:10.1016/S0092-8674(03)00420-3
135. Wang Z, Benoit G, Liu J, et al. Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature .* 2003;423(6939):555-560. doi:10.1038/nature01645
136. Zhan Y, Du X, Chen H, et al. Cytosporone B is an agonist for nuclear orphan receptor Nur77. *Nature Chemical Biology .* 2008;4(9):548-556. doi:10.1038/NCHEMBIO.106
137. Jang Y, Kim W, Leblanc P, Kim CH, Kim KS. Potent synthetic and endogenous ligands for the adopted orphan nuclear receptor Nurr1. *Experimental & Molecular Medicine .* 2021;53(1):19-29. doi:10.1038/s12276-021-00555-5
138. Ranhotra HS. The NR4A orphan nuclear receptors: Mediators in metabolism and diseases. *Journal of Receptors and Signal Transduction.* 2015;35(2):184-188. doi:10.3109/10799893.2014.948555
139. Bonta PI, Pols TWH, de Vries CJM. NR4A Nuclear Receptors in Atherosclerosis and Vein-Graft Disease. *Trends Cardiovasc Med.* 2007;17(3):105-111. doi:10.1016/j.tcm.2007.02.001
140. Martorell L, Rodriguez C, Calvayrac O, Gentile M, Badimon L, Martinez-Gonzalez J. Vascular effects of thrombin: Involvement of NOR-1 in

Bibliografía

- thrombin-induced mitogenic stimulus in vascular cells. *Front Biosci.* 2008;13:2909-2915.
141. Goyal D, Goyal R. Angiogenic Transformation in Human Brain Micro Endothelial Cells: Whole Genome DNA Methylation and Transcriptomic Analysis. *Front Physiol.* 2019;10:1502. doi:10.3389/FPHYS.2019.01502/BIBTEX
142. Zhao Y, Howatt DA, Gizard F, et al. Deficiency of the NR4A Orphan Nuclear Receptor NOR1 Decreases Monocyte Adhesion and Atherosclerosis. *Circ Res.* 2010;107(4):501-511. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.222083
143. Sambri I, Crespo J, Aguiló S, Ingrosso D, Rodríguez C, González JM. miR-17 and -20a Target the Neuron-Derived Orphan Receptor-1 (NOR-1) in Vascular Endothelial Cells. *PLoS One.* 2015;10(11):e0141932. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0141932
144. Meng L, Jin W, Wang X. RIP3-mediated necrotic cell death accelerates systematic inflammation and mortality. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(35):11007-11012. doi:10.1073/PNAS.1514730112/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201514730SI.PDF
145. Dai Y, Shen Y, Li QR, et al. Glycated Apolipoprotein A-IV Induces Atherogenesis in Patients With CAD in Type 2 Diabetes. *J Am Coll Cardiol.* 2017;70(16):2006-2019. doi:10.1016/J.JACC.2017.08.053
146. Yang P, Wei X, Zhang J, et al. Antithrombotic Effects of Nur77 and Nor1 Are Mediated Through Upregulating Thrombomodulin Expression in Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;36(2):361-369. doi:10.1161/ATVBAHA.115.306891
147. Lu B, Zhu Z, Sheng L, et al. SMARCB1 Promotes Ubiquitination and Degradation of NR4A3 via Direct Interaction Driven by ROS in Vascular Endothelial Cell Injury. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:2048210. doi:10.1155/2020/2048210
148. Rodríguez-Calvo R, Guadall A, Calvayrac O, et al. Over-expression of neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) exacerbates neointimal hyperplasia after vascular injury. *Hum Mol Genet.* 2013;22(10):1949-1959. doi:10.1093/HMG/DDT042
149. Nomiyama T, Zhao Y, Gizard F, et al. Deficiency of the NR4A neuron-derived orphan receptor-1 attenuates neointima formation after vascular injury. *Circulation.* 2009;119(4):577-586. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.822056

150. Rodríguez-Calvo R, Ferrán B, Alonso J, et al. NR4A receptors up-regulate the antiproteinase alpha-2 macroglobulin (A2M) and modulate MMP-2 and MMP-9 in vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost.* 2015;113(6):1323-1334. doi:10.1160/TH14-07-0645
151. Martí-Pàmies I, Cañes L, Alonso J, Rodríguez C, Martínez-González J. The nuclear receptor NOR-1/NR4A3 regulates the multifunctional glycoprotein vitronectin in human vascular smooth muscle cells. *FASEB J.* 2017;31(10):4588-4599. doi:10.1096/FJ.201700136RR
152. Alonso J, Cañes L, García-Redondo AB, García De Frutos P, Rodríguez C, Martínez-González J. The nuclear receptor NOR-1 modulates redox homeostasis in human vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;122:23-33. <http://hdl.handle.net/10261/176702>
153. Das S, Zhang E, Senapati P, et al. A Novel Angiotensin II-Induced Long Noncoding RNA Giver Regulates Oxidative Stress, Inflammation, and Proliferation in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ Res.* 2018;123(12):1298-1312. doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.313207
154. Mcmorrow JP, Murphy EP. Inflammation: a role for NR4A orphan nuclear receptors? *Biochem Soc Trans.* 2011;39(2):688-693. doi:10.1042/BST0390688
155. Bonta PI, van Tiel CM, Vos M, et al. Nuclear receptors Nur77, Nurr1, and NOR-1 expressed in atherosclerotic lesion macrophages reduce lipid loading and inflammatory responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(10):2288-2294. doi:10.1161/01.ATV.0000238346.84458.5D
156. De Paoli F, Eeckhoutte J, Copin C, et al. The neuron-derived orphan receptor 1 (NOR1) is induced upon human alternative macrophage polarization and stimulates the expression of markers of the M2 phenotype. *Atherosclerosis.* 2015;241(1):18-26. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.04.798
157. Barton M, Yanagisawa M. Endothelin: 30 Years From Discovery to Therapy. *Hypertension.* 2019;74(6):1232-1265. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12105
158. Zhang J, Zhao W shu, Xu L, Wang X, Li X li, Yang X chun. Endothelium-specific endothelin-1 expression promotes pro-inflammatory macrophage activation by regulating miR-33/NR4A axis. *Exp Cell Res.* 2021;399(1):112443. doi:10.1016/j.yexcr.2020.112443
159. Qing H, Liu Y, Zhao Y, et al. Deficiency of the NR4A Orphan Nuclear Receptor NOR1 in Hematopoietic Stem Cells Accelerates Atherosclerosis. *Stem Cells.* 2014;32(9):2419-2429. doi:10.1002/stem.1747

Bibliografía

160. Hamers AAJ, Hanna RN, Nowyhed H, Hedrick CC, De Vries CJM. NR4A Nuclear Receptors in Immunity and Atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2013;24(5):381-385. doi:10.1097/MOL.0B013E3283643EAC
161. Odagiu L, May J, Boulet S, Baldwin TA, Labrecque N. Role of the Orphan Nuclear Receptor NR4A Family in T-Cell Biology. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;11:624122. doi:10.3389/FENDO.2020.624122
162. Sekiya T, Kashiwagi I, Yoshida R, et al. Nr4a receptors are essential for thymic regulatory T cell development and immune homeostasis. *Nat Immunol.* 2013;14(3):230-237. doi:10.1038/NI.2520
163. Saigusa R, Winkels H, Ley K. T cell subsets and functions in atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology* 2020 17:7. 2020;17(7):387-401. doi:10.1038/S41569-020-0352-5
164. He X, Liang B, Gu N. Th17/Treg Imbalance and Atherosclerosis. *Dis Markers.* 2020;2020:8821029. doi:10.1155/2020/8821029
165. Jiménez-Fernández M, Rodríguez-Sinovas C, Cañes L, et al. CD69-oxLDL ligand engagement induces Programmed Cell Death 1 (PD-1) expression in human CD4 + T lymphocytes. *Cellular and molecular life sciences.* 2022;79(8):468. doi:10.1007/s00018-022-04481-1
166. Pattarabanjird T, Li C, Mcnamara C. B Cells in Atherosclerosis: Mechanisms and Potential Clinical Applications. *JACC Basic Transl Sci.* 2021;6(6):546-563. doi:10.1016/j.jacbts.2021.01.006
167. Tan C, Hiwa R, Mueller JL, et al. NR4A nuclear receptors restrain B cell responses to antigen when second signals are absent or limiting. *Nat Immunol.* 2020;21(10):1267-1279. doi:10.1038/s41590-020-0765-7
168. Nus M, Basatemur G, Galan M, et al. NR4A1 Deletion in Marginal Zone B Cells Exacerbates Atherosclerosis in Mice—Brief Report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020;40(11):2598-2604. doi:10.1161/ATVBAHA.120.314607
169. Bot I, Shi GP, Kovanen PT. Mast cells as effectors in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(2):265-271. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303570
170. Lundequist A, Calounova G, Wensman H, Rönnerberg E, Pejler G. Differential regulation of Nr4a subfamily nuclear receptors following mast cell activation. *Mol Immunol.* 2011;48(15-16):1753-1761. doi:10.1016/j.molimm.2011.04.017

171. Rönnerberg E, Guss B, Pejler G. Infection of Mast Cells with Live Streptococci Causes a Toll-Like Receptor 2-and Cell-Cell Contact-Dependent Cytokine and Chemokine Response. *Infect Immun.* 2010;78(2):854-864. doi:10.1128/IAI.01004-09
172. Garcia-Faroldi G, Melo FR, Bruemmer D, Conneely OM, Pejler G, Lundequist A. Nuclear Receptor 4a3 (Nr4a3) Regulates Murine Mast Cell Responses and Granule Content. *PLoS One.* 2014;9(2):e89311. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0089311
173. Krystel-Whittemore M, Kn D, Wood JG. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell Front Immunol.* 2016;6:620. doi:10.3389/fimmu.2015.00620
174. Yuan Z, Lu Y, Wei J, Wu J, Yang J, Cai Z. Abdominal Aortic Aneurysm: Roles of Inflammatory Cells. *Front Immunol.* 2020;11:609161. doi:10.3389/FIMMU.2020.609161
175. Prince LR, Prosseda SD, Higgins K, et al. NR4A orphan nuclear receptor family members, NR4A2 and NR4A3, regulate neutrophil number and survival. *Blood.* 2017;130(8):1014-1025. doi:10.1182/BLOOD-2017-03-770164
176. Nagaoka M, Yashiro T, Uchida Y, et al. The Orphan Nuclear Receptor NR4A3 Is Involved in the Function of Dendritic Cells. *The Journal of Immunology.* 2017;199(8):2958-2967. doi:10.4049/JIMMUNOL.1601911
177. Park K, Mikulski Z, Seo GY, et al. The transcription factor NR4A3 controls CD103+ dendritic cell migration. *J Clin Invest.* 2016;126(12):4603-4615. doi:10.1172/JCI87081
178. Boulet S, Daudelin JF, Odagiu L, et al. The orphan nuclear receptor NR4A3 controls the differentiation of monocyte-derived dendritic cells following microbial stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(30):15150-15159. doi:10.1073/PNAS.1821296116/-/DCSUPPLEMENTAL
179. Chinetti G, Neels JG, Lymperopoulos A. Molecular Sciences Roles of Nuclear Receptors in Vascular Calcification. *Vascular Calcification Int J Mol Sci.* 2021;22(12):6491. doi:10.3390/ijms22126491
180. Scholtyssek C, Ipseiz N, Böhm C, et al. NR4A1 Regulates Motility of Osteoclast Precursors and Serves as Target for the Modulation of Systemic Bone Turnover. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2018;33(11):2035-2047. doi:10.1002/JBMR.3533

Bibliografía

181. Ahmed HA, Ibrahim LL, El Mekkawy DA, El Wakil A. Expression Pattern of the Orphan Nuclear Receptor, Nurr1, in the Developing Mouse Forelimb and its Relationship to. *Journal of Biological Sciences*. 2015;15(3):162-169. doi:10.3844/ojbsci.2015.162.169
182. Vallet SD, Ricard-Blum S. Lysyl oxidases: From enzyme activity to extracellular matrix cross-links. *Essays Biochem*. 2019;63(3):349-364. doi:10.1042/EBC20180050
183. Martínez-González J, Varona S, Cañes L, et al. Emerging Roles of Lysyl Oxidases in the Cardiovascular System: New Concepts and Therapeutic Challenges. *Biomolecules*. 2019;9(10):610. doi:10.3390/BIOM9100610
184. Rodríguez C, Martínez-González J, Raposo B, Alcudia JF, Guadall A, Badimon L. Regulation of lysyl oxidase in vascular cells: lysyl oxidase as a new player in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res*. 2008;79(1):7-13. doi:10.1093/CVR/CVN102
185. Rodríguez C, Martínez-González J. The Role of Lysyl Oxidase Enzymes in Cardiac Function and Remodeling. *Cells*. 2019;8(12):1483. doi:10.3390/cells8121483
186. Rodriguez C, Rodríguez-Sinovas A, Martínez-González J. Lysyl oxidase as a potential therapeutic target. *Drug News Perspect*. 2008;21(4):218-224. doi:10.1358/dnp.2008.21.4.1213351
187. Kagan HM, Li W. Lysyl oxidase: Properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem*. 2003;88(4):660-672. doi:10.1002/jcb.10413
188. Kumari S, Panda TK, Pradhan T. Lysyl Oxidase: Its Diversity in Health and Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2017;32(2):134-141. doi:10.1007/S12291-016-0576-7
189. Wei S, Gao L, Wu C, Qin F, Yuan J. Role of the lysyl oxidase family in organ development (Review). *Exp Ther Med*. 2020;20(1):163-172. doi:10.3892/ETM.2020.8731
190. Cox TR, Erler JT. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: Implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech*. 2011;4(2):165-178. doi:10.1242/dmm.004077
191. Xu L, Go EP, Finney J, et al. Post-translational Modifications of Recombinant Human Lysyl Oxidase-like 2 (rhLOXL2) Secreted from Drosophila S2 Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(8):5357-5363. doi:10.1074/jbc.C112.421768

192. Rodríguez-Pascual F, Rosell-García T. Lysyl Oxidases: Functions and Disorders. *J Glaucoma*. 2018;27(suppl 1):S15-S19. doi:10.1097/IJG.0000000000000910
193. Rosini S, Pugh N, Bonna AM, Hulmes DJS, Farndale RW, Adams JC. Thrombospondin-1 promotes matrix homeostasis by interacting with collagen and lysyl oxidase precursors and collagen cross-linking sites. *Sci Signal*. 2018;11(532):2566. doi:10.1126/SCISIGNAL.AAR2566
194. Liu SB, Ikenaga N, Peng ZW, et al. Lysyl oxidase activity contributes to collagen stabilization during liver fibrosis progression and limits spontaneous fibrosis reversal in mice. *FASEB Journal*. 2016;30(4):1599-1609. doi:10.1096/fj.14-268425
195. Cheng T, Liu Q, Zhang R, et al. Lysyl oxidase promotes bleomycin-induced lung fibrosis through modulating inflammation. *J Mol Cell Biol*. 2014;6(6):506-515. doi:10.1093/jmcb/mju039
196. Rimar D, Rosner I, Nov Y, et al. Lysyl oxidase is a potential biomarker of fibrosis in systemic sclerosis. *Arthritis and Rheumatology*. 2014;66(3):726-730. doi:10.1002/ART.38277
197. Chien JW, Richards TJ, Gibson KF, et al. Serum lysyl oxidase-like 2 levels and idiopathic pulmonary fibrosis disease progression. *European Respiratory Journal*. 2014;43(5):1430-1438. doi:10.1183/09031936.00141013
198. Knott L, Bailey AJ. Collagen Cross-Links in Mineralizing Tissues: A Review of Their Chemistry, Function, and Clinical Relevance. *Bone*. 1998;22(3):181-187.
199. Sharma S, Chataway T, Burdon KP, et al. Identification of LOXL1 protein and Apolipoprotein E as components of surgically isolated pseudoexfoliation material by direct mass spectrometry. *Exp Eye Res*. 2009;89(4):479-485. doi:10.1016/j.exer.2009.05.001
200. Thorleifsson G, Magnusson KP, Sulem P, et al. Common sequence variants in the LOXL1 gene confer susceptibility to exfoliation glaucoma. *Science (1979)*. 2007;317(5843):1397-1400. doi:10.1126/science.1144318
201. Barker HE, Cox TR, Erler JT. The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(8):540-552. doi:10.1038/nrc3319
202. Spencer PS, Schaumburg HH. Lathyrism: a neurotoxic disease. *Neurobehav Toxicol Teratol*. 1983;5(6):625-629.
203. Dasler W. Isolation of toxic crystals from sweet peas (*Lathyrus odoratus*). *Science (1979)*. 1954;120(3112):307-308.

Bibliografía

204. Leung L, Niculescu-Duvaz D, Smithen D, et al. Anti-metastatic Inhibitors of Lysyl Oxidase (LOX): Design and Structure–Activity Relationships. *J Med Chem*. 2019;62(12):5863-5884. doi:10.1021/acs.jmedchem.9b00335
205. Turecek C, Fratzl-Zelman N, Rumpler M, et al. Collagen cross-linking influences osteoblastic differentiation. *Calcif Tissue Int*. 2008;82(5):392-400. doi:10.1007/s00223-008-9136-3
206. Ahsan T, Lottman LM, Harwood F, Amiel D, Sah RL. Integrative cartilage repair: Inhibition by β -aminopropionitrile. *Journal of Orthopaedic Research*. 1999;17(6):850-857. doi:10.1002/jor.1100170610
207. Guadall A, Alcudia JF, Cachofeiro V, Martínez-Gonzalez J, Rodriguez C. Hypoxia-induced ROS signaling is required for LOX up-regulation in endothelial cells. *Frontiers in Bioscience*. 2011;3(3):955-967.
208. Rodríguez C, Alcudia JF, Martínez-González J, Raposo B, Navarro MA, Badimon L. Lysyl oxidase (LOX) down-regulation by TNF α : A new mechanism underlying TNF α -induced endothelial dysfunction. *Atherosclerosis*. 2008;196(2):558-564. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.06.002
209. Guadall A, Calvayrac O, Orriols M, Martínez-González J, Rodríguez C. Regulación de la expresión génica por la lisil oxidasa (LOX):modulación de la α 2-macroglobulina en células endoteliales. *Clinica e Investigacion en Arteriosclerosis*. 2011;23(4):168-174. doi:10.1016/j.arteri.2011.05.008
210. Rodríguez C, Raposo B, Martínez-González J, Casaní L, Badimon L. Low density lipoproteins downregulate lysyl oxidase in vascular endothelial cells and the arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(9):1409-1414. doi:10.1161/01.ATV.0000033818.21748.99/FORMAT/EPUB
211. Raposo B, Rodríguez C, Martínez-González J, Badimon L. High levels of homocysteine inhibit lysyl oxidase (LOX) and downregulate LOX expression in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2004;177(1):1-8. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.06.015
212. Rodríguez C, Alcudia JF, Martínez-González J, et al. Statins normalize vascular lysyl oxidase down-regulation induced by proatherogenic risk factors. *Cardiovasc Res*. 2009;83(3):595-603. doi:10.1093/CVR/CVP136
213. Adamopoulos C, Piperi C, Gargalionis AN, et al. Advanced glycation end products upregulate lysyl oxidase and endothelin-1 in human aortic endothelial cells via parallel activation of ERK1/2-NF- κ B and JNK-AP-1 signaling pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016;73(8):1685-1698. doi:10.1007/s00018-015-2091-z

214. Gacheru SN, Thomas KM, Murray SA, Csiszar K, Smith-Mungo LI, Kagan HM. Transcriptional and post-transcriptional control of lysyl oxidase expression in vascular smooth muscle cells: Effects of TGF- β 1 and serum deprivation. *J Cell Biochem.* 1997;65(3):395-407. doi:10.1002/(SICI)1097-4644(19970601)65:3<395::AID-JCB9>3.0.CO;2-N
215. Laczko R, Csiszar K. Lysyl Oxidase (LOX): Functional Contributions to Signaling Pathways. *Biomolecules.* 2020;10(8):1093. doi:10.3390/BIOM10081093
216. Martínez-Martínez E, Rodríguez C, Galán M, et al. The lysyl oxidase inhibitor (β -aminopropionitrile) reduces leptin profibrotic effects and ameliorates cardiovascular remodeling in diet-induced obesity in rats. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;92:96-104. doi:10.1016/j.yjmcc.2016.01.012
217. Lucero HA, Kagan HM. Lysyl oxidase: An oxidative enzyme and effector of cell function. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2006;63(19-20):2304-2316. doi:10.1007/S00018-006-6149-9/METRICS
218. Johnson CD, Balagurunathan Y, Dougherty ER, Afshari CA, He Q, Ramos KS. Prediction Model Insight into redox-regulated gene networks in vascular cells. *Bioinformatics.* 2007;1(10):379-383. Accessed February 26, 2023. <http://dir.niehs.nih.gov/microarray/chips.htm>.
219. Nuthakki VK, Fleser PS, Malinzak LE, et al. Lysyl oxidase expression in a rat model of arterial balloon injury. *J Vasc Surg.* 2004;40(1):123-129. doi:10.1016/J.JVS.2004.02.028
220. Nave AH, Mižíková I, Niess G, et al. Lysyl oxidases play a causal role in vascular remodeling in clinical and experimental pulmonary arterial hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(7):1446-1458. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303534/FORMAT/EPUB
221. Varona S, Orriols M, Galán M, et al. Lysyl oxidase (LOX) limits VSMC proliferation and neointimal thickening through its extracellular enzymatic activity. *Scientific Reports 2018 8:1.* 2018;8(1):1-10. doi:10.1038/s41598-018-31312-w
222. Orriols M, Guadall A, Galán M, et al. Lysyl oxidase (LOX) in vascular remodelling: Insight from a new animal model. *Thromb Haemost.* 2014;112(4):812-824. doi:10.1160/TH14-01-0024
223. Nellaiappan K, Risitano A, Liu G, Nicklas G, Kagan HM. Fully processed lysyl oxidase catalyst translocates from the extracellular space into nuclei of aortic smooth-muscle cells. *J Cell Biochem.* 2000;79(4):576-582. doi:10.1002/1097-4644(20001215)79:4<576::AID-JCB60>3.0.CO;2-A

Bibliografía

224. Oleggini R, Gastaldo N, Donato A Di. Regulation of elastin promoter by lysyl oxidase and growth factors: Cross control of lysyl oxidase on TGF- β 1 effects. *Matrix Biol.* 2007;26(6):494-505. doi:10.1016/j.matbio.2007.02.003
225. Saad FA, Torres M, Wang H, Graham L. Intracellular lysyl oxidase: Effect of a specific inhibitor on nuclear mass in proliferating cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;396(4):944-949. doi:10.1016/j.bbrc.2010.05.028
226. Kagan HM, Raghavan J, Hollander W. Changes in aortic lysyl oxidase activity in diet-induced atherosclerosis in the rabbit. *Arteriosclerosis.* 1981;1(4):287-291. doi:10.1161/01.ATV.1.4.287
227. Kothapalli D, Liu SL, Ho Bae Y, et al. Cardiovascular protection by apoE and apoE-HDL linked to suppression of ECM gene expression and arterial stiffening. Published online 2012. doi:10.1016/j.celrep.2012.09.018
228. Kothapalli D, Liu SL, Bae YH, et al. Cardiovascular Protection by ApoE and ApoE-HDL Linked to Suppression of ECM Gene Expression and Arterial Stiffening. *Cell Rep.* 2012;2(5):1259-1271. doi:10.1016/j.celrep.2012.09.018
229. Ovchinnikova O, Gylfe Å, Bailey L, et al. Osteoprotegerin promotes fibrous cap formation in atherosclerotic lesions of ApoE-deficient mice—brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(10):1478-1480. doi:10.1161/ATVBAHA.109.188185
230. Ovchinnikova OA, Folkersen L, Persson J, et al. The collagen cross-linking enzyme lysyl oxidase is associated with the healing of human atherosclerotic lesions. *J Intern Med.* 2014;276(5):525-536. doi:10.1111/JOIM.12228
231. Buttice G, Miller J, Wang L, Smith BD. Interferon- γ Induces Major Histocompatibility Class II Transactivator (CIITA) That Mediates Collagen Repression and Major Histocompatibility Class II Activation by Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Circ Res.* 2006;98(4):472-479. Accessed February 26, 2023. <http://circres.ahajournals.org>.
232. Song YL, Ford JW, Gordon D, Shanley CJ. Regulation of Lysyl Oxidase by Interferon- γ in Rat Aortic Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(4):982-988. doi:10.1161/01.ATV.20.4.982
233. Jover E, Silvente A, Marín F, et al. Inhibition of enzymes involved in collagen cross-linking reduces vascular smooth muscle cell calcification. *FASEB J.* 2018;32(8):4459-4469. doi:10.1096/FJ.201700653R

234. Hutson HN, Marohl T, Anderson M, Eliceiri K, Campagnola P, Masters KS. Calcific Aortic Valve Disease Is Associated with Layer-Specific Alterations in Collagen Architecture. *PLoS One*. 2016;11(9). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0163858
235. Fernández-de-Bobadilla J, López-de-Sá E. Carga económica y social de la enfermedad coronaria. *Revista Espanola de Cardiologia Suplementos*. 2013;13(SUPPL.2):42-47. doi:10.1016/S1131-3587(13)70079-7
236. Lanzer P, Boehm M, Sorribas V, et al. Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. *Eur Heart J*. 2014;35(23):1515-1525. doi:10.1093/EURHEARTJ/EHU163
237. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al. Heart disease and stroke statistics-2013 update: A Report from the American Heart Association. *Circulation*. 2013;127(1):e6-e245. doi:10.1161/CIR.0B013E31828124AD/FORMAT/EPUB
238. Li Z, Zhao Z, Cai Z, et al. Runx2 (Runt-Related Transcription Factor 2)-Mediated Microcalcification Is a Novel Pathological Characteristic and Potential Mediator of Abdominal Aortic Aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Published online 2020:1352-1369. doi:10.1161/ATVBAHA.119.314113
239. Roche-Molina M, Sanz-Rosa D, Cruz FM, et al. Induction of sustained hypercholesterolemia by single adeno-associated virus-mediated gene transfer of mutant hPCSK9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(1):50-59. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303617/-/DC1
240. Martínez-González J, Viñ M, Vidal F, Llorente-Cortés V, Badimon L. Mevalonate deprivation impairs IGF-I/insulin signaling in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 1997;135:213-223.
241. Sádaba JR, Martínez-Martínez E, Arrieta V, et al. Role for Galectin-3 in Calcific Aortic Valve Stenosis. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(11). doi:10.1161/JAHA.116.004360
242. Franco-Barranza J, Beacham DA, Amatangelo MD, Cukierman E. Preparation of Extracellular Matrices produced by Cultured and Primary Fibroblasts. *Curr Protoc Cell Biol*. 2016;71(1):10.9.1-10.9.34. doi:10.9.2
243. El Hussein D, Boulanger MC, Mahmut A, et al. P2Y2 receptor represses IL-6 expression by valve interstitial cells through Akt: Implication for calcific aortic valve disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;72:146-156. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.02.014

Bibliografía

244. Rogers MA, Aikawa E. Cardiovascular calcification: artificial intelligence and big data accelerate mechanistic discovery. *Nat Rev Cardiol.* 2019;16(5):261-274. doi:10.1038/s41569-018-0123-8
245. Hutcheson JD, Goettsch C, Rogers MA, Aikawa E. Revisiting cardiovascular calcification: A multifaceted disease requiring a multidisciplinary approach. *Semin Cell Dev Biol.* 2015;46:68-77. doi:10.1016/j.semcdb.2015.09.004
246. Dharmarajan S, Speer MY, Pierce K, et al. Role of Runx2 in Calcific Aortic Valve Disease in Mouse Models. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:687210. doi:10.3389/fcvm.2021.687210
247. Liu TM, Lee EH. Transcriptional regulatory cascades in Runx2-dependent bone development. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013;19(3):254-263. doi:10.1089/ten.teb.2012.0527
248. Di Vito A, Donato A, Presta I, et al. Extracellular matrix in calcific aortic valve disease: Architecture, dynamic and perspectives. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2):913. doi:10.3390/ijms22020913
249. Mathieu P, Bouchareb R, Boulanger MC. Innate and adaptive immunity in calcific aortic valve disease. *J Immunol Res.* 2015;2015:851945. doi:10.1155/2015/851945
250. Gizard F, Zhao Y, Findeisen HM, et al. Transcriptional regulation of S phase kinase-associated protein 2 by NR4A orphan nuclear receptor NOR1 in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry.* 2011;286(41):35485-35493. doi:10.1074/jbc.M111.295840
251. Cui M, Cai Z, Chu S, et al. Orphan Nuclear Receptor Nur77 Inhibits Angiotensin II-Induced Vascular Remodeling via Downregulation of β -Catenin. *Hypertension.* 2016;67(1):153-162. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06114
252. Arkenbout EK, De Waard V, Van Bragt M, et al. Protective function of transcription factor TR3 orphan receptor in atherogenesis: Decreased lesion formation in carotid artery ligation model in TR3 transgenic mice. *Circulation.* 2002;106(12):1530-1535. doi:10.1161/01.CIR.0000028811.03056.BF
253. Lammi J, Huppunen J, Aarnisalo P. Regulation of the osteopontin gene by the orphan nuclear receptor NURR1 in osteoblasts. *Molecular Endocrinology.* 2004;18(6):1546-1557. doi:10.1210/me.2003-0247

254. Watson ATD, Carmona Baez A, Jima D, et al. TCDD alters essential transcriptional regulators of osteogenic differentiation in multipotent mesenchymal stem cells. *Toxicological Sciences*. 2023;191(1):149-162. doi:10.1093/toxsci/kfac120
255. Gong Y, Yang J, Li X, et al. A systematic dissection of human primary osteoblasts in vivo at single-cell resolution. *Aging*. 2021;13(16):20629-20650. www.aging-us.com
256. Kardys I, Van Tiel CM, De Vries CJM, et al. Haplotypes of the NR4A2/NURR1 gene and cardiovascular disease: The Rotterdam study. *Hum Mutat*. 2009;30(3):417-423. doi:10.1002/humu.20902
257. Meir T, Durlacher K, Pan Z, et al. Parathyroid hormone activates the orphan nuclear receptor Nurr1 to induce FGF23 transcription. *Kidney Int*. 2014;86(6):1106-1115. doi:10.1038/ki.2014.215
258. Choudhary S, Huang H, Raisz L, Pilbeam C. Anabolic effects of PTH in cyclooxygenase-2 knockout osteoblasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;372(4):536-541. doi:10.1016/j.bbrc.2008.05.050
259. Bjørklund MM, Hollensen AK, Hagensen MK, et al. Induction of atherosclerosis in mice and hamsters without germline genetic engineering. *Circ Res*. 2014;114(11):1684-1689. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302937
260. Goettsch C, Hutcheson JD, Hagita S, et al. A single injection of gain-of-function mutant PCSK9 adeno-associated virus vector induces cardiovascular calcification in mice with no genetic modification. *Atherosclerosis*. 2016;251:109-118. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.06.011
261. Pucéat M. Embryological origin of the endocardium and derived valve progenitor cells: From developmental biology to stem cell-based valve repair. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2013;1833(4):917-922. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.09.013
262. Sinha S, Iyer D, Granata A. Embryonic origins of human vascular smooth muscle cells: Implications for in vitro modeling and clinical application. *Cellular and molecular life sciences*. 2014;71(12):2271-2288. doi:10.1007/s00018-013-1554-3
263. Rattazzi M, Bennett BJ, Bea F, et al. Calcification of advanced atherosclerotic lesions in the innominate arteries of ApoE-deficient mice: Potential role of chondrocyte-like cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(7):1420-1425. doi:10.1161/01.ATV.0000166600.58468.1b

Bibliografía

264. Ngai D, Lino M, Bendeck MP. Cell-Matrix Interactions and Matricrine Signaling in the Pathogenesis of Vascular Calcification. *Front Cardiovasc Med.* 2018;5:174. doi:10.3389/fcvm.2018.00174
265. Uto K, Yoshizawa S, Aoki C, Nishikawa T, Oda H. Inhibition of extracellular matrix integrity attenuates the early phase of aortic medial calcification in a rodent model. *Atherosclerosis.* 2021;319:10-20. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2020.12.015
266. Chen P, Li J, Huo Y, et al. Adenovirus-mediated expression of orphan nuclear receptor NR4A2 targeting hepatic stellate cell attenuates liver fibrosis in rats. *Sci Rep.* 2016;6:33593. doi:10.1038/srep33593
267. Yin H, Lo JH, Kim JY, et al. Expression profiling of nuclear receptors identifies key roles of NR4A subfamily in uterine fibroids. *Molecular Endocrinology.* 2013;27(5):726-740. doi:10.1210/me.2012-1305
268. Yutzey KE, Demer LL, Body SC, et al. Calcific aortic valve disease: A consensus summary from the Alliance of Investigators on Calcific Aortic Valve Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(11):2387-2393. doi:10.1161/ATVBAHA
269. Yadgir S, Johnson CO, Aboyans V, et al. Global, Regional, and National Burden of Calcific Aortic Valve and Degenerative Mitral Valve Diseases, 1990-2017. *Circulation.* 2020;141(21):1670-1680. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.043391
270. Zhao Y, Sun Z, Li L, Yuan W, Wang Z. Role of Collagen in Vascular Calcification. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2022;80(6):769-778. www.jcvc.org
271. Nudelman F, Pieterse K, George A, et al. The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors. *Nat Mater.* 2010;9(12):1004-1009. doi:10.1038/nmat2875
272. Müller KH, Hayward R, Rajan R, et al. Poly(ADP-Ribose) Links the DNA Damage Response and Biomineralization. *Cell Rep.* 2019;27(11):3124-3138.e13. doi:10.1016/j.celrep.2019.05.038
273. Zhang J, Ji Y, Jiang S, et al. Calcium–Collagen Coupling is Vital for Biomineralization Schedule. *Advanced Science.* 2021;8(15). doi:10.1002/advs.202100363
274. Xue Y, Kossar AP, Abramov A, et al. Age-related enhanced degeneration of bioprosthetic valves due to leaflet calcification, tissue crosslinking, and structural changes. *Cardiovasc Res.* 2023;119(1):302-315. doi:10.1093/cvr/cvac002

275. Mathieu P, Boulanger MC. Basic mechanisms of calcific aortic valve disease. *Canadian Journal of Cardiology*. 2014;30(9):982-993. doi:10.1016/j.cjca.2014.03.029
276. Hutson HN, Marohl T, Anderson M, Eliceiri K, Campagnola P, Masters KS. Calcific aortic valve disease is associated with layer-specific alterations in collagen architecture. *PLoS One*. 2016;11(9). doi:10.1371/journal.pone.0163858
277. Tóth A, Balogh E, Jeney V. Regulation of vascular calcification by reactive oxygen species. *Antioxidants*. 2020;9(10):963. doi:10.3390/antiox9100963
278. Furmanik M, Chatrou M, Van Gorp R, et al. Reactive Oxygen-Forming Nox5 Links Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching and Extracellular Vesicle-Mediated Vascular Calcification. *Circ Res*. 2020;127(7):911-927. doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.316159
279. Chen Y, Zhao X, Wu H. Arterial Stiffness: A Focus on Vascular Calcification and Its Link to Bone Mineralization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;40(5):1078-1093. doi:10.1161/ATVBAHA.120.313131
280. Yang X, Chen A, Liang Q, et al. Up-regulation of heme oxygenase-1 by celastrol alleviates oxidative stress and vascular calcification in chronic kidney disease. *Free Radic Biol Med*. 2021;172:530-540. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2021.06.020
281. Martínez-Revelles S, García-Redondo AB, Avendaño MS, et al. Lysyl Oxidase Induces Vascular Oxidative Stress and Contributes to Arterial Stiffness and Abnormal Elastin Structure in Hypertension: Role of p38MAPK. *Antioxid Redox Signal*. 2017;27(7):379-397. doi:10.1089/ars.2016.6642
282. Guadall A, Alcudia JF, Cachofeiro V, Martinez-Gonzalez J, Rodriguez C. Hypoxia-induced ROS signaling is required for LOX up-regulation in endothelial cells. *Frontiers in Bioscience*. 2011;3(3):955-967.
283. Varona S, García-Redondo AB, Martínez-González J, Salaices M, Briones AM, Rodríguez C. Vascular lysyl oxidase over-expression alters extracellular matrix structure and induces oxidative stress. *Clinica e Investigacion en Arteriosclerosis*. 2017;29(4):157-165. doi:10.1016/j.arteri.2017.01.004
284. Giampuzzi M, Botti G, Di Duca M, et al. Lysyl oxidase activates the transcription activity of human collagen III promoter: Possible involvement of Ku antigen. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(46):36341-36349. doi:10.1074/jbc.M003362200

Bibliografía

285. Oleggini R, Gastaldo N, Di Donato A. Regulation of elastin promoter by lysyl oxidase and growth factors: Cross control of lysyl oxidase on TGF- β 1 effects. *Matrix Biol.* 2007;26(6):494-505. doi:10.1016/j.matbio.2007.02.003
286. Giampuzzi M, Oleggini R, Di Donato A. Demonstration of in vitro interaction between tumor suppressor lysyl oxidase and histones H1 and H2: Definition of the regions involved. *Biochimica et Biophysica Acta* . 2003;1647(1-2):245-251. doi:10.1016/S1570-9639(03)00059-1
287. González-Santamaría J, Villalba M, Busnadiego O, et al. Matrix cross-linking lysyl oxidases are induced in response to myocardial infarction and promote cardiac dysfunction. *Cardiovasc Res.* 2016;109(1):67-78. doi:10.1093/cvr/cvv214
288. Majumdar U, Choudhury TZ, Manivannan S, Ueyama Y, Basu M, Garg V. Single-cell RNA-sequencing analysis of aortic valve interstitial cells demonstrates the regulation of integrin signaling by nitric oxide. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9:742850. doi:10.3389/fcvm.2022.742850
289. Majumdar U, Manivannan S, Basu M, et al. Nitric oxide prevents aortic valve calcification by S-nitrosylation of USP9X to activate NOTCH signaling. *Sci Adv.* 2021;7(6).
290. Xin H, Wang Z, Wu S, et al. Calcified decellularized arterial scaffolds impact vascular smooth muscle cell transformation via downregulating α -SMA expression and upregulating OPN expression. *Exp Ther Med.* 2019;18(1):705-710. doi:10.3892/etm.2019.7626
291. Galán M, Varona S, Guadall A, et al. Lysyl oxidase overexpression accelerates cardiac remodeling and aggravates angiotensin II-induced hypertrophy. *FASEB J.* 2017;31(9):3787-3799. doi:10.1096/fj.201601157RR
292. Ovchinnikova OA, Folkersen L, Persson J, et al. The collagen cross-linking enzyme lysyl oxidase is associated with the healing of human atherosclerotic lesions. *J Intern Med.* 2014;276(5):525-536. doi:10.1111/joim.12228
293. Greco A, Herrmann J, Babic M, et al. Molecular Imaging and Quantification of Smooth Muscle Cell and Aortic Tissue Calcification In Vitro and Ex Vivo with a Fluorescent Hydroxyapatite-Specific Probe. *Biomedicines.* 2022;10(9):2271. doi:10.3390/biomedicines10092271
294. Sim AM, Rashdan NA, Cui L, et al. A novel fluorescein-bisphosphonate based diagnostic tool for the detection of hydroxyapatite in both cell and tissue models. *Sci Rep.* 2018;8(1):17360. doi:10.1038/s41598-018-35454-9

295. Hao N, Zhou Z, Zhang F, et al. Interleukin-29 Accelerates Vascular Calcification via JAK2/STAT3/BMP2 Signaling. *J Am Heart Assoc.* 2023;12(1). doi:10.1161/JAHA.122.027222
296. Abdelbaky A, Corsini E, Figueroa AL, et al. Focal arterial inflammation precedes subsequent calcification in the same location: A longitudinal FDG-PET/CT study. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2013;6(5):747-754. doi:10.1161/CIRCIMAGING.113.000382
297. Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(7):1161-1170. doi:10.1161/01.ATV.0000133194.94939.42
298. Lucero HA, Ravid K, Grimsby JL, et al. Lysyl oxidase oxidizes cell membrane proteins and enhances the chemotactic response of vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry.* 2008;283(35):24103-24117. doi:10.1074/jbc.M709897200
299. Li W, Liu G, Chou IN, Kagan HM. Hydrogen Peroxide-Mediated, Lysyl Oxidase-Dependent Chemotaxis of Vascular Smooth Muscle Cells. *J Cell Biochem.* 2000;78(4):550-557.
300. Lazarus HM, Cruikshank W, Narasimhan N, Kagan HM, Center DM. Induction of Human Monocyte Motility by Lysyl Oxidase. *Matrix Biol.* 1994;14(9):727-731.
301. Lucero HA, Mäki JM, Kagan HM. Activation of cellular chemotactic responses to chemokines coupled with oxidation of plasma membrane proteins by lysyl oxidase. *J Neural Transm.* 2011;118(7):1091-1099. doi:10.1007/s00702-011-0642-5

APÉNDICE

1. Tampones de lisis

Tampón de lisis para extractos proteicos celulares	
Tris-HCl (pH 7,4)	10 mM
SDS	1%
Ortovanadato	1 mM

Tampón de lisis para extractos proteicos de tejido	
EGTA	0,5 mM
NaCl	100 mM
Glicerol-2-fosfato	100 mM
HEPES	50 mM
Glicerol	10%
TWEEN 20	0,1%
Inhibidor de proteasas (Roche)	1x
DTT	1 mM

2. Composición geles poliacrilamida

Componente	Gel separador	Gel apilador
Tris-HCl (pH 8,8)	375 mM	-
Tris-HCl (pH 6,5)	-	125 mM
Acrilamida/bis-acrilamida 30% (A3699, Sigma)	7,5-15%	4%
SDS	0,1%	0,1%
Persulfato de amonio	0,1%	0,075%
TEMED (T9281, Sigma)	0,08%	0,1%
H ₂ O desionizada		

3. Tampón Laemmli

Componentes	
Tris-HCl	125 mM
SDS	1 %
Glicerol	5 %
Azul de bromofenol	0,003 %
β-mercaptoetanol	1 %
H ₂ O desionizada	

4. Anticuerpos

Anticuerpos dirigidos contra:	Referencia	Casa comercial	Aplicación
8-oxo-dG	Ab48508	Abcam	IHQ
Anti-IgG de conejo	P0448	Dako	WB
Anti-IgG de ratón	P0161	Dako	WB
CD68	Ab125212	Abcam	IHQ
Colágeno IaI	NB-600-408	Novus Biologicals	IF
IL-6	GTX110527	GeneTex	IHQ
Ki67	Ab15580	Abcam	IHQ
LDLR	3839-30	Biovision	WB
LOX	NB-100-2530	Novus Biologicals	WB
LOX	Ab31238	Abcam	IHQ
MCP1	Sc-1785	Santa Cruz	IHQ
MMP2	Ab86607	Abcam	IHQ
NOR-1	H00008013-M06	Abnova	WB, IHQ, IC
Nucleolin	Sc-9893	Santa Cruz	WB
OPG	NB100-56505	Novus Biologicals	IHQ
OPN	NB-600-1043	Novus Biologicals	WB, IHQ
RUNX2	Ab23981	Abcam	WB, IHQ
Vimentina	M7020	Dako	IC
Vimentina	Ab8979	Abcam	IHQ
α -SMA	Ab5694	Abcam	IHQ, IC
β -actina	A5441	Merck	WB

WB: Western Blot; IHQ: Inmunohistoquímica; IC: inmunocitoquímica

5. siARN

siARNs usados para el silenciamiento génico (Dharmacon):		
Gen	siRNA	Referencia
siRANDOM	ON-TARGET plus Non-targeting Control Pool	D-001810-10-05
siNOR-1	On-Target Plus NR4A3 SmartPool	Human NR4A3 L-003428-00-0005 20

6. Análisis por PCR a tiempo real

Sondas <i>Taqman</i> TM			
Gen	Especie	Referencia	Casa Comercial
<i>Alpl</i>	Ratón	Mm.PT.58.8794492	IDT
BGLAP	Humano	Hs01587814_g1	Applied Biosystems
<i>Bmp2</i>	Ratón	Mm01340178_m1	Applied Biosystems
Col1a1	Ratón	Mm.PT.58.7562513	IDT
GAPDH	Humano	Hs.PT.39a.22214836	IDT
<i>Gapdh</i>	Ratón	Mm.PT.58.39a.1	IDT
<i>Il1β</i>	Ratón	Mm00434228_m1	Applied Biosystems
<i>Il-6</i>	Ratón	Mm00446191_m1	Applied Biosystems
LOX	Humano	Hs00942480_m1	Applied Biosystems
<i>Lox</i>	Ratón	Mm.PT.5812951302	IDT
LOXL1	Humano	Hs00173746_m1	Applied Biosystems
LOXL2	Humano	Hs00158757_m1	Applied Biosystems
LOXL3	Humano	Hs00261671_m1	Applied Biosystems
LOXL4	Humano	Hs00260059_m1	Applied Biosystems
<i>Mcp1</i>	Ratón	Mm.PT.58.42151692	IDT
NR4A3 (NOR-1)	Humano	Hs.PT.47.98793	IDT
<i>Nr4a3 (Nor-1)</i>	Ratón	Mm00450074_m1	Applied Biosystems
<i>Nur77</i>	Ratón	Mm00439358_m1	Applied Biosystems
<i>Nurr1</i>	Ratón	Mm00443056_m1	Applied Biosystems
<i>Opg</i>	Ratón	Mm00435454_m1	Applied Biosystems
OPN	Humano	Hs.PT.58.19252426	IDT
<i>Opn</i>	Ratón	Mm00436767_m1	Applied Biosystems
<i>Plod</i>	Ratón	Mm.PT.58.10643674	IDT
<i>Runx2</i>	Ratón	Mm00501584_m1	Applied Biosystems
TBP	Humano	Hs.PT.39a.22214825	IDT
<i>Tbp</i>	Ratón	Mm00446973_m1	Applied Biosystems

Sondas SYBR-Green		
Gen	Especie	Secuencia
RUNX2 sentido	Humano	5'- GTCATGGCGGGTAACGATGA-3'
RUNX2 antisentido	Humano	5'- AAACCTCTTGCCTCGTCCACT -3'
ALPL sentido	Humano	5'-ACCTCGTTGACACCTGGAAG-3'
ALPL antisentido	Humano	5'- TCAAGGGTCAGGAGTTCCGT-3'
BMP2 sentido	Humano	5'- GCCAGCCGAGCCAACAC-3'
BMP2 antisentido	Humano	5'- CCCACTCGTTTCTGGTAGTTCTTC-3'
IL-6 sentido	Humano	5'- TTCTCCACAAGCGCCTTCGGTCCA-3'
IL-6 antisentido	Humano	5'- AGGGCTGAGATGCCGTCGAGGATGTA-3'

