



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Mecanismes de regulació de la Lisil Oxidasa i la Fibulina-5 a nivell vascular: Implicació en la restenosi i l'aneurisma d'aorta abdominal

Maria del Mar Orriols Martins

**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](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://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.

Mecanismes de regulació de la  
Lisil Oxidasa i la Fibulina-5 a nivell  
vascular: Implicació en la restenosi  
i l'aneurisma d'aorta abdominal



*Mar Orriols Martins*  
2015







Mecanismes de regulació de la Lisil Oxidasa i la Fibulina-5 a nivell vascular: Implicació en la restenosi i l'aneurisma d'aorta abdominal

Memòria presentada per

**Mar Orriols Martins**

per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona

Universitat de Barcelona

Facultat de Medicina

Programa de doctorat en Biomedicina

Aquest treball ha estat realitzat sota la direcció de la Dra. M<sup>a</sup> Cristina Rodríguez Sinovas i del Dr. José Martínez González, investigadors del Centre d'Investigació Cardiovascular de Barcelona.

Els directors:

M<sup>a</sup> Cristina Rodríguez Sinovas

José Martínez González

La doctoranda:

Mar Orriols Martins

Barcelona, 2015



*Als meus avis,  
als meus pares,  
a la Piga, l'Azri, el Floc i el Leo.*





“You are the books you read, the films you watch, the music you listen to, the people you meet, the dreams you have, the conversations you engage in. You are what you take from these. You are the sound of the ocean, the breath of fresh air, the brightest light and the darkest corner.

You are a collective of every experience you have had in your life. You are every single second of every single day. So drown yourself in a sea of knowledge and existence. Let the words run through your veins and let the colors fill your mind until there is nothing left to do but explode.

There are no wrong answers.  
Inspiration is everywhere.  
Sit back, relax, and take it all in.

Now, go out and create something.”

Jac Vanek

ཨོཾ་ཨ་ར་པ་ཙ་ན་ཧྲིཿ།

"Om Ah Ra Pa Tsa Na Dhih"

Manjushri (Bodhisattva de la saviesa)



Ja sabeu que això d'escriure... a mi no se'm dona massa bé... de fet, porto deixant aquest moment dia rere dia i, com sempre, m'inspiro sota pressió, quan ja no queda més remei; són les 20:00 i haig de portar a imprimir la tesi demà!!! Com deia, això d'escriure no és lo meu o sigui que imagineu-vos el disgust que porta ma mare, que és filòloga catalana de pura cepa, després de veure que sóc capaç d'escriure dissabte amb P!.



Fig 1. Els inicis I: Estrès!!

Bé, no sé com escriure amb paraules tot el que sento, tot el que us vull agrair! com diria l'Anna... mira que ets GENUTRIA! però... una tesi ha de tenir agraïments SÍ o SÍ (és l'únic apartat que tothom és llegeix!) així que faré el que pugui! El meu estil científic es limitaria a un GRÀCIES *et al.* però intentaré donar-li un toc més artístic-literari!

Primer de tot vull agrair als meus directors de tesi, sense els quals aquest treball no hauria estat possible. Cristina, muchas gracias por la paciencia que has tenido conmigo, por guiarme en mis inicios (cuando era ingenua y pensaba que encontraría la cura para la aterosclerosis! ... todo el mundo lo ha pensado alguna vez en su vida, no? Fig. 1 y 2). Gràcies per la teva excel·lent direcció científica, pel teu sentit pràctic, per la teva eficiència i per l'empatia que has tingut amb mi en moments difícils. Gracias Pepe, por tus consejos, por confiar en mi y darme la oportunidad de hacer el doctorado. (Es todo un privilegio ser la única becaria a la qual has revelado un WB! muchas gracias!)

Gràcies a la Dra. Badimon per haver-me donat l'oportunitat de realitzar la tesi al Centre d'Investigació Cardiovascular. Gràcies també per valorar la meva faceta més artística.

Gràcies als col·laboradors del Laboratori d'Angiologia, Biologia Vasculard i Inflamació i del Servei de Cirurgia Vasculard de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, per haver fet possible una bona part d'aquesta tesi: Gràcies, Sonia, per la paciència que has tingut amb mi (hay sangre!!!; Lo siento! soy un desastre con el Whassap); Mercedes, pel teu bon humor i energia; Sergi Bellmunt, per l'ajuda amb les ecografies en miniatura; Luis Vila i José Román Escudero, per donar-me accés a unes mostres tant valuoses.



Fig. 2 Els inicis 2

Gràcies als meus companys de laboratori, el I10 és la meva segona casa i vosaltres la meva segona família (Fig. 3)!

Gràcies als que em van acollir! A Oli, per tus consejos; a María de Burgos (verte pelar una naranja no tiene precio! :P); a la Silvi (deja el Whassap y atiende, que aquí va tu párrafo! :P): por tu ayuda infinita y tu energía positiva con la que contagias a todo el labo! A ver si se me pega algo de tu eficiencia! Trabajar contigo ha sido un lujo!!!. Crespo, tú lo que necesitas es un disaieeeeerrrrr! (ho habia de dir); Ara en serio, gràcies per integrar-me al grup des del primer dia (aún me acuerdo de la primera cena de navidad!!) i pel toc d'humor i banda sonora que dones al grup. Ricardo (Richi!!), moltes gràcies per la teva amistat; Des del principi m'has guiat, m'has ajudat, m'has escoltat... i m'has ensenyat que amb paciència i il·lusió la ciència mola més (algun dia el nostre Nature sortirà a la llum!). Molt especialment... a l'Anna: has estat una persona molt important per mi, gràcies per confiar en mi des del primer dia! (em vas fer guanyar tota la confiança en mi mateixa que em faltava i això no té preu); Per ser tant autèntica i estar com una cabra! gràcies pels teus jocs de paraules, pels teus balls de bona sort (han funcionat inclòs a distància!, pel Flufo... Dispara!! Cenutria!!), però sobretot gràcies per la teva amistat: per ser-hi tant en els moments bons

(Fig. 5) com en els dolents (quin art que tens fent caixes!! encara trobo túpers amagats per tot arreu! :P). MOLTES GRÀCIES, XURRI!!

Gràcies també a la que era novata quan vaig arribar: Judith... todo llega!!, un último empujón y lo tenemos! Gràcies, Aina i Susana, vaya duo esteu fetes! quin fart de riure!. Gracias, María Galán, por animarme a seguir "palante", por hacerme ver que hay futuro y animarme a seguir con la aventura extranjera.



Fig. 3 La familia del IIO

A tots els meus alumnes preferits: Íngrid, Nando y Saray, ha sigut un gust ensenyar-vos el poc que sé.

Gràcies, Íngrid, per la teva energia i positivisme i els teus crits! Coca amb cireres!!! s'han de celebrar els petits èxits!!! Tota una filosofia de vida. Gràcies per la teva amistat, per retroalimentar positivament la meva bogeria i per contagiar-me amb el teu entusiasme! Ets una artista!! (encara que no sàpigues ni qui és Bob Dylan! :P).

Saray, gracias por ser tan genial! Gracias por aguantarme (no es fácil que te enseñe alguien tan caótico como yo; viva el candy crash!) y ayudarme tanto! Si te tuviera que dar un euro por cada porta que me has xilanizado... te haces rica! :D Quiero que sepas que vales mucho! tú confía en ti y "palante"!! No lo dudes nunca! (Zumito power!!)

Gracias, Betty, por ser tan buena y mostrarme lo que es la SOLIDARIDAD en persona (no te enfades eh! que esta vez no va en broma, va muy en serio). Gracias por cuidarme, por acogermme en tu casa al estilo cubano, por toda la paciencia que tienes cuando no me acuerdo de los protocolos... por los zumitos.... La lista de cosas a agradecerte es interminable!!! GRACIAS POR CREAR UN MONSTRUO!

Gràcies també als que han passat de visita, l'Andrea i la Diana, donant vidilla a la nostra rutina.

Gracias a los hermanos adoptivos del 110! Sois como de la familia!! Azoriniiii, gracias por tu energía y tu hiperactividad contagiosas (Anem a la muntanya??); David, gracias por meterme caña y hacerme ver que si quiero conseguir algo, principalmente depende de mí! (no me llores!!!), eres un sabio!; Gràcies, Gemma, per estar com una cabra!!!, pels teus jocs de paraules i flipades vàries!; Gràcies, Sonia, pels teus consells i ànims; Gracias, Rocío! (Ay, digo Lourdes!), por ser tan divertida y positiva! (lo del confesionario va por ti! qué historias ha oído la china! jeje Fig. 4).



Fig 4. Anem a la china???

Gràcies, Oriol, per les teves ensenyances de meditació i budisme (ets el meu mestre encara que no ho vulguis! ;P); Gràcies, Ma Àngels, pel teus consells i la teva paciència aguantant el meu caos dins el vostre paradís de l'ordre i la perfecció! Gràcies a tots amb els que he compartit llargues nits de transplants! Gràcies, Roberta, Roi, Jose, Carolina, Elena, Raquel, Maite, David y Ingrid. Qué largas noches de placer, eh! :P Especialment a la Maribel, ànims amb els mòbils i les guàrdies, tu pots!! Gràcies, Sergi, Raquel, Maite, Rafael i Sonia, per

fer-me companyia en la foscor de la biblioteca. Ja veig la llum!!!! A tota la gent de l'estabulari: Sergi i Laura, moltes gràcies pels vostres consells i orientació, i Àngel, per la teva ajuda. Gracias, Fanny, por tu ayuda y tu eficiencia (no había nunca visto nadie limpiar una grapadora por dentro! jajaja), por ser tan cariñosa y tan buena persona.

Carmen y Filo, muchas gracias por cuidarme tanto! por ser tan buenas y tener la santa paciencia de no matarme cuando piso el suelo fregado, por mimarnos, traernos merienda y por animarme en los momentos más duros.... sois un sol! :D

Gràcies als companys d'altres grups. A l'Ester Gerboles, per ser tant autèntica i divertida! i per la teva paciència amb els explants i les mil plaques que et deixàvem de regalet. Gràcies a tots els que d'una manera o altra heu aportat el vostre granet de sorra a aquesta tesi: Quim, Maisa, Anna N, Rosa Aledo (gràcies per l'ajuda amb els clonatges!), Ester Peña (quina paciència fent fotos!), Sandra (gràcies per ensenyar-me tot el món dels microarrays!), Laura N y Elena (qué guai que os apuntaréis a mis fiestas!), al Josep (gràcies per ser tan agradable), a la Meritxell (quina eficiència, ens fas la vida molt més fàcil, merci!), a la Maria B, Ilaria, Mònica P (mi vampira! jajaja) ... i tota la resta, que no són pocs!

Gràcies als que ja han emigrat i se'ls troba a faltar: Juli, Marta S i Cardús, sou la canya!

A la gentuza que conocí en el máster; Gracias Paulo, por ser tan boêmio! es la hora del pan!!; Gràcias, Cris (la atleta mejicana jajaja), por ser tan molona, por nuestras cenas para compartir penas y alegrías, y la Rusa Loka! я тебя люблю !!! Gracias por ser tan guai!; gracias por tu alegría (aunque tengo que decir que eso depende un poco del día, eh! :P) y por tu amistad sincera. Aún me acuerdo de nuestras sesiones con el ukelele (Alleuliah!!!!), cuando me invadías la cama y veíamos pelis románticonas.... o cuando nos llevaste al culo del mundo a ver ovejas y prados! (Fig. 5) A ver si el destino nos vuelve a unir por estos mundos de Dios! ;)



Fig. 5 Irlanda



Gracias Jana (la chica checa!); por ser tan auténtica, por tus miradas enigmáticas y tus risas de loca! muajajaj. Aún me acuerdo de esa noche en tu garage, qué miedo!! :D)

Gràcies a tota la troupe de locos motivaos bohemios de la vida!! (Fig. 7)

Gracias Mariaxu (Ai! Dra. Moreno! Fig. 6), por valorarme desde el primer día (te acuerdas cuando nos conocimos en la biblio y yo era una hippy catalaneta? jejej). Por mantener y cuidar nuestra amistad a lo largo del tiempo. Gracias por animarme en mis momentos más xof; gracias por ser tan sincera y decir siempre lo que piensas, por entender la vida de una forma tan guai y por ser tan fifi-pija! :D Gracias, Suares, por ser tan tú misma! Por tu amistad y simpatía; Por compartir tus sueños conmigo! jajaj. Gracias por ser tan directa y no poder esconder lo que piensas (lo siento, la cara te delata!) i per aguantar els meus rollos trascendentals/meditatius jajaja Us estimo xurris!! :)

If at first you  
don't succeed,  
try two more times  
so that your failure  
is ...



Fig. 6 Dra. Moreno

Gracias, Adri (eres mu grande! el Tomás... el concurs de bigotis!... bohemios de la vida que no tiene nada que ver!); Victor y Cañi (qué momentos en espeleo! Somos los flipaos de la Ferla!!); Belén (esa fiesta de carnaval!! qué grande!); Irene (qué serian los viajes en coche sin tus escatologismos! jajajaj); Carlos, (gracias por ser tan bueno y ayudarme siempre); Xave, gracias por tus conversaciones y experiencias surrealistas. Algún día bimbaré un Pito negro!! (el pájaro eh!).



Fig. 7 Excursiones molonas

Moltes gràcies, Mònica i Pablo! Sí, per mi sou inseparables! som inseparables! Hi heu estat sempre i hi sereu sempre! Mònica! ja ens ho va dir el Pare Jesús, Dios las cría y ellas se juntan! Moltes gràcies per tot el que has fet per mi, per animar-me, ajudar-me, en definitiva; per compartir la teva amistat des que tinc memòria!

Pablo, moltes gràcies per valorar-me tant (no m'ho mereixo!), per acceptar-me com sóc i ajudar-me a millorar i a esforçar-me. Ets un mestre! Gràcies per introduir-me al món muntanyeru (Fig. 8)!

Martí, moltes gràcies per introduir-me al món friki!! encara me'n recordo de les primeres partides al Bang a Laforja! i quan m'intentaves convèncer perquè llegís *Game of Thrones*! BASURAAAAA!!!! jajajaja



Fig. 8 Excursionetes

Gràcies a tots els músics que han passat per Cabo Norte (Fig.9), heu fet un somni realitat. JM, gràcies per la teva confiança i amistat, per fotre'm canya i aconseguir que doni més de mi mateixa! :) Gràcies, Joel, per la teva amistat i per obsequiar-me amb els teus consells i les teves converses sempre interessants i enriquidores!. Sort que poseu una mica d'ordre!



Fig. 9 Cabo Norte - El mejor grupo de rock-celta de la historia

Karel, aunque seguimos fluyendo por caminos distintos quiero que sepas que lo que hemos vivido ha valido la pena. Me has ayudado y aportado mucho, hemos vivido cosas muy bonitas y me has hecho sentir muy especial. Gracias.

Finalment, a la meva família! Gràcies a tots els tiets, cosins, per ajudar-me, animar-me i estimar-me.

Gràcies als meus avis per cuidar-me sempre, sé que sempre sou i sereu amb mi. A l'avi Salvador... que resava perquè trobés un lloc per fer el doctorat (Avi, ho he aconseguit!!) i perquè trobés nòvio jaja. A l'avi Manel, més callat però igual de present i patidor i sempre tan orgullós de la seva Maria del Mar. A les meves àvies Montse i Rat, gràcies per explicar-me batalletes de la masia i de Palencia, per confiar en mi i animar-me sempre a seguir endavant.

Gràcies als meus pares Manolu i Rat (Fig.10). Per estimar-me i ajudar-me sempre. Per mirar-me però no consentir-me que sinó podria haver sortit esquizofrènica! jajajaj, per confiar en mi i posar-me la vida tant fàcil. Si sóc com sóc és gràcies a vosaltres, gràcies al vostre exemple. Us estimo molt. Mama, espero que no m'hagis desheredat després de corregir quasi 300 pàgines de tesi sense connectors, ni metàfores...!. Gràcies a tots els meus animallets: Piga, Azri, Floc, Leo, per la vostra companyia i alegria.



Fig. 10 M&M&M

Finalment, gràcies a Passenger per la seva música que m'ha acompanyat i animat durant aquesta tesi:

Sing at the top of your voice  
And love without fear in your heart  
Feel, feel like you still have a choice  
If we all light up we can scare away the dark!!

# CONTINGUT



ABREVIATURES.....	27
INTRODUCCIÓ .....	33
1. LA PATOLOGIA ATEROSCLERÒTICA .....	35
1.1. INTRODUCCIÓ .....	35
1.2. FACTORS DE RISC .....	35
1.3. ESTRUCTURA DE L'ARTÈRIA .....	36
1.4. LA LESIÓ ATEROSCLERÒTICA .....	37
1.4.1. <i>Evolució de la lesió</i> .....	38
1.5. LA RESTENOSI .....	43
1.5.1. <i>Retracció elàstica</i> .....	46
1.5.2. <i>Activació de les plaquetes i la resposta inflamatòria</i> .....	47
1.5.3. <i>Migració i proliferació cel·lular</i> .....	49
1.5.4. <i>Remodelat vascular</i> .....	50
2. L'ANEURISMA D'AORTA ABDOMINAL .....	52
2.1. EPIDEMIOLOGIA I FACTORS DE RISC .....	52
2.2. FORMACIÓ DE L'AAA .....	56
3. MECANISMES DE REGULACIÓ EPIGENÈTICA EN LES MALALTIES CARDIOVASCULARS.....	60
3.1. MECANISMES EPIGENÈTICS .....	60
3.1.1. <i>Silenciament de gens associat a l'ARN d'interferència</i> .....	61
3.1.2. <i>Metilació de l'ADN</i> .....	61
3.1.3. <i>Modificació d'histones</i> .....	62
3.2. HISTONES DESACETILASES .....	62
3.3. INHIBIDORS DE LES HDAC .....	64
3.4. REGULACIÓ GÈNICA PER HDACs EN MALALTIES CARDIOVASCULARS .....	66
4. LA LISIL OXIDASA.....	68
4.1. INTRODUCCIÓ .....	68
4.2. EXPRESSIÓ I REGULACIÓ DE LA LOX .....	70
4.3. BIOSÍNTESI DE LA LOX .....	70
4.4. ACTIVITAT CATALÍTICA: MECANISME DE REACCIÓ.....	73
4.5. ALTRES FUNCIONS BIOLÒGIQUES DE LA LOX: ACTIVITATS INTRACEL·LULARS I INTRANUCLEARS .	75
4.6. LA LOX EN EL DESENVOLUPAMENT.....	76
4.7. PATOLOGIES RELACIONADES AMB ALTERACIONS EN L'ACTIVITAT LOX .....	76
4.7.1. <i>LOX i càncer</i> .....	77
4.7.2. <i>LOX i malalties cardiovasculars</i> .....	79

5. LA FIBULINA 5.....	84
5.1. INTRODUCCIÓ .....	84
5.2. PROPIETATS FÍSICO-QUÍMIQUES I ESTRUCTURALS .....	85
5.2.1. <i>Els motius EGF-like</i> .....	86
5.2.2. <i>El motiu RGD</i> .....	86
5.3. PATRÓ D'EXPRESSIONI .....	87
5.4. INTERACCIONS MOLECULARS.....	87
5.5. PAPER DE LA FBLN5 EN L'ELASTOGÈNESI .....	89
5.6. REGULACIÓ DE L'ADHESIÓ, LA PROLIFERACIÓ I LA MIGRACIÓ CEL·LULARS .....	93
5.7. FBLN5 I ANGIOGÈNESI .....	94
5.8. PATOLOGIES RELACIONADES AMB ALTERACIONS EN LA FBLN5.....	95
5.8.1. <i>FBLN5 i càncer</i> .....	95
5.8.2. <i>FBLN5 i malalties cardiovasculars</i> .....	96
6. ELS FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ SOX.....	98
6.1. INTRODUCCIÓ .....	98
6.2. EL DOMINI HMG: UNIÓ A L'ADN .....	99
6.3. SOX9 .....	100
6.3.1. <i>Patró d'expressió</i> .....	101
6.3.2. <i>Paper fisiopatològic i gens diana</i> .....	101
OBJECTIUS .....	103
METODOLOGIA.....	107
1- OBTENCIÓ DE MOSTRES DE PACIENTS .....	109
2- EXPERIMENTACIÓ ANIMAL .....	109
2.1. MANIPULACIÓ I SUPERVISIÓ DELS ANIMALS.....	109
2.1.1. <i>Procediment de supervisió del benestar animal</i> .....	109
2.2. GENERACIÓ D'UN MODEL DE RATOLÍ TRANSGÈNIC QUE SOBRE-EXPRESSA LA LOX HUMANA EN CML .....	111
2.2.1. <i>Construcció del transgèn</i> .....	111
2.2.2. <i>Generació dels ratolins transgènics TgLOX</i> .....	112
2.2.3. <i>Creuament, cria i identificació dels ratolins</i> .....	113
2.2.4. <i>Anàlisi de l'ADN genòmic</i> .....	113
2.3. MESURA DE LA PRESSIÓ SANGUÍNIA.....	114
2.4. HEMOGRAMA.....	115
2.5. MESURA DE LÍPIDS EN PLASMA .....	116
2.6. MESURA DE PARÀMETRES ECOCARDIOGRÀFICS .....	116
2.7. LLIGADURA DE CARÒTIDA .....	118
2.8. TRACTAMENT FARMACOLÒGIC DELS ANIMALS.....	121

3. CULTIUS CEL·LULARS .....	121
3.1. OBTENCIÓ I CULTIU PRIMARI DE CMLV.....	122
3.1.1. <i>Obtenció i cultiu primari de CMLV d'aorta murines</i> .....	122
3.1.2. <i>Obtenció i cultiu primari de CMLV d'aorta humanes</i> .....	122
4. CLONATGE, AMPLIFICACIÓ I PURIFICACIÓ D'ADN PLASMÍDIC .....	124
4.1. OBTENCIÓ DE LA SEQÜÈNCIA A CLONAR (INSERT) .....	124
4.2. DIGESTIÓ I DEFOSFORILACIÓ DEL PLASMIDI RECEPTOR DE L'INSERT .....	125
4.3. LLIGACIÓ .....	125
4.4 TRANSFORMACIÓ .....	125
4.4.1. <i>Preparació de bacteris competents</i> .....	125
4.4.2. <i>Transformació de bacteris competents amb ADN plasmídic</i> .....	126
4.4.3. <i>Comprovació dels clons</i> .....	126
4.4.4. <i>Purificació d'ADN plasmídic</i> .....	126
5. ANÀLISI D'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL .....	127
5.1. GENERACIÓ DE LES CONSTRUCCIONS .....	127
5.1.1. <i>Construccions del promotor de FBLN5</i> .....	127
5.2. ANÀLISI DE SEQÜÈNCIES .....	128
5.3. MUTAGÈNESI DIRIGIDA.....	128
5.4. TRANSFECCIÓ TRANSITÒRIA I ASSAIG DE LUCIFERASA .....	129
6. ANÀLISI D'EXPRESSION.....	129
6.1. EXTRACCIÓ D'ARN .....	129
6.2. DETERMINACIÓ DE LA QUANTITAT I QUALITAT DE L'ARN .....	130
6.3. RT-PCR A TEMPS REAL.....	130
7. ANÀLISI DE L'EXPRESSION PROTEICA.....	132
7.1. OBTENCIÓ D'EXTRACTES PROTEICS .....	132
7.1.1. <i>Extractes cel·lulars</i> .....	132
7.1.2. <i>Sobrenedants de cèl·lules en cultiu</i> .....	132
7.1.3. <i>Extractes de teixit</i> .....	132
7.1.4. <i>Secretomes</i> .....	133
7.2. WESTERN-BLOT .....	133
7.3. IMMUNOCITOQUÍMICA.....	134
7.3.1. <i>Detecció fluorescent</i> .....	134
7.4. CITOMETRIA DE FLUX.....	136
7.5. ELISA .....	136



8. HISTOLOGIA.....	136
8.1. PROCESSAT DE LES MOSTRES.....	136
8.2. PREPARACIÓ DELS PORTAOBJECTES.....	137
8.3. TINCIONS I IMMUNOHISTOQUÍMICA .....	137
8.3.1. <i>Hematoxilina-Eosina</i> .....	137
8.3.2. <i>Immunohistoquímica</i> .....	138
9. SOBRE-EXPRESSIÓ PROTEICA EN CÈL·LULES EN CULTIU MITJANÇANT TRANSDUCCIÓ LENTIVIRAL .....	139
9.1. CLONATGE EN EL VECTOR LENTIVIRAL.....	139
9.2. PRODUCCIÓ DE LENTIVIRUS.....	140
9.3. DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PUOMICINA I POLIBRÉ.....	141
10. SILENCIAMENT DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA MITJANÇANT SIRNA .....	142
11. ANÀLISI DE L'ACTIVITAT LISIL OXIDASA.....	143
12. QUANTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DEL CONTINGUT DE COL·LAGEN .....	143
12.1. QUANTIFICACIÓ DEL COL·LAGEN TOTAL .....	143
12.2. ANÀLISI DEL GRAU D'ENTRECREUAMENT DEL COL·LAGEN: TINCIÓ AMB VERMELL SIRI .....	144
12.3. ASSAIG DE POLIMERITZACIÓ DEL COL·LAGEN.....	145
13. ANÀLISI D'UNIÓ PROTEÏNA-ADN.....	146
13.1. IMMUNOPRECIPITACIÓ DE CROMATINA (CHIP).....	146
14. ANÀLISI DE LA PROLIFERACIÓ DE CMLV.....	149
14.1. RECOMPTE CEL·LULAR .....	149
14.2. DETERMINACIÓ DE LA SÍNTESI D'ADN.....	149
15. ANÀLISI DE LA MIGRACIÓ DE CMLV.....	150
15.1. ASSAIG DE MIGRACIÓ PER CAMBRA DE BOYDEN MODIFICADA.....	150
15.2. ASSAIG DE REPARACIÓ DE FERIDA.....	151
16. ANÀLISI ESTADÍSTICA.....	151
RESULTATS.....	153
1. GENERACIÓ I CARACTERITZACIÓ D'UN RATOLÍ TRANSGÈNIC QUE SOBRE- EXPRESSA LA LOX ESPECÍFICAMENT EN CML .....	155
1.1. ELS RATOLINS TRANSGÈNICS TGLOX SOBRE-EXPRESSEN LA LOX ENZIMÀTICAMENT ACTIVA ..	158

---

2. LA SOBRE-EXPRESSIONIÓ DE LA LOX REDUEIX LA TAXA DE PROLIFERACIÓ CEL·LULAR EN CMLV MURINES I HUMANES .....	164
3. AVALUACIÓ DEL PAPER DE LA LOX EN EL REMODELAT VASCULAR INDUÏT PER LLIGADURA DE L'ARTÈRIA CARÒTIDA .....	173
3.1. LA SOBRE-EXPRESSIONIÓ DE LA LOX ATENUA LA FORMACIÓ DE NEOÍNTIMA INDUÏDA PER LA LLIGADURA DE L'ARTÈRIA CARÒDITA. ....	173
3.2. ESTUDI DEL PAPER DE LA LOX EN LA RESPOSTA INFLAMATÒRIA DESENCADENADA PER LA LLIGADURA DE CARÒTIDA .....	177
4. INHIBICIÓ DE L'EXPRESSIONIÓ DE LA FBLN5 EN L'AAA: REGULACIÓ PER ESTÍMULS INFLAMATORIS EN CMLV .....	182
4.1. L'EXPRESSIONIÓ I SECRECIÓ DE LA FBLN5 ES TROBA REDUÏDA EN MOSTRES D'AAA .....	183
4.2. EL TRACTAMENT AMB ESTÍMULS INFLAMATORIS REDUEIX L'EXPRESSIONIÓ VASCULAR DE LA FBLN5 .....	186
4.3. VIES DE SENYALITZACIÓ IMPLICADES EN LA REGULACIÓ DE LA FBLN5 .....	190
4.4. EL TRACTAMENT AMB INHIBIDORS DE LES HDACS NORMALITZA L'EXPRESSIONIÓ VASCULAR DE LA FBLN5 ALTERADA PELS ESTÍMULS INFLAMATORIS. ....	193
4.5. ELS ESTÍMULS INFLAMATORIS DISMINUEIXEN L'EXPRESSIONIÓ DE LA FBLN5 MITJANÇANT UN MECANISME DE REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL .....	197
4.6. L'EXPRESSIONIÓ VASCULAR DE SOX9 ÉS INHIBIDA EN L'AAA I PER ESTÍMULS INFLAMATORIS EN CMLV. ....	202
4.7. L'EXPRESSIONIÓ DE SOX9 ÉS INDUÏDA PEL TRACTAMENT AMB IHDAC LIMITANT AIXÍ LA INHIBICIÓ DE FBLN5 PER ESTÍMULS INFLAMATORIS.....	209
DISCUSSIÓ.....	213
CONCLUSIONS.....	223
BIBLIOGRAFIA .....	227
APÈNDIX 1 MEDIS, SOLUCIONS I REACTIUS.....	263
APÈNDIX 2 PUBLICACIONS .....	271



# ABREVIATURES



---

AAA	Aneurisma d'Aorta Abdominal
AAT	$\alpha$ -1-antitripsina
ADN	Àcid Desoxiribonucleic
ADNc	ADN complementari
ADP	Adenosina difosfat
Agc1	Agrecà
AMH	Hormona anti-Mullerian
AP-1	Proteïna Activadora 1
ApoE <sup>-/-</sup>	Ratolins deficients en apolipoproteïna E
ARN	Àcid Ribonucleic
ARNm	ARN Missatger
ARNr	ARN Ribosòmic
BAPN	$\beta$ -aminopropionitril
BCA	Àcid Bicinconínic
bFGF	Factor de Creixement Bàsic de Fibroblasts (FGF-2, FGF- $\beta$ )
BMP-1	Proteïna Morfogènica Òssia-1
BSA	Albúmina Sèrica Bovina
cbEGF	Mòdul <i>Epidermal Growth Factor-like</i> d'unió a calci
CCR2	Receptor de quimiocines C-C tipus 2
CD	Síndrome displàsia capomèlica
CDV	Cardiovascular
CE	Cèl·lules Endotelials
CEBP	Proteïna d'unió al potenciador CCAAT- $\beta$
ChIP	Immunoprecipitació de Cromatina
CIAP	Fosfatasa alcalina intestinal bovina
CIP	Cocktail inhibidor de proteases
CML	Cèl·lules Musculars Llises
CMLV	Cèl·lules Musculars Llises Vasculars
CMLVm	Cèl·lules Musculars Llises Vasculars Murines
Comp	Proteïna oligomèrica de cartílag
DMSO	Dimetil sulfòxid
DNMT	ADN metil-transferases
dNTP	DeSoxiribonucleòtids trifosfat
DTT	Ditiotreitòl
EDTA	Àcid etilendiamintetraacètic
EGF	Factor de Creixement Epidèrmic
EGF-like	Mòdul <i>Epidermal Growth Factor-like</i>

## ABREVIATURES

---

EGTA	Àcid etilen glicol tetraacètic
EMSA	Assaig de Retard de la Mobilitat Electroforètica
EMT	Transició d'Epiteli a Mesènquima
eNOS	Òxid nítric sintasa endotelial
FACS	Selecció Cel·lular Activada per Fluorescència
FBLN	Fibulina
FC	<i>Fold Change</i>
FITC	Isotiocianat de fluoresceïna
FSP	Proteïna de superfície de fibroblasts
GAPDH	Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa
GFP	Proteïna Verda Fluorescent
GM-CSF	Factor estimulant de colònies de granulòcits i macròfags
HAT	Histones acetil transferases
HDAC	Histones desacetilases
HC	Homocisteïna
HIF	Factor de Transcripció Induïble per Hipòxia
HMG	<i>High mobility group</i>
Hsp90	<i>Heat Shock Protein 90</i>
iHDAC	Inhibidor d'HDAC
i.p.	Intraperitoneal
ICAM	Molècula d'adhesió intercel·lular
IFN- $\gamma$	Interferó $\gamma$
IGF-1	Factor de Creixement de tipus Insulina 1
iHDAC	Inhibidor d'histones desacetilases
IL	Interleucina
ILT	Trombe intraluminal
LB	Medi Luria Bertain
LDL	Lipoproteïnes de Baixa Densitat
LDLR	Receptor d'LDL
LEE	Làmina elàstica externa
LEI	Làmina elàstica interna
LOX	Lisil Oxidasa
LOXh	LOX humana
LOXL	LOX-like
LOX-PP	Propèptid de LOX
LPS	Lipopolisacàrid
LTBP	Proteïna d'Unió al TGF- $\beta$ Latent

---

LTQ	Lisil Tirosil Quinona
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
Mac-1	Antígen de macròfags 1
MAPK	Proteïnes Cinasa Activades per Mitògens
Matn-1	Matrillina 1
MCP-1	Proteïna Quimiotàctica de Monòcits 1
MCS	<i>Multi cloning site</i>
M-CSF	Factor estimulant de colònies de macròfags
MEC	Matriu Extracel·lular
miARN	Micro ARN
mmLDL	LDL mínimament modificades
MMP	Metal·loproteases de Matriu
MMTV	Virus tumoral mamari de ratolí
MOI	Multiplicitat d'infecció
mTLD	Mammalian Tolloid protein
mTKK	Mammalian Tolloid like protein
Myh10	Marcador de canvi fenotípic de CML
NfκB	Factor nuclear κB
NO	Òxid nítric
PAI-1	Inhibidor de l'activador del plasminogen tissular
pb	Parells de bases
PBS	Solució salina tamponada amb fosfat
PCNA	Marcador de proliferació cel·lular
PCP	Procol·lagen C-proteinases
PCR	Reacció en Cadena de la Polimerasa
PDGF	Factor de Creixement Derivat de Plaquetes
PDGF-B B	Homodímer format per dues subunitats B de PDGF
PDGF-R-β	Receptor de PDGF tipus β
PGE2	Prostaglandina E2
PI3K	Fosfoinositol 3 Cinasa
preproLOX	Preproteïna LOX
proLOX	Proenzim LOX
q.s.p.	Quantitat suficient per
RE	Reticle Endoplàsmic
RISC	Complex de silenciament induït per ARN
RLB	<i>Reporter lysis buffer</i>
ROS	Espècies Reactives d'Oxigen



## ABREVIATURES

---

RT-PCR	Retrotranscripció acoblada a la PCR
SD	Desviació estàndard
SDS	Dodecil sulfat sòdic
SEM	Error Estàndard de la Mitjana
SF1	Factor esteroidegènic 1
SFB	Sèrum fetal boví
siRNA	ARN d'interferència
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
SOD3	Superòxid Dismutasa Extracel·lular
SOX	<i>Sex determining region Y related High mobility group box</i>
SPF	<i>Specific pathogen free</i>
SR	Receptors Scavenger
Sry	<i>Sex determining region Y</i>
TBP	<i>TATA-binding protein</i>
TE	Tampó Tris-EDTA
TGF- $\beta$	Factor de Creixement Transformant $\beta$
TGF $\beta$ R	Receptor del TGF $\beta$
TgLOX	Ratolins transgènics per a la LOX humana
TIMP	Inhibidor Tissular de Metal·loproteases de Matriu
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosi Tumoral alfa
TSA	Triscostatina A
t-PA	Activador del plasminogen tissular
U.A.	Unitat d'Absorbància
VCAM-1	Molècula d'Adhesió Vasculat 1
VEGF	Factor de Creixement de l'Endoteli Vasculat
vWF	Factor de Von Willebrand

# INTRODUCCIÓ



## 1. LA PATOLOGIA ATEROSCLERÒTICA

### 1.1. Introducció

L'aterosclerosi és una patologia inflamatòria crònica que es caracteritza per la formació d'una placa d'ateroma (del grec *atheroma*, dipòsit ple de material pastós) a la paret arterial. És una malaltia lenta que s'inicia durant la infància i que progressa de forma asimptomàtica durant la vida adulta [1], [2]. En el seu estat avançat, aquesta malaltia pot provocar l'oclusió parcial o total d'una artèria generant complicacions que poden provocar la mort de l'individu. De fet, les malalties cardiovasculars (CDV) són la causa principal de mortalitat i morbiditat en els països desenvolupats, essent el motiu sotsjacent al 50% de la mortalitat total, i la seva importància és creixent en països en desenvolupament. L'Organització Mundial de la Salut estima en 17,3 milions les morts causades per malalties CDV arreu del món l'any 2008, i prediu que aquest nombre augmenti a 23,6 milions l'any 2030 [3].

### 1.2. Factors de risc

L'aterosclerosi és una malaltia complexa i multifactorial, fet que complica el seu estudi, prevenció i tractament. S'han associat una gran varietat de factors de risc entre els quals destaquen els antecedents familiars, la hipercolesterolèmia [4], la hipertensió arterial [5], la diabetis [6], la síndrome metabòlica [7], una dieta rica en greixos saturats i colesterol [8], el sedentarisme [6], el tabaquisme [9] o bé diferents agents infecciosos [10]. Entre tots els factors de risc identificats per estudis epidemiològics, la hipercolesterolèmia és, probablement, el més predictiu en el desenvolupament de l'aterosclerosi, inclòs en absència d'altres factors de risc [11].

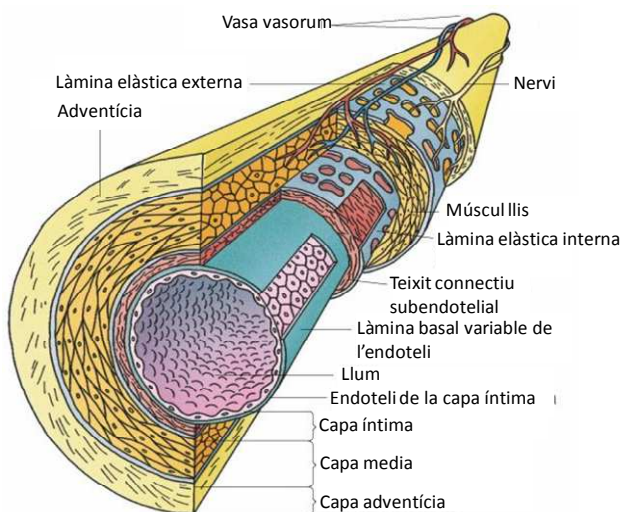
### 1.3. Estructura de l'artèria

En una situació fisiològica normal, la paret arterial està formada per tres capes ben diferenciades: l'adventícia, la mèdia i l'íntima (Fig. 1).

La capa més externa és l'adventícia. Està formada principalment per matriu extracel·lular (MEC) i fibroblasts. Constitueix el suport per a les terminacions nervioses i els *vasa vasorum*, una xarxa finíssima de vasos que s'encarreguen d'aportar nutrients i oxigen a la paret arterial.

Separada de l'adventícia per la làmina elàstica externa trobem la túnica mèdia. Aquesta capa és la que presenta un gruix més important i és l'encarregada de mantenir el to vascular. Està formada per cèl·lules musculars llises vasculares (CMLV), fibres elàstiques i fibres de col·lagen en proporció variable segons el tipus d'artèria.

A la cara més luminal, separada de la mèdia per la làmina elàstica interna, trobem l'íntima. Aquesta està constituïda per una monocapa de cèl·lules endotelials (CE) i per la làmina basal de teixit fibroelàstic sobre la que reposen. La monocapa de CE o endoteli constitueix una barrera de permeabilitat selectiva entre les cèl·lules i components sanguinis i el teixit vascular, alhora que exerceix un paper actiu en la regulació de l'homeòstasi vascular [12].

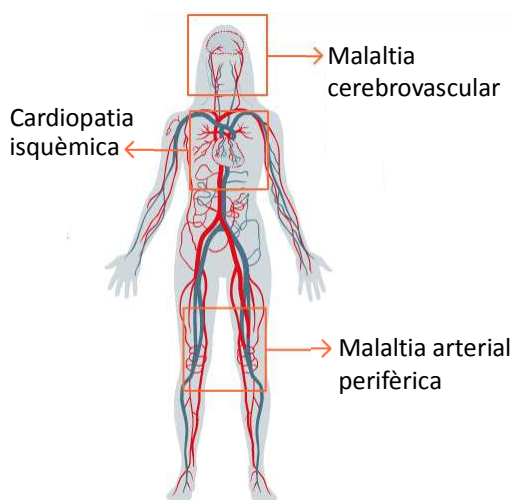


**Figura 1. Estructura de les artèries.** Representació esquemàtica de les principals capes de les artèries (íntima, mèdia i adventícia) i les làmines elàstiques que les separen (làmines elàstiques interna i externa).

## 1.4. La lesió ateroscleròtica

Tot i que la patologia ateroscleròtica és un fenomen conegut des de l'antiguitat clàssica (encara que no s'hi relacionaven els accidents CDV que se'n derivaven), les primeres teories que tracten d'explicar-ne el seu origen no apareixen fins al segle XIX. No va ser, però, fins a la dècada dels 90 (segle XX.) que R. Ross formulà la teoria més acceptada avui dia, la de la resposta a la lesió. Aquesta defineix l'aterosclerosi com una malaltia inflamatòria fibroproliferativa crònica originada per un dany a l'endoteli [9]. Aquesta alteració de l'endoteli o disfunció endotelial desencadenaria una sèrie de mecanismes que conduirien a la infiltració de cèl·lules inflamatòries a l'espai subendotelial, a la proliferació i migració de les CMLV i a la deposició de material lipídic, calci i matriu extracel·lular produint la fibrosi de la capa íntima de la paret arterial, anomenada placa d'ateroma. Durant la seva evolució, l'artèria es va obstruint gradualment i pot evolucionar fins a lesions altament inestables. Aquestes darreres poden donar lloc a episodis clínics aguts promoguts en la majoria dels casos per la ruptura de la placa i la consegüent trombosi [3], [13].

En humans afecta principalment les artèries de mitjà i gran calibre i segons les zones que irriguen les artèries afectades podem diferenciar tres tipus generals de malalties CDV d'origen ateroscleròtic [14] (Fig. 2):



**Figura 2. Malalties cardiovasculars d'origen ateroscleròtic**

- **Malaltia cerebrovascular:** patologia que afecta els vasos sanguinis que irriguen el cervell (artèria caròtida).
- **Cardiopatia isquèmica:** patologia que afecta els vasos sanguinis que irriguen el cor (artèries coronàries).
- **Malaltia arterial perifèrica:** quan el dany es produeix en vasos sanguinis allunyats del cor com ara els que irriguen els membres superiors i inferiors (aorta, artèries ilíaqües i artèries femorals).

### 1.4.1. Evolució de la lesió

#### 1.4.1.1. Lesió inicial: disfunció endotelial

S'ha denominat disfunció endotelial a qualsevol alteració de la fisiologia de l'endoteli que afecta o compromet el seu funcionament normal desencadenant una sèrie d'esdeveniments que promouen la formació de lesions ateroscleròtiques. Un dels canvis més importants, responsable de la disfunció endotelial, és la disminució de la biodisponibilitat d'òxid nítric (NO), derivada en part de la inhibició de l'enzim responsable de la seva síntesi, l'òxid nítric sintasa endotelial (eNOS) [15], [16]. En resposta a un dany provocat per estímuls proaterogènics (colesterol, toxines bacterianes com el lipopolisacàrid (LPS), citocines proinflamatòries, etc.) l'endoteli pateix un desequilibri en les seves funcions que es reflexa en un canvi profund en el seu patró d'expressió gènica. L'endoteli activat per agents aterogènics indueix l'expressió de molècules d'adhesió per a receptors específics de monòcits i limfòcits T, com les E- i P-selectines, les molècules d'adhesió intercel·lular (ICAM-1, 2 i 3) i VCAM-1 [17] així com diferents substàncies quimioattractants, les quals afavoreixen la infiltració de leucòcits a l'espai subendotelial (Fig. 3) [18], [19]. Per tant, la disfunció endotelial afavoreix l'aparició de zones d'inflamació a la paret arterial.

L'anatomia de les artèries també influeix en el funcionament de l'endoteli. En les regions on el flux sanguini és laminar, les CE són el·lipsoides i es troben alineades en la direcció del flux. En canvi, en les curvatures o bifurcacions, on el flux sanguini és interromput o canvia de direcció, les CE són poligonals i no tenen una orientació determinada. En aquests punts l'endoteli presenta una major permeabilitat a macromolècules com les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL), i les possibilitats d'iniciar-s'hi una lesió són més elevades [20]. En interaccionar amb els components de la MEC, principalment els proteoglicans, les LDL queden parcialment immobilitzades [21], fet que afavoreix que pateixin alteracions químiques com oxidació o glicosilació. També s'ha descrit que la hipercolesterolèmia augmenta la permeabilitat endotelial, fet que afavoreix encara més la internalització de lípids a l'espai subendotelial [22].

### 1.4.1.2. Inflamació

El procés ateroscleròtic s'acompanya d'una resposta inflamatòria-fibroproliferativa crònica. En resposta a la infiltració de LDL, les CE i les CMLV alliberen molècules quimioattractants com la proteïna quimiotàctica de monòcits 1 (MCP-1) o la interleucina-8 (IL-8), afavorint encara més el reclutament de cèl·lules inflamatòries [23]. Un cop a l'espai subendotelial, els monòcits es diferencien a macròfags activats per citocines com el factor estimulant de colònies de macròfags (M-CSF) juntament amb altres molècules secretades pels limfòcits T o les mateixes CE en resposta a les LDL oxidades [24], [25]. Els macròfags presenten antígens que activen els limfòcits T, els quals responen amb l'alliberació d'interferó  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Aquesta citocina, al seu torn, activa els macròfags i altres tipus cel·lulars, com les CMLV, promovent que secretin altres citocines proinflamatòries com el TNF- $\alpha$  (Factor de Necrosi Tumoral  $\alpha$ ) o la interleucina 1 (IL-1), amplificant així el procés inflamatori [23], [26] (Fig. 3).

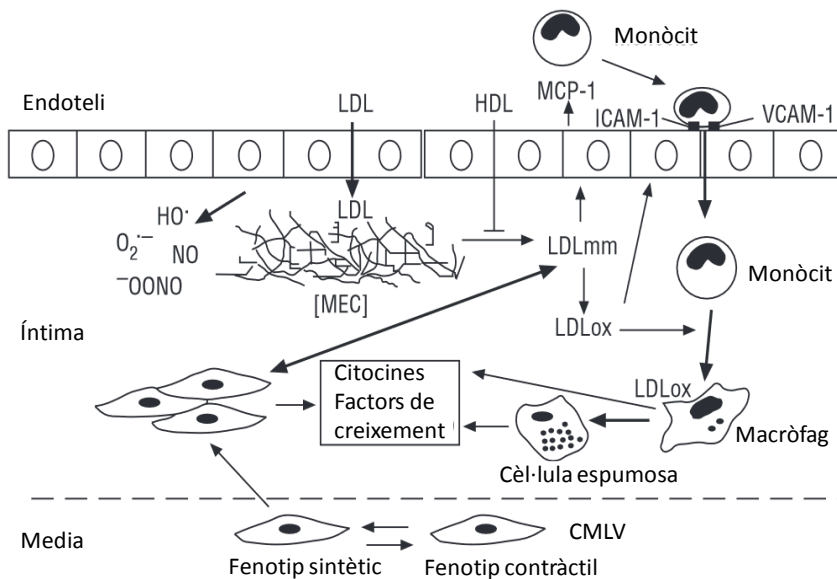
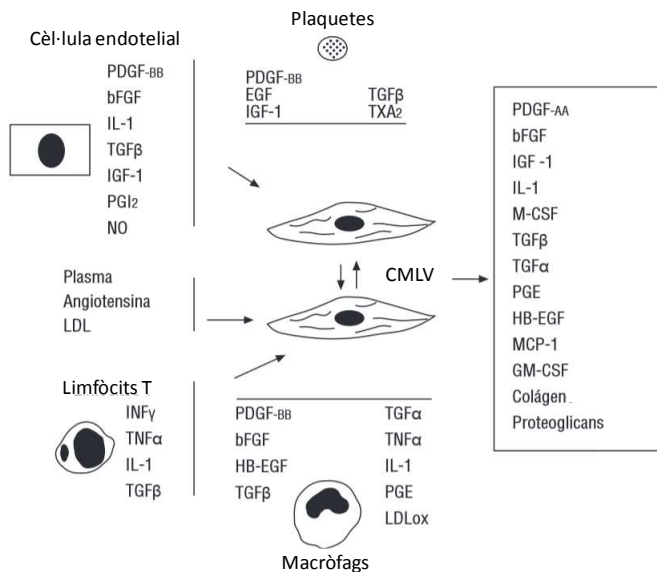


Figura 3. Esquema dels mecanismes cel·lulars i moleculars que determinen l'evolució de les lesions ateroscleròtiques. Imatge obtinguda de Martínez *et al.* (2001) [27].



Els macròfags i les CE produeixen espècies reactives d'oxigen (ROS) i enzims del tipus mieloperoxidases, esfingomielinases i fosfolipases, els quals contribueixen encara més a la modificació de les LDL de tal manera que poden ser captades per macròfags gràcies als seus Receptors *Scavenger* (SR), com l'SR-A o el CD36 [28]. D'aquesta manera, els macròfags acumulen grans quantitats d'èsters de colesterol, que provoquen els canvis fenotípics pels quals reben el nom de cèl·lules escumoses (Fig. 3). Al seu torn, les cèl·lules escumoses produeixen ROS i factors de creixement, els quals retroalimenten la inflamació local i la resposta proaterogènica [29]. Els agents quimioatracients, principalment el factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF), activen les CMLV de la capa mèdia, les quals pateixen una transformació fenotípica: CMLV de fenotip contràctil no proliferatiu es transformen en cèl·lules que proliferen activament, que migren atretes per agents quimiotàctics i que produeixen proteïnes de MEC (col·lagen, elastina i proteoglicans). Aquesta transformació activa l'expressió de gens que codifiquen factors de creixement com el PDGF, citocines com el factor de creixement transformant  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) o la IL-1 $\beta$  així com els seus receptors de membrana, a través dels quals les CMLV modulen la seva pròpia activitat i la d'altres cèl·lules que intervenen en l'aterogènesi. A la Figura 4. es resumeixen alguns dels factors de creixement, citocines i altres molècules mitjançant les quals es modulen entre si les activitats de les CMLV, les CE i els monòcits/macròfags. Com a resultat d'aquest procés, les CMLV proliferen i migren de la capa mèdia a l'espai subendotelial donant lloc a una nova capa a la paret arterial, que es coneix com a neointima (Fig. 3). Aquest procés es veu afavorit per un augment dels nivells de metal·loproteases de matriu (MMP) per part dels macròfags, CE i CMLV promogut pels mateix PDGF i altres agents mitògens, com el factor de creixement bàsic de fibroblasts (bFGF), el factor de creixement epidèrmic (EGF), la trombina o l'angiotensina II [30]. Per altra banda, el balanç local entre l'activitat de l'activador del plasminogen tissular (t-PA) i del seu inhibidor (PAI-I) pot repercutir en el procés de migració de les CMLV i de la síntesi/degradació de matriu extracel·lular i, en conseqüència, en l'evolució de les lesions [31].

Tot aquests processos provoquen l'engruiximent de la paret arterial, causant una estenosi luminal [32]. La lesió es pot apreciar a simple vista i es denomina estria grassa. La majoria d'individus dels països desenvolupats arriben a aquest estadi a edats molt primerenques (infància i adolescència) [33].



**Figura 4. Activació de les CMLV per factors de creixement, citocines i altres molècules sintetitzades per diferents cèl·lules que participen en l'aterogènesi (CE, plaquetes, CMLV, limfòcits T i macròfags).** S'indiquen alguns dels factors de creixement, citocines i macromolècules la síntesi de les quals es veu afectada en el procés d'activació de les CMLV. Imatge obtinguda de Martínez *et al.* (2001) [27].

#### 1.4.1.3. Lesió avançada i trombosi

Les CMLV són el component cel·lular majoritari de les lesions ateroscleròtiques inicials, representant fins a un 90% del contingut cel·lular. En canvi, en plaques ateroscleròtiques avançades, la major part de l'engruiment es deu a l'acumulació de MEC, més que no pas de cèl·lules les quals representen tan sols un 1% [34]. Hi trobem col·làgens intersticials (tipus I i III), proteoglicans i fins i tot fibres elàstiques. Això es deu al fet que les CMLV, que han canviat el seu fenotip contràctil per un de sintètic, produeixen proteïnes de MEC de manera similar a com ho farien durant el desenvolupament embrionari. Els factors de creixement també intervenen en aquest procés, com el PDGF o el TGF-β1, els quals promouen una síntesi de col·lagen excessiva per part de les CMLV. L'acumulació creixent de cèl·lules i matriu, així com de lípids, pot acabar formant una coberta fibrosa [33], [35], la qual cobreix el que es coneix com a nucli lipídic o necròtic, en el qual trobem restes de cèl·lules escumoses que, ja sigui per l'efecte tòxic de la càrrega lipídica, com per les citocines proapoptòtiques i elements oxidatius presents en aquest microambient, moren per processos apoptòtics o necròtics [36].

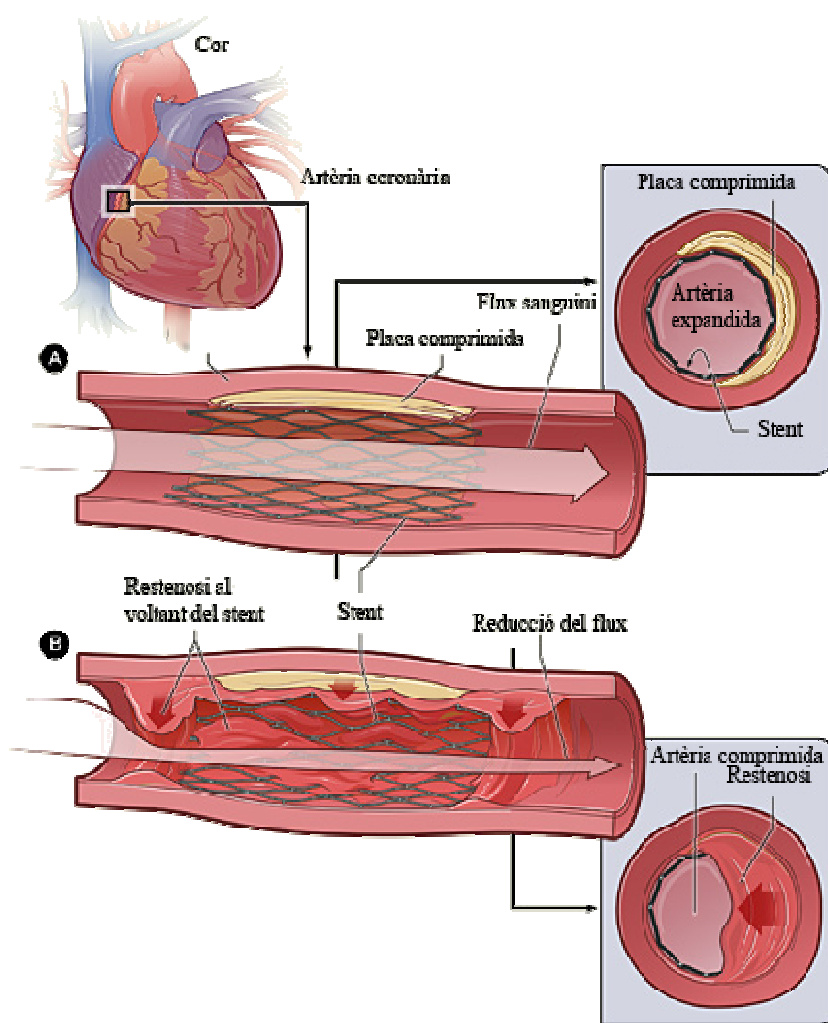
L'engruiximent de la placa ateroscleròtica, juntament amb l'elevada taxa de consum d'oxigen de les cèl·lules escumoses, provoca l'aparició de regions d'hipòxia en les àrees més internes de la placa [37], [38]. En les plaques avançades es donen fenòmens d'angiogènesi, procés pel qual es formen nous vasos sanguinis a partir de vasos preexistents. L'angiogènesi s'ha correlacionat amb la hipòxia intraplaca [38], fet que es pot interpretar com una resposta adaptativa encarada a restaurar el subministrament d'oxigen als teixits [39]. No obstant això, el més freqüent és que els neovasos formats no acabin de ser funcionals, amb parets febles, fuites i vasos cebs, fet que contribueix a la inestabilització de la lesió [40]. Durant l'evolució de la lesió, les plaques ateroscleròtiques poden complicar-se al patir hemorràgies provocades per la ruptura de neovasos i fenòmens de calcificació. Aquest últim és un fenomen tardà en la progressió de la lesió ateroscleròtica [41], [42].

Finalment, les lesions ateroscleròtiques avançades poden donar lloc a plaques estables, que evolucionen reduint la llum del vas, provocant per exemple l'angina de pit estable [43]. Però també poden donar lloc a plaques inestables o vulnerables, caracteritzades per tenir una fina coberta fibrosa degut a una reducció del contingut en elastina i col·lagen, a una gran activitat de MMP i a la presència d'un nucli lipídic inflamatori i necròtic important [44]–[47]. Aquestes plaques poden trencar-se o erosionar-se, provocant la formació d'un trombe, el qual pot ocasionar un episodi clínic agut, com l'infart de miocardi o l'íctus [13]. Les plaques inestables, per tant, són les que originen els episodis clínics més greus derivats de l'aterosclerosi.

## 1.5. La restenosi

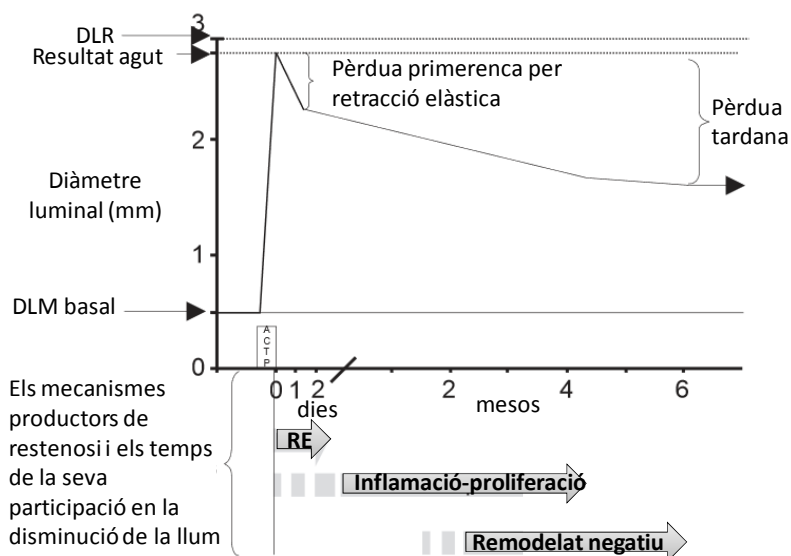
L'angioplàstia coronària és el tractament més segur i eficaç per a desbloquejar les artèries coronàries estretes o obstruïdes per la presència de placa ateroscleròtica. Durant el procediment, s'insereix un catèter a l'engonal o al braç del pacient que, a través de l'aorta, es fa arribar fins les artèries coronàries. Seguidament, l'artèria obstruïda s'obre comprimint la placa amb un globus situat a l'extrem del catèter millorant així la irrigació del cor. Inicialment, l'angioplàstia es va realitzar únicament amb catèters de baló, però els avenços tècnics han millorat la tècnica amb la col·locació d'unes malles metàl·liques anomenades "*stents*" en el lloc de l'obstrucció que serveixen com a bastida per mantenir l'artèria oberta. Tanmateix, aquestes tècniques presenten una limitació associada, la restenosi. Tal com mostra la Figura 5, l'obertura de l'artèria mitjançant un baló o un *stent* produeix una lesió vascular que desencadena tot un conjunt de mecanismes biològics de reparació que provoquen una hiperplàsia de l'íntima reduint de nou la llum vascular [48]. En comparació amb l'angioplàstia amb baló, on la possibilitat de reestenosi és del 40%, la implantació de *stents* redueix la possibilitat de reestenosi al 25% [49].

El grau de lesió originat a la paret arterial és un factor determinant en la intensitat de la resposta reparadora que es desenvolupa. En el cas de les lesions per angioplàstia coronària es generen lesions de grau III amb denudació endotelial, trencament de la làmina elàstica interna i dissecció de la capa mitjana [50]. L'ampliació de la llum del vas es deu a un efecte combinat de la reducció de la placa (compressió/embolització) i la redistribució d'aquesta de forma axial dins la lesió [51], [52].



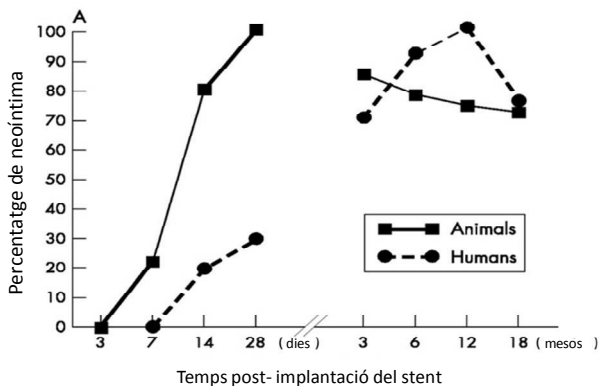
**Figura 5. Restenosi d'una artèria coronària eixamplada pel stent.** A) El stent expandit comprimeix la placa i eixampla l'artèria, permetent el flux normal de la sang. B) Amb el temps, el teixit cicatricial creix a través i al voltant del stent. Això provoca un bloqueig parcial de l'artèria i un flux sanguini anormal.

Tal com mostra la Figura 6, en la restenosi es distingeixen 4 fases diferenciades. En la fase aguda post-angioplàstia, les forces elàstiques provoquen una retracció elàstica espontània de l'artèria disminuint la llum del vas. Seguidament, la formació d'un trombe mural, juntament amb l'activació de les CMLV de la capa mitjana, donaran pas a la fase de migració i proliferació cel·lulars i, finalment, de remodelat vascular provocant l'engruiximent progressiu de la capa íntima i l'estenosi de la llum vascular.



**Figura 6. Evolució del diàmetre luminal de l'artèria coronària sotmesa a angioplàstia durant les diferents fases de la restenosi. DLR, diàmetre luminal de referència. DLM, diàmetre luminal mínim. RE, retracció elàstica. Exemple d'artèria amb DLR de 3.0 mm, amb estenosi residual de 4,2% i estenosis de seguiment de 45,8%.**

Aquesta seqüència en models animals com el porc, el conill o la rata, pot oscil·lar entre 4-8 setmanes després de la intervenció, mentre que en l'home, és més lenta i es desenvolupa al voltant dels 6 mesos [49] (Fig. 7).



**Figura 7. Cinètica del desenvolupament d'hiperplàsia intimal en model porcí d'angioplàstia coronària en comparació amb els humans.** Relació temporal del creixement de la neointíma en animals i humans després de la col·locació d'un *stent* nu d'acer inoxidable. Les dades deriven principalment d'anàlisis morfològiques de *stents* coronaris en porcs i humans. En animals, el pic de creixement neointimal s'observa als 28 dies, en comparació amb els humans que s'observa als 6-12 mesos [53] post-intervenció. Imatge obtinguda de Chaabane *et al.* (2013) [54].

### 1.5.1. Retracció elàstica

La retracció elàstica (*elastic recoil*) és la pèrdua luminal, que s'observa en alguns casos, generalment a la fase subaguda post-intervenció degut a les forces elàstiques de la paret arterial i com a conseqüència de la sobre-extensió de la paret provocada pel baló. Aquest procés pot resultar en una pèrdua de fins un 40% de l'àrea luminal [55]. Malgrat que l'aplicació de *stents* ha suposat una millora molt significativa eliminant la retracció elàstica, el desenvolupament de restenosi continua essent un problema limitant.

## 1.5.2. Activació de les plaquetes i la resposta inflamatòria

### 1.5.2.1. Activació de les plaquetes i formació del trombe mural

Degut a la denudació de l'endoteli, hi ha una exposició a agents mitògens circulants, com l'angiotensina II i la plasmina. El factor tissular, iniciador de la via extrínseca de la coagulació, que és expressat per les CMLV i que s'indueix en les lesions ateroscleròtiques [56], [57], és alliberat i s'activa desencadenant la síntesi de trombina, l'agonista plaquetari més potent [58]. En conseqüència, mitjançant la interacció entre els receptors de les glicoproteïnes de la membrana plaquetària, el col·lagen subendotelial, el factor de von Willebrand i la fibronectina, s'inicia el procés d'adhesió i agregació plaquetària formant un trombe mural, ric en plaquetes i fibrina, sobre la superfície luminal denudada. A més, l'alliberament del contingut dels grànuls plaquetaris, rics en adenosina difosfat (ADP), tromboxà A<sub>2</sub> i serotonina, així com diversos factors quimiotàctics, retroalimenta l'agregació plaquetària a la vegada que promou l'activació de les CMLV de la capa mèdia. La formació del trombe prediu el desenvolupament de restenosi tardana [59], [60]. De fet, el trombe *per se* té propietats quimiotàctiques ja que alguns components de la via de coagulació, com el factor X, el factor S o la trombina, són compostos mitogènics per a les CMLV i pot actuar com a matriu on les CMLVs migren i sintetitzen MEC formant la neoíntima [61] (Fig. 8). Un bon nombre de treballs experimentals han demostrat que la inhibició de la trombosi aguda (amb inhibidors del factor tissular, antitrombines, anti-IIb-IIIa, etc.) redueix la hiperplàsia intimal [62]–[64].

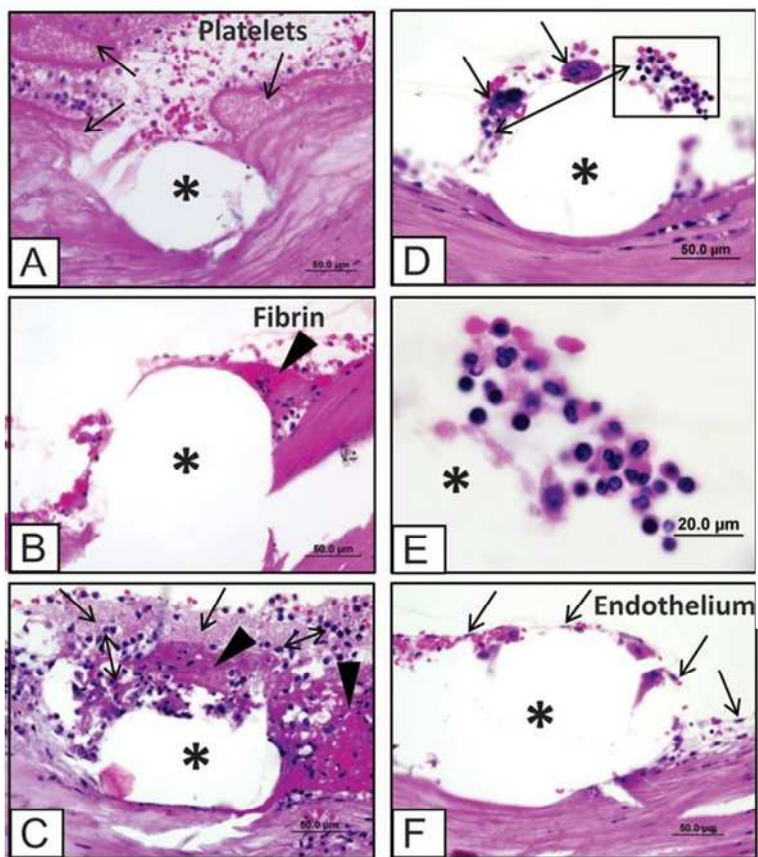
### 1.5.2.2. La resposta inflamatòria en la formació de neoíntima

Com hem comentat en l'apartat 1.4.2.2., l'aterosclerosi és una malaltia amb un fort component inflamatori. La infiltració de cèl·lules inflamatòries a la paret arterial és un component clau en el desenvolupament de placa ateroscleròtica nativa i en la restenosi [65]. Com mostra la Figura 8, s'ha observat la presència de cèl·lules inflamatòries a la paret vascular ja a les primeres hores després d'una angioplàstia i la seva persistència a mig termini. A més, s'ha demostrat que existeix una correlació entre el grau d'infiltració de cèl·lules inflamatòries i el desenvolupament de neoíntima en fases més tardanes [66], [67]. En models experimentals, la inhibició o deficiència de molècules implicades en el procés d'adhesió i internalització dels leucòcits, com P-selectina, l'antigen de



macròfags 1 (Mac-1), o VCAM-1, resulta en una reducció de la formació de neointíma [68]–[71].

**Trombe/ inflamació aguda**



**Figura 8. Restenosi d'artèries coronàries humanes.** A) Trombe ric en plaquetes (fletxes) al voltant d'una malla de *stent* (\*) 1 dia després de la col·locació del *stent*. B) Trombe ric en fibrina (punta de fletxa) al voltant d'un *stent* puntual 1 dia després de la col·locació del *stent*. C-F) Trombe ric en plaquetes (fletxes), fibrina (punes de fletxa) amb nombrosos infiltrats inflamatoris al voltant del *stent* (fletxes dobles) amb endotelització focal (F) cinc dies després de la col·locació del *stent*. E) Es destaca la presència de cèl·lules inflamatòries que consten de neutròfils i limfòcits (àrea ressaltada al panell D). Imatge obtinguda de Chaabane *et al.* (2013) [54].

En aquest procés també hi tenen una paper fonamental les quimiocines. Les quimiocines són proteïnes de baix pes molecular responsables dels processos d'internalització i activació de leucòcits. Aquestes, a part de ser responsables de

la quimiotracció dels leucocits, participen en la seva diferenciació, proliferació i control de la supervivència. La MCP-1 es considera la quimiocina més important en el procés d'adhesió i migració dels monòcits dins la paret vascular durant el desenvolupament de la lesió ateroscleròtica i la restenosi. Aquesta és secretada per les CE, CMLV, fibroblasts i monòcits-macròfags, i s'expressa de forma molt marcada en les lesions ateroscleròtiques, així com en la paret vascular, tan sols dues hores després d'una lesió arterial degut a la resposta cel·lular inicial als factors de creixement, com PDGF [72].

Un dels primers estudis que va relacionar una citocina amb l'aterosclerosi *in vivo* és el desenvolupat per Liao et al. que es va publicar fa 20 anys, en el qual es va observar un augment de MCP-1 al injectar LDL mínimament modificades (mmLDL) en ratolins [73]. L'expressió de MCP-1 i el seu receptor CCR2 va ser detectada en lesions ateroscleròtiques en un model de ratolí deficient en apolipoproteïna E (Apo E<sup>-/-</sup>) [74], i la seva implicació directa en el desenvolupament d'aquesta malaltia es va demostrar en diverses ocasions, tant en ratolins deficientes en CCR2 [75], [76], com en MCP-1 [77], [78], on es va observar una disminució del reclutament de monòcits/macròfags. La inhibició de MCP-1 en diversos models experimentals d'angioplàstia redueix l'acumulació de macròfags i el desenvolupament d'hiperplàsia intimal [79]–[81]. A més, en humans, els nivells de MCP-1 circulants són predictors de restenosi [82]. Aquestes dades remarquen la rellevància del component inflamatori i més específicament, del paper de MCP-1, en el desenvolupament de la neoïntima.

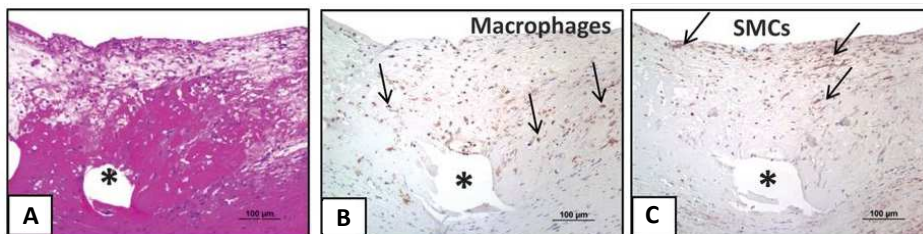
### 1.5.3. Migració i proliferació cel·lular

Els macròfags són responsables de la fagocitosis de les restes cel·lulars i, juntament amb les plaquetes i les CE, secreten factors de creixement, com el FGF, el factor de creixement tipus insulina-1 (IGF-1), el PDGF, el factor de creixement endotelial vascular (VEGF), quimiocines i citocines que retroalimenten la resposta inflamatòria i controlen els mecanismes de migració i proliferació de les CMLV.

Com s'ha comentat a l'apartat 1.4.1.2., les CMLV de la paret vascular presenten un fenotip caracteritzat per una capacitat migratòria i proliferativa molt limitada. Quan s'activen, per una lesió de la paret vascular, passen a tenir un fenotip sintètic, en el que adquireixen més reticle endoplasmàtic rugós per a la síntesi de proteïnes de MEC i una inducció de la proliferació i migració cel·lular.

Aquesta modulació fenotípica es correlaciona amb una alteració en l'expressió de gens del citoesquelet [83] així com una activació de gens del cicle cel·lular [84]. Així doncs, l'alliberament de factors de creixement i citocines a les primeres etapes de la lesió restenòtica provoca que les CMLV i els macròfags migrin cap a les àrees lesionades i reemplacin el coàgul de fibrina (Fig. 9).

**Migració i proliferació cel·lular**



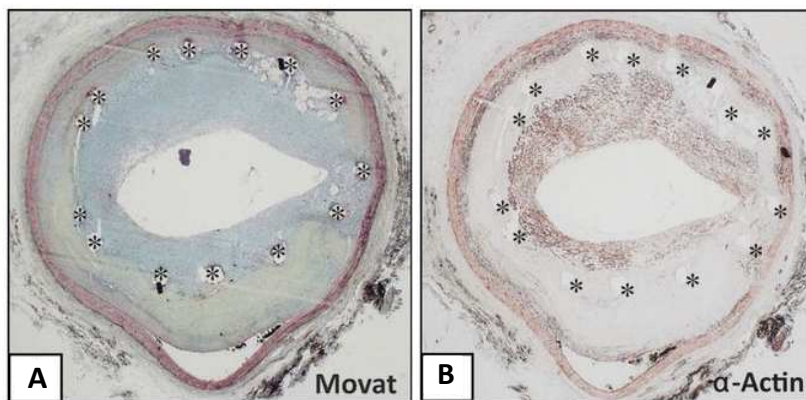
**Figura 9. Restenosi d'artèries coronàries humanes.** Neoíntima primerenca 23 dies després de la col·locació del stent (\*). A) Cèl·lules de l'íntima dins de la matriu extracel·lular vist per sobre de la malla del stent. B) Immunotinció de macròfags (KP-1) (fletxes) a la base de la neoíntima. C) Tinció d'actina específica per a la identificació de les CML properes a la superfície luminal de la neoíntima (fletxes). Imatge obtinguda de Chaabane *et al.* (2013) [54].

**1.5.4. Remodelat vascular**

Tal com passa amb les lesions aterocleròtiques avançades, en les lesions restenòtiques humanes la major part de l'àrea ocupada per la hiperplàsia intimal correspon a MEC, i les cèl·lules en són el component minoritari [85]. En la restenosi, així com en l'aterosclerosi, és fonamental que existeixi un equilibri metabòlic entre la síntesi i la degradació dels diferents components de la MEC. D'aquest fràgil equilibri en depèn el remodelat vascular, un factor determinant que condiciona el flux coronari i a la perfusió tissular. El procés que anomenem "remodelat" consisteix bàsicament en un canvi del diàmetre de la llum vascular i del gruix de la paret com a conseqüència de canvis estructurals, de tipus adaptatiu, per tal de mantenir la llum vascular en resposta als canvis del flux sanguini. Així, a mesura que l'àrea de la lesió intimal augmenta, la paret vascular es dilata per adaptar-se a la demanda de flux sanguini. Entre els mecanismes causants del remodelat, cal destacar la importància dels canvis en la composició de la MEC i la disminució de la població cel·lular de la mèdia degut a un augment de l'apoptosi de les CMLV (Fig. 10). L'endoteli, que té com una de les seves funcions principals la regulació del flux sanguini, i l'adventícia, juguen

també un paper clau en la regulació del remodelat arterial [86]. En resposta al dany vascular, els fibroblasts es diferencien a miofibroblasts amb una elevada taxa de proliferació [87], [88]. Els miofibroblasts també sintetitzen col·lagen i poden migrar i contribuir a la formació de neointima [89]. A la vista del fet que la MEC és un component activament involucrat en el procés de desenvolupament de la neointima, cal considerar que la modulació de la composició de la MEC podria ésser una estratègia terapèutica a valorar pel tractament i control de la restenosi.

### CMLV i síntesi de MEC

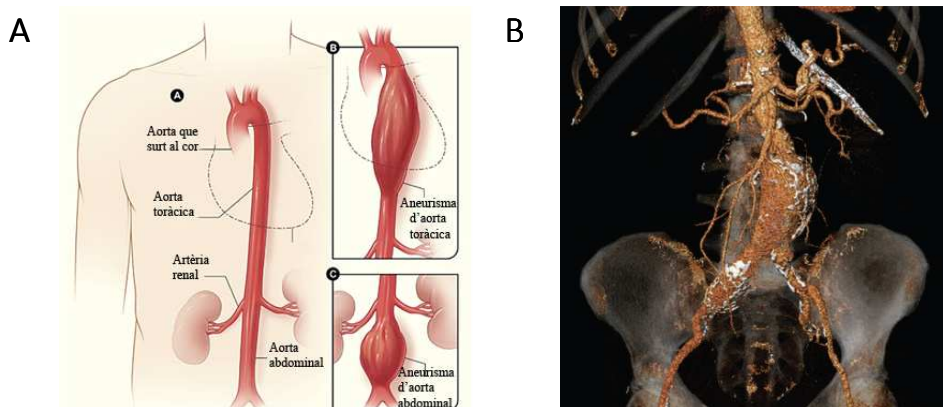


**Figura 10. Restenosi d'artèries coronàries humanes.** Neointima rica en CMLV en l'artèria coronària amb *stent* (6 mesos post-intervenció). A) Tinció de Movat pentacromo. B) Immunotinció específica per a la  $\alpha$ -actina. Imatge obtinguda de Chaabane *et al.* (2013) [54].

## 2. L'ANEURISMA D'AORTA ABDOMINAL

### 2.1. Epidemiologia i factors de risc

L'aneurisma és una patologia degenerativa vascular que es caracteritza per una dilatació progressiva, permanent i localitzada dels vasos sanguinis deguda a un afebliment de la paret vascular i que en cas de ruptura sol ser mortal. Ocorre principalment en artèries, especialment en l'aorta abdominal infrarenal, donant lloc a l'aneurisma d'aorta abdominal (AAA) (Fig. 11). Aquesta patologia té una prevalença de fins al 8% en homes de més de 65 anys, i s'estima que és la desena causa de mort més comú, essent responsable d'un  $\approx 2\%$  de totes les morts. Els principals factors de risc de l'AAA són el tabaquisme i l'edat. De fet, en les societats occidentals, la incidència d'AAA es troba augmentada degut a l'envelliment de la població [90], [91]. La patologia aneurismàtica també pot provocar altres complicacions secundàries, tot i que menys habituals, com per exemple l'embolització distal, les fístules aortoentèriques o aortocaves i la compressió de venes ilíaqües, la qual resulta en trombosi venosa profunda.



**Figura 11. Aneurisma d'aorta abdominal.** A) Esquema representatiu dels aneurismes de l'aorta. B) Reconstrucció tridimensional d'un angiograma CT mostrant un gran aneurisma d'aorta abdominal al qual s'hi troba associat un altre aneurisma a l'artèria ilíaca dreta. Aquest angiograma correspon a un home de 76 anys asimptomàtic, previ a una intervenció de reparació endovascular. Imatge obtinguda de Nordon *et al.* (2011) [92].

En l'AAA, la paret arterial s'afebleix i l'aorta es dilata progressivament fins al punt que, si no s'intervé, pot arribar a trencar-se [93]. Normalment es considera que hi ha AAA quan el diàmetre aòrtic màxim és de  $\geq 3$  cm (la qual cosa suposa un 50% més del diàmetre normal) [94], tot i que existeixen diversos criteris per definir l'AAA [95], [96]. Avui en dia el diàmetre de l'artèria és l'únic marcador de progressió de la malaltia i del risc de ruptura. Quan el diàmetre és superior a 5,5 cm s'aconsella la intervenció quirúrgica, l'única teràpia disponible per a aquesta patologia, molt costosa per a la sanitat pública i amb un elevat índex de morbiditat i mortalitat [97]. A més a més, no es disposa d'eines farmacològiques que limitin la progressió o promoguin la regressió dels AAA ja establerts [98]. Per tant, és fonamental la indentificació de nous marcadors d'evolució i de noves dianes farmacològiques per a aquesta patologia.

Tal i com hem indicat, existeixen diversos factors de risc que afecten alguna de les etapes de l'AAA (desenvolupament, expansió i ruptura), però l'únic factor de risc que s'associa amb totes tres etapes de manera irrefutable és el tabaquisme [90], [99] probablement degut, entre altres coses, a la capacitat que té per inhibir la  $\alpha$ -1-antitripsina (AAT), un inhibidor de l'elastasa [100]. El manteniment de l'hàbit incrementa l'expansió i risc de ruptura de l'AAA i n'empitjora la prognosi. Hi ha evidències que el risc disminueix en deixar de fumar [101].

El principal component de la capa mèdia de les artèries és l'elastina. Normalment, més del 99% de l'elastina total de les artèries es troba en una forma reticulada insoluble que pot ser estirada fins a un 70% de la seva longitud inicial. L'elastina és responsable del suport de càrrega, tan en la direcció transversal com la longitudinal, en tot el gruix de la paret arterial, absorbint així les ones de flux sanguini i mantenint l'estructura arterial. Les CMLV deixen de sintetitzar elastina quan s'arriba a l'edat adulta i a partir d'aquest moment, les molècules d'elastina tenen una vida mitjana que oscil·la entre els 40 i els 70 anys. Això, podria explicar, la predisposició de persones d'edat avançada a la formació d'AAA. Per aquest mateix motiu, s'ha proposat que la predisposició a desenvolupar AAA podria, a més, tenir un origen embrionari [92], de manera que anomalies en l'elastogènesi fetal podrien tenir efectes a llarg termini.

Tradicionalment, s'ha considerat l'aterosclerosi com un dels factors que sotsjauen a la dilatació de l'aorta [102], [103]. La presència de lesions ateroscleròtiques en el teixit aneurismàtic és freqüent, i ambdues patologies comparteixen alguns dels seus factors de risc [90], [104]. Tot i això, la possible implicació de l'aterosclerosi en el AAA és encara avui tema de debat. De fet, no s'ha trobat cap associació entre els nivells lipídics plasmàtics i l'AAA, si bé s'ha observat un efecte protector de nivells elevats d'HDL (lipoproteïnes d'alta densitat), aquest pot interpretar-se simplement com a símptoma d'un bon estat de salut CDV [105].

Pel que fa a la hipertensió, s'ha establert com a factor de risc de ruptura d'AAA, no obstant això, només s'ha pogut associar clarament amb el risc de desenvolupar AAA en dones [105]–[108].

Altres factors de risc inclouen l'obesitat, que s'associa independentment amb l'AAA, i l'alcoholisme [109], [110]. No s'ha establert el mecanisme pel qual el consum d'alcohol augmenta el risc de patir AAA, però hi ha indicis que sigui mitjançant la inducció de metal·loproteases i de la degradació focal d'elastina [92]. Pel que fa a la diabetis, cal destacar que tot i ser un factor de risc per a l'aterosclerosi, resulta protectora contra el desenvolupament i expansió de l'AAA [96], [111]. Es desconeix per quins mecanismes la diabetis pot exercir aquest paper, tot i que s'ha proposat que la hiperinsulinèmia, la hiperglicèmia o fins i tot els agents terapèutics usats en aquesta patologia podrien estar-hi involucrats. Aquests fàrmacs tenen la capacitat d'estabilitzar el trombe mural, augmentar la duresa de la paret aòrtica, i disminuir la inflamació sistèmica [112]–[114].

Diversos estudis familiars i de bessons han evidenciat la importància de la predisposició genètica a patir AAA [115], [116]. La probabilitat que el bessó monozigòtic d'una persona amb AAA desenvolupi un aneurisma és del 24% [117]. Sembla que la importància del rerefons genètic rau principalment en l'acumulació de gens susceptibles (principalment aquells que regulen mediadors inflamatoris, proteases o la biologia de les CMLV), més que no pas en el fet de tenir una única mutació puntual. Per altra banda, diferents malalties congènites que afecten el teixit connectiu s'han associat amb la presència d'AAA i toràcics. La majoria d'elles presenten una degeneració de la mèdia que causa desestructuració de les fibres elàstiques. La Síndrome de Marfan és una

malaltia autosòmica dominant causada per l'alteració del gen de la Fibrilina I, la qual s'encarrega d'orientar conformacionalment les fibres d'elastina en l'elastogènesi [118]. La majoria d'aquests pacients presenten aneurismes a l'aorta ascendent i una incidència d'un 11% de disseccions aòrtiques. La Síndrome de Ehler-Danlos és un conjunt d'alteracions genètiques que provoquen un defecte en la síntesi del col·lagen III (mutació al gen del COL3A1) provocant que la paret de les artèries sigui molt prima i distensible augmentant el risc que es formin aneurismes o dissecció arterial [119], [120].

S'ha suggerit que la infecció de la paret vascular per Clamídia o Herpes Virus pot determinar la formació de l'AAA. Diferents agents infecciosos tenen un paper en l'elastòlisi, degut a la generació d'una resposta autoimmunitària a la paret vascular. De fet, s'han localitzat dipòsits de limfòcits B i immunoglobulines IgG a la paret vascular de l'AAA. Lindholt et al. van descriure l'associació entre la presència d'anticossos sèrics contra C. Pneumonia i l'expansió de l'AAA [121].

Una forma etiològica de difícil classificació, dóna lloc als AAA inflamatoris descrits per primer cop per Walker l'any 1972 [122]. Es considera que representen un 4-5% dels AAA i són d'etiologia desconeguda [123], [124], però amb característiques clínic-diagnòstiques i enfocament terapèutic diferent dels ateroescleròtics [125]. Es tracta d'aneurismes caracteritzats per un engruïment difús de la paret arterial amb una fibrosi extensa que engloba els teixits adjacents.

Finalment, cal destacar que hi ha cada cop més indicis que fan pensar en els AAA com una mostra local d'una malaltia vascular sistèmica [126]. De fet, els pacients amb patologia aneurismàtica poden presentar anomalies en altres punts de la vasculatura [127].

Tot i que la tendència a la dilatació arterial sigui sistèmica, aquest fenomen és més evident a l'aorta [128]. Per la seva situació, l'aorta abdominal està exposada a forces hemodinàmiques úniques. Té a prop la primera gran ramificació de l'aorta (l'artèria celíaca), i comprèn el recorregut des de les artèries renals fins a bifurcar-se en les ilíaqües. L'ona de pressió sanguínia augmenta a mesura que es propaga des de la creua aòrtica fins a la bifurcació, com a conseqüència de la disminució del diàmetre de l'aorta [129]. Si en aquest punt ja és normal una lleugera escassetat d'elastina i col·lagen [130], la



disminució d'aquests components de MEC associada a l'edat fa que l'aorta abdominal sigui especialment vulnerable a l'estrès mecànic repetitiu [131].

### 2.2. Formació de l'AAA

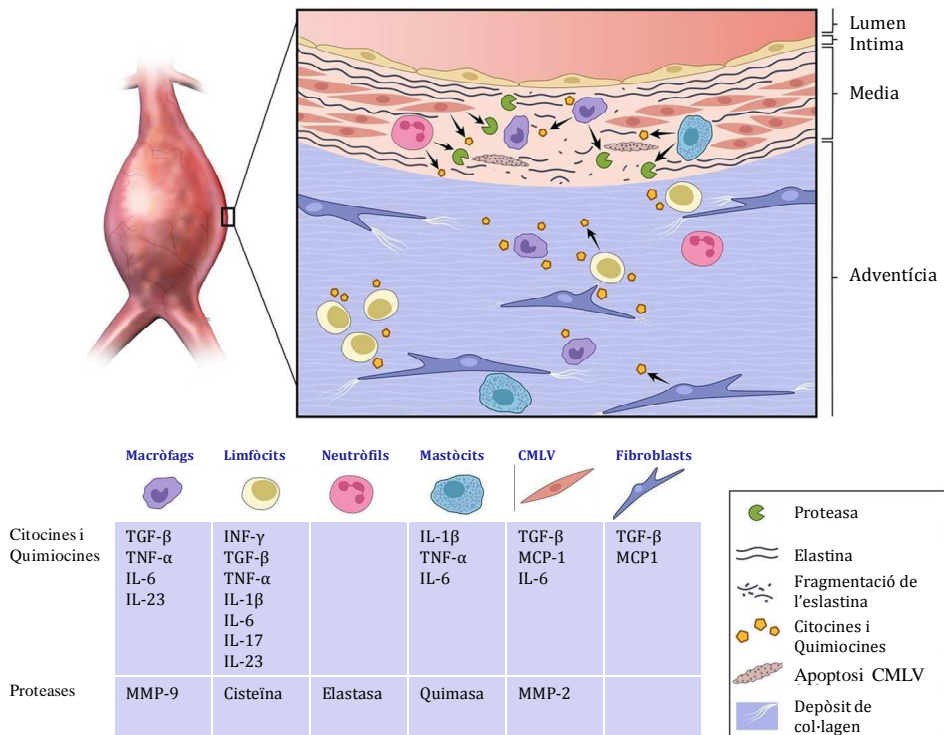
La formació de l'AAA és un procés fisiopatològic complicat i dinàmic, que culmina en un remodelat irreversible del teixit connectiu [132]. El desenvolupament de l'aneurisma involucra respostes inflamatòries locals que condueixen a la infiltració de macròfags, neutròfils, mastòcits i limfòcits. Aquesta resposta inflamatòria es veu retroalimentada per diverses citocines i proteases extracel·lulars que, en combinació, condueixen a l'apoptosi de les CMLV i la degradació de la matriu extracel·lular. Així doncs, els principals processos que donen lloc al fenotip de l'AAA són tres: proteòlisi, inflamació i apoptosi de CMLV, els quals comporten que la paret arterial pateixi una pèrdua de l'elasticitat i resiliència, impeding la recuperació del diàmetre arterial normal després de cada pulsació.

L'AAA s'inicia amb un procés de degradació de teixit connectiu, principalment de fibres d'elastina, per part de MMP i probablement també d'altres enzims, com la plasmina, les serina elastases i la catepsina [133]–[136]. D'aquesta manera, la mèdia perd la seva estructura laminar i les seves propietats elàstiques, provocant la dilatació arterial.

La paret arterial pateix, a més a més, una infiltració inflamatòria excessiva, consistent en limfòcits T i B i macròfags. Tot i que es desconeix per quin motiu s'inicia el procés inflamatori, és probable que els pèptids solubles derivats de la degradació de components de la MEC, incloent-hi l'elastina, la laminina i la fibronectina, actuïn com a agents quimiotàctics promovent la infiltració de macròfags [137]. Tampoc no està ben establert com es recluten els leucòcits, però probablement aquest procés estigui dirigit pels elevats nivells de IL-8, MCP-1 i RANTES que trobem en l'AAA [138], [139].

Tanmateix, els teixits aneurismàtics produeixen una gran quantitat de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6. Tal com mostra la Figura 12, l'alliberament de la cascada de citocines resulta en l'expressió de molècules d'adhesió cel·lular i l'expressió i l'activació de MMP i d'inhibidors tissulars de MMP (TIMP) així com l'alliberament d'espècies reactives d'oxigen que causen la degradació de la MEC [138], [140]–[143]. De fet, el TNF $\alpha$  i l'INF $\gamma$  semblen ser les

citocines més destacades amb un augment d'expressió més pronunciat en pacients amb AAA de grans dimensions [144].



**Figura 12. Fisiopatologia de l'AAA.** La dilatació progressiva de la paret aòrtica està associada al reclutament de leucòcits, l'activació de macròfags i la producció de citocines proinflamatòries [imatge obtinguda de Davis *et al.* (2014) [145].

L'afebliment de la paret arterial empitjora amb una important reducció del contingut de CMLV, les quals moren per apoptosi [146], [147]. Hi ha consens en que l'aorta es dilata a causa de la pèrdua de l'elastina però la paret arterial s'engrosseix com a resultat d'un procés de reparació. Així doncs, com efecte compensatori, hi ha una gran deposició de col·lagen [148], el contingut del qual augmenta amb la mida de l'AAA [149], [150]. Hi trobem principalment col·lagen dels tipus I i III, essent aquest darrer el principal responsable de les característiques tensors d'aquesta nova matriu [151], [152]. Tanmateix, aquest col·lagen no és sintetitzat correctament i és immadur resultant en una artèria més distensible.

La desestructuració de la capa mèdia fa que l'adventícia hagi de suportar unes forces centrífugues inusuals, a les quals respon generant respostes immunes inflammatòries, fibròtiques i angiogèniques [153], [154], complicant encara més el desenvolupament de l'aneurisma. S'ha observat una forta correlació espacial entre els neocapilars, la degradació de fibres elàstiques i la mida de l'infiltrat de leucòcits a la cara externa de la paret arterial dels AAA [155], zones amb un elevat risc de ruptura.

Tots aquests canvis provoquen l'augment gradual del diàmetre aòrtic i de l'estrès hemodinàmic, així com la transferència de la força tensora de la paret arterial a les fibres de col·lagen [156]–[160]. L'AAA es pot expandir, disseccionar i fins i tot trencar quan la tensió hemodinàmica que actua sobre la paret vascular és superior a la força de la paret. Turbulències en el flux sanguini contribueixen al creixement de l'AAA causant lesions a l'endoteli i accelerant la degeneració de la paret arterial. La majoria d'aneurismes són asimptomàtics fins al moment de la ruptura. Estudis experimentals amb models murins d'AAA, mostren que el tractament de l'artèria amb elastasa condueix a la dilatació arterial mentre que el tractament amb col·lagenasa condueix a la ruptura arterial sense dilatació [161]. Així, Cohen suggereix que la degradació d'elastina és un pas clau en el desenvolupament d'aneurismes però que en última instància es requereix la degradació de col·lagen per a la ruptura de l'AAA. Així, doncs, és molt probable que la ruptura vagi precedida de la degradació proteolítica de les fibres de col·lagen [131]. De fet, la zona de ruptura es caracteritza per tenir una elevada expressió de proteases, així com un elevat nombre de leucòcits i neovascularització focal [162], [163]. El risc d'arribar a aquest punt augmenta paral·lelament amb el diàmetre aòrtic [164] encara que, s'ha descrit que la simulació d'estrès de la paret basada en models específics mitjançant dades d'ultrasonografia per cada pacient sembla donar una avaluació del risc de ruptura més precís que el diàmetre de l'AAA per sí sol, tanmateix, aquesta aproximació encara no s'utilitza en la clínica [165].

En els darrers anys s'està prestant molta atenció al trombe intraluminal (ILT), que trobem en el 75% dels AAA [166]. L'ILT és un neoteixit biològicament actiu format per múltiples capes de fibrina coagulada. La cara luminal de l'ILT està formada per una capa hemàtica fresca amb fibres de fibrina, mentre que a la cara abluminal hi trobem fibrinòlisi activa. El gruix d'aquest trombe fa disminuir la biodisponibilitat d'oxigen a la paret arterial [167], fet que podria estar

incrementant la bioreactivitat dels macròfags i la seva producció d'elastasa [168]. La presència d'ILT s'ha associat a parets arterials més primes, major elastòlisi, menor densitat de CMLV a la mèdia, i un nivell més elevat de resposta immune inflamatòria a l'adventícia [167], [169].

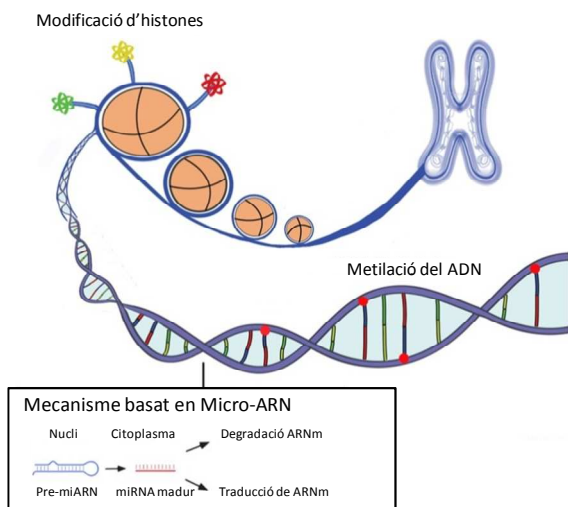
Avui dia, l'única estratègia que s'aplica per reduir el risc de ruptura és la intervenció quirúrgica. Degut a l'absència d'eines farmacològiques per tractar l'AAA, la millora del nostre coneixement sobre els mecanismes implicats en la formació i la progressió dels AAA és fonamental per tal de desenvolupar estratègies que previnguin o frenin l'expansió d'aquesta patologia.

### 3. MECANISMES DE REGULACIÓ EPIGENÈTICA EN LES MALALTIES CARDIOVASCULARS.

Com en la majoria de les malalties complexes, en les malalties CDV es produeixen interaccions entre factors genètics i ambientals, en els que intervenen mecanismes epigenètics. Les interaccions dinàmiques del medi ambient i l'epigenoma determinen l'accessibilitat dels factors de transcripció als gens modificant la seva transcripció i funció amb importants repercussions en el repertori de gens expressats a nivell cel·lular [170]. S'han observat patrons alterats de modificació epigenètica en les patologies CDV, fet que suggereix la seva implicació en la regulació de processos associats a l'aterosclerosi, la restenosi o l'AAA. Aquestes alteracions es poden corregir farmacològicament ja que els mecanismes de regulació epigenètics no alteren la composició de nucleòtids i els canvis en l'estructura de la cromatina són reversibles.

#### 3.1. Mecanismes epigenètics

Entre els factors que regulen el remodelat de la cromatina destaquen els mecanismes de regulació basats en l'ARN d'interferència, la metilació de l'ADN i una varietat de modificacions post-traduccionals de les histones [171] (Fig. 13).



**Figura 13.** Principals mecanismes de regulació epigenètica: Metilació del DNA, Modificació d'histones (acetilació, metilació, fosforilació, etc.) i micro-ARN.

### 3.1.1. Silenciament de gens associat a l'ARN d'interferència

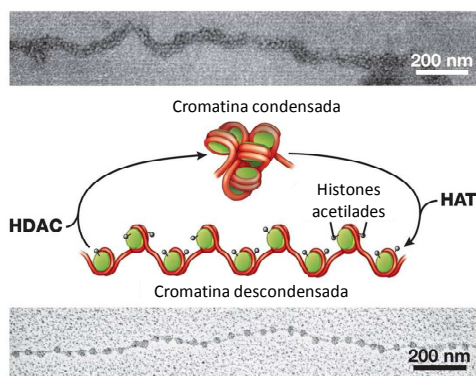
Els micro ARNs, també anomenats miARNs, són molècules d'ARN no codificants d'uns 19-22 nucleòtids de longitud que funcionen com a reguladors epigenètics endògens de l'expressió de gens. Els miARNs es transcriuen com miARNs primaris o pre-miARNs mitjançant l'ARN polimerasa II i III i, posteriorment, són processats per les ribonucleases Drosha i Dicer donant lloc a les seves formes madures. Aquests miARNs madurs s'incorporen al complex de silenciament induït per ARN (RISC) mitjançant el qual s'uneixen a la regió complementària 3'-UTR de l'ARNm induint així la seva degradació o inhibint la seva traducció [172]. Els miARN van ser descrits, per primera vegada, l'any 1993 en el nemàtode *C. Elegans* [173] i es troben altament conservats entre espècies, fet que posa en evidència la importància evolutiva d'aquests moduladors de l'expressió gènica. S'han identificat més de 2500 miRNAs en el genoma humà (<http://www.mirbase.org>) i s'ha predit que més d'un 60% dels gens humans poden estar regulats per miRNAs [174].

### 3.1.2. Metilació de l'ADN

La metilació de l'ADN es duu a terme en dinucleòtids específics que es troben al llarg del genoma on els grups metil s'uneixen a les bases de citosina seguides per una guanina (CpG). Aquesta modificació és catalitzada per metiltransferases (ADN-metiltransferases o DNMT). De fet, un 40-60% dels gens humans contenen en els seus promotors regions riques en dinucleòtids CpG (més generalment conegudes com "illes CpG") [175] i un 70% de tots els dinucleòtids CpG del genoma es troben metilats [171]. Els dinucleòtids CpG actuen com a llocs de reclutament dels complexos de remodelat de la cromatina que, al seu torn, provoquen la condensació de la cromatina i la inactivació de gens [176], [177]. A part, la metilació de l'ADN participa en el manteniment de l'estabilitat cromosòmica [178]. S'han observat canvis en els patrons de metilació associats a les malalties cardiovasculars, la inflamació, malalties autoimmunes, infeccions i el càncer [179]–[181].

### 3.1.3. Modificació d'histones

L'ADN eucariòtic s'estructura al voltant d'un octàmer d'histones (1 tetràmer H3-H4 i 2 dímers H2A-H2B) construint així la unitat fonamental de la cromatina, el nucleosoma. La conformació de la cromatina canvia ràpidament en resposta a estímuls externs degut que les histones estan sotmeses a una varietat de modificacions post-traduccional en els seus residus de les cues N-terminals que sobresurten de la fibra de cromatina. Una de les modificacions més importants és l'acetilació d'histones [182]. L'acetilació d'histones neutralitza la càrrega positiva dels residus de lisina trencant l'atracció electrostàtica entre les histones i el grup fosfat de l'ADN que està carregat negativament provocant la relaxació de la cromatina condensada, permetent així, l'accés de factors de transcripció i la consegüent activació gènica [183]. El nivell d'acetilació de les histones és el resultat de l'equilibri entre l'activitat de les histones acetil transferases (HATs) i les histones desacetilases (HDACs). En general, les HAT promouen l'expressió gènica mentre que les HDAC la reprimeixen (Fig. 14).





















**Figura 14. Estructura i remodelació de la cromatina per histones acetiltransferases (HAT) i histones desacetilases (HDAC).** L'acetilació de les cues N-terminals de les histones condueix a la descondensació de la cromatina permeten l'accés de la maquinària transcripcional.

### 3.2. Histones desacetilases

La família de HDAC de mamífers està composta per 18 membres classificats en quatre classes segons l'homologia de la seva seqüència amb els seus ortòlegs en llevats (Taula 1). Les HDAC de classe I (42-45 kDa) són homòlogues a les proteïnes Rpd3 de llevat i inclouen la HDAC1, HDAC2, HDAC3, i HDAC8. Totes elles es troben exclusivament localitzades al nucli, excepte la HDAC 3 que també es troba al citoplasma, i presenten un patró d'expressió ubíqua. Les HDAC de classe II (120-130 kDa) són homòlogues a les proteïnes HDA1 de llevat

i inclouen la HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 i HDAC10 totes elles presents tant al nucli com al citoplasma i presenten un patró d'expressió específica depenent del teixit. L'última en caracteritzar-se va ser la HDAC11 que tot i ser molt similar a les de classe I, no presenta una homologia de seqüència suficient i s'ha catalogat com un grup a part, HDAC de classe IV. Les HDAC de classe I, II i IV es coneixen com "HDAC clàssiques" mentre que les HDAC de classe III són conegudes com les Sirtuïnes i estan formades per 7 membres (SIRT1-7) totes elles homòlogues al gen Sir2 de llevat [184]. Les HDAC clàssiques depenen de l'ió  $Zn^{++}$  com a cofactor, mentre que les Sirtuïnes necessiten  $NAD^+$  per al seu funcionament [185].

Taula 1. Classificació de les famílies d'HDAC.

Classe	Isoforma	Ortòleg llevat	Mida	Cofactor	Local.	Expressió	Domini catalític
(I)	HDAC1	RPD3	58	$Zn^{++}$	N	Ubicua	 482 aa
	HDAC2		59		N		 488 aa
	HDAC3		50		N, C		 428 aa
	HDAC8		44		N		 377 aa
(IIa)	HDAC4	HDA1	120	$Zn^{++}$	N, C	Específica	 1084 aa
	HDAC5		130		N, C		 1122 aa
	HDAC7		110		N, C		 952 aa
(IIb)	HDAC9	HDA2	160	$Zn^{++}$	N, C	Específica	 1011 aa
	HDAC6		160		N, C		 1215 aa
(III)	HDAC10	Sir2	70	$NAD^+$	N, C	Variable	 (inactive) 669 aa
	SIRT1		120		N		 747 aa
	SIRT2		45		C		 389 aa
	SIRT3		28		M		 399 aa
	SIRT4		35		M		 314 aa
	SIRT5		36		M		 310 aa
	SIRT6		39		N		 355 aa
(IV)	SIRT7	48	N	 400 aa			
	HDAC11	RPD3/HDA1	39	$Zn^{++}$	N	Ubicua	 347 aa

En els últims anys, s'ha acumulat una evidència experimental que indica que les HDACs poden actuar sobre altres substrats a part de les histones, com poden ser nombrosos factors de transcripció [186]. Hi ha diversos exemples sobre com les HDAC poden regular les funcions d'altres proteïnes no histones com el factor supressor de tumors p53 [187], alguns membres de la família STAT [188] o del factor nuclear kB (NFkB). En el cas de NFkB, la desacetilació de la subunitat p65 mediada per HDAC3 permet la seva unió a l'ADN i la conseqüent activació transcripcional, mentre que la seva acetilació facilita la unió d'IkB $\alpha$  i la seva exportació fora del nucli, inhibint així les seves funcions transcripcionals [189]. A



més, les HDAC també són capaces de regular l'activitat de proteïnes citoplasmàtiques que no són factors de transcripció. Per exemple, la desacetilació de la  $\alpha$ -tubulina mediada per HDAC6 regula la motilitat cel·lular [190]. D'altra banda, s'ha descrit que la Hsp90 (Heat Shock Protein 90) també és regulada per HDAC6. En una cèl·lula normal, la inhibició de HDAC6 porta a la hiperacetilació de Hsp90, la seva dissociació de la co-chaperona p23 i la conseqüent pèrdua d'activitat chaperona [191].

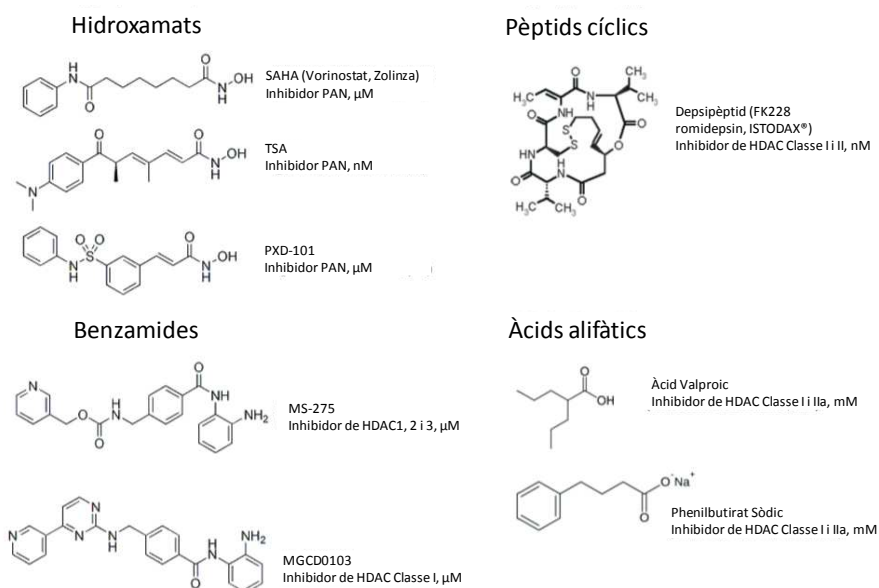
La varietat de substrats de les HDACs juntament a la seva diversitat tant en número, localització subcel·lular i activitat biològica, incrementa l'espectre de respostes biològiques que aquestes proteïnes poden regular, així com el nivell d'especificitat d'aquesta regulació [192].

### 3.3. Inhibidors de les HDAC

En els últims anys, un gran nombre d'inhibidors de les HDAC (iHDAC) s'han sintetitzat o bé s'han purificat a partir de productes naturals. Tots ells inhibeixen l'activitat HDAC tot i que amb diferent eficiència i selectivitat. Aquests es classifiquen en 5 classes en base a la seva estructura química (Fig. 15):

- 1) Hidroxamats (Tricostatina A)
- 2) Benzamides (MS-275)
- 3) Tetrapèptids cíclics (Aepsipèptid)
- 4) Àcids alifàtics
- 5) Altres sense una classificació química comuna

Més recentment, ha sorgit una nomenclatura que agrupa els iHDAC en 4 classes segons el seu espectre d'acció. Segons aquest criteri, els iHDAC es classifiquen en inhibidors d'ampli espectre o "pan-inhibitors" que inhibeixen els membres de les 4 classes de HDAC, com la tricostatina-A (TSA) o el Vorinostat (SAHA), inhibidors de classe I i II o inhibidors específics de classe.



**Figura 15. Classificació dels iHDACs segons l'estructura química i l'espectre d'acció.**

A nivell fisiopatològic, l'alteració de l'activitat HDAC s'ha associat a una gran varietat de processos com el càncer, les malalties neurodegeneratives i els processos inflamatoris, proliferatius i de remodelat. S'ha avançat molt en el desenvolupament d'iHDACs, fonamentalment dirigits al bloqueig de HDACs de classe I i II, compostos que presenten activitats antiinflamatòries i anticancerígenes entre d'altres. Concretament, l'any 2006 la FDA va aprovar el Vorinostat (Zolinza), un inhibidor de HDACs de classe I i II per al tractament del limfoma cutani de cèl·lules T [193]. Així mateix, altres compostos amb activitat inhibidora de les HDACs com el butirat i l'àcid valproic s'utilitzen ja a la clínica i s'han iniciat també diferents assajos clínics en què s'analitza l'activitat antiinflamatòria o anticancerígena de diferents HDACi, entre ells el MS-275 (o entinostat) actualment en estudis en fase II [194]. L'objectiu és aconseguir dissenyar i sintetitzar iHDAC cada vegada més específics, capaços d'actuar sobre un únic tipus d'HDAC, fet que no és fàcil ja que la gran majoria dels iHDAC interaccionen amb el domini catalític de les HDAC el qual es troba altament conservat [195]. La major part dels iHDAC descrits fins al moment només afecten a les HDAC de classe I i II, les quals tenen el ió  $\text{Zn}^{2+}$  com a cofactor. Per tant, també és important dissenyar iHDAC que no afectin a les funcions biològiques de moltes altres proteïnes dependents del  $\text{Zn}^{2+}$ .

### 3.4. Regulació gènica per HDACs en malalties cardiovasculars

Les malalties cardiovasculars com l'AAA o l'aterosclerosi són malalties complexes degut la gran quantitat de gens involucrats en el seu desenvolupament. S'ha estudiat molt el paper de les HDACs i els seus inhibidors en el càncer i malalties neurològiques però es desconeix en gran mesura quin paper poden jugar les HDAC en la progressió de les malalties cardiovasculars. L'estudi recent d'aquests mecanismes ha posat de manifest un nombre significatiu de modificacions que afecten el desenvolupament i la progressió de les malalties cardiovasculars. S'ha descrit que les HDACs poden regular diferents processos del desenvolupament de l'aterosclerosi, la restenosi, la hipertròfia cardíaca o l'infart de miocardi [196] i que tenen un paper regulador del remodelat vascular. A més, l'epigenòmica juga un paper important en els factors de risc com el tabaquisme [197], [198], la diabetis, la hipertensió [199] o l'edat [200]. Les HDACs participen en el control de l'homeòstasi de les cèl·lules vasculars regulant l'expressió de gens implicats en la proliferació, migració, contractibilitat i apoptòsi de les CE i les CMLV (Taula 2) (Revisat a [201]), així com en la inflamació i la síntesi de MEC.

**Taula 2. Regulació de l'homeostasi de les cèl·lules vasculars per HDACs en estudis experimentals.**

Típus cel·lular	Procès	Estrategia	Impacte	Interacció
CE	Proliferation	Silenciament HDAC7	↓	β-catenina
		SIRT1	↑	LKB1
	Migració	Silenciament HDAC5	↑	FGF2
		Silenciament HDAC7	↓	No especificat
		Silenciament HDAC9	↓	No especificat
		Silenciament HDAC7	↓	PDGF-B/PDGFR-ββ
	Apoptosi	Silenciament HDAC3	↑	Akt
		Àcid valproic	↓	ERK1/2
		SIRT1	↓	Akt1, FoxO3a
CML	Proliferació	TSA	↓	P21 WAF1
		TSA	↑	Trx1
	Migració	TSA	↑	Trx1
		Apoptosi	HDAC1 (indirecte)	↑
	activitat HDAC dependent de NAD <sup>+</sup>		↓	No especificat

En aquest context, els iHDAC inhibeixen la resposta proliferativa associada a l'engruiximent de la neoíntima, fet que suggereix la eficàcia terapèutica d'aquests compostos en les malalties vasculars de component proliferatiu com l'aterosclerosi i la restenosi post-*stent* [202]. En concordança, encara que existeixen resultats contradictoris, aquests fàrmacs redueixen els nivells de colesterol plasmàtic en animals hipercolesterolèmics [203], [204], limiten l'adhesió de monòcits a l'endoteli i inhibeixen la producció de citocines en macròfags [205], [206]; per tant, els iHDAC atenuarien la resposta inflamatòria a nivell vascular. A més, aquests inhibidors presenten activitat antitrombòtica a través d'un mecanisme dual que implicaria el bloqueig de la inducció del factor tisular a nivell vascular i en monòcits, així com l'increment en l'expressió del t-Pa en CE [207], [208].

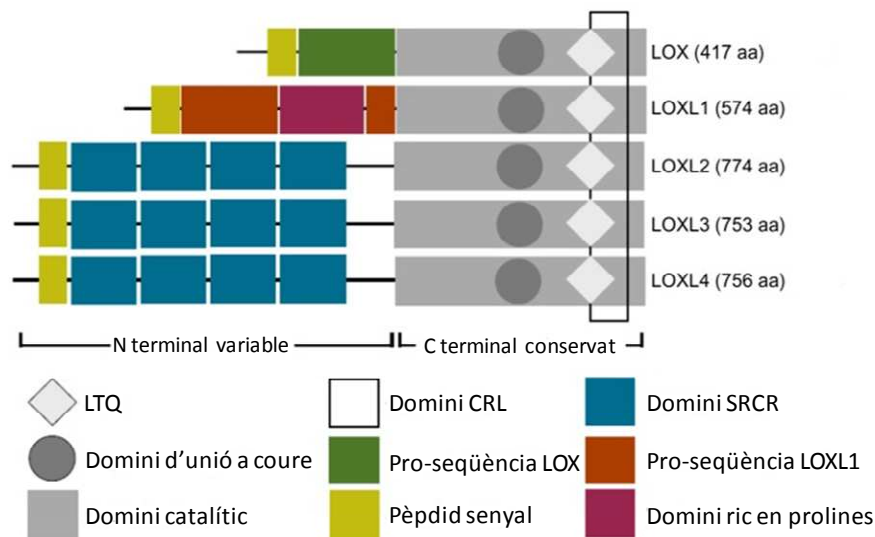
És evident, per tant, que els iHDAC tenen un interès potencial en el tractament de les malalties cardiovasculars en base a les seves propietats antiproliferatives, antitrombòtiques i antiinflamatòries. Tanmateix, es disposa de molt poca informació sobre el paper de l'epigenètica i la possible utilitat dels iHDAC en el tractament de l'AAA i la major part s'ha inferit a partir d'estudis epigenètics en l'aterosclerosi ja que comparteixen bona part dels processos implicats [209]. Un estudi recent ha posat en evidència que l'administració de Metacept (iHDAC de Classe I) en Apo E<sup>-/-</sup> infosos amb angiotensina II redueix l'expressió de la MMP-2 i la MMP-9 a la paret vascular i disminueix significativament la incidència d'AAA [210]. Tanmateix, en aquest estudi no es van analitzar els mecanismes subjacents a l'efecte beneficiós del fàrmac, ni si el benefici és extensible a d'altres iHDAC. Per tant, queden molts aspectes per determinar respecte el paper de l'epigenètica en l'AAA, i la potencial utilitat de compostos com els iHDAC per tal de prevenir i/o revertir la desestructuració de la paret vascular associada a aquesta patologia.

### 4. LA LISIL OXIDASA

#### 4.1. Introducció

La Lisil Oxidasa (LOX) és una amino oxidasa dependent de coure que catalitza la reacció d'oxidació dels grups amino d'algunes proteïnes en residus de lisina i hidroxilisina. Aquesta oxidació comporta la formació de grups semialdehid (peptidil  $\alpha$ -aminoadípico- $\delta$ -semialdehid o alisina), els quals condensen espontàniament amb residus anàlegs de la mateixa o d'altres proteïnes, generant-hi enllaços covalents creuats [211]. Aquest enzim inicia la formació d'enllaços creuats entre col·làgens i elastina a la MEC, augmentant-ne així la força tensora i la integritat estructural, trets essencials per al bon funcionament del teixit connectiu.

La LOX és la proteïna més estudiada de la seva família, que en mamífers consta de quatre isoenzims més: *LOX-like* (LOXL) 1, LOXL2, LOXL3 i LOXL4. Els cinc membres de la família presenten una elevada homologia a l'extrem C-terminal, on s'hi troba el domini catalític i difereixen, en major o menor grau, en el domini N-terminal. El centre actiu responsable de l'activitat catalítica de la LOX es troba en el domini C-terminal, el qual està altament conservat entre els diferents membres de la família i també entre les LOX de diferents espècies. La seva activitat requereix la presència d'un àtom de Cu (II) al centre actiu coordinat amb 4 histidines, així com un grup lisil tirosil quinona (LTQ). A més del domini d'unió al coure i dels residus corresponents al cofactor LTQ, la regió C-terminal de la LOX conté un domini de tipus receptor de citocines (*cytokine receptor like-domain*) i un domini de tipus receptor de factor de creixement (*growth factor receptor-like domain*) [212], [213] (Fig. 16). Tot i que sembla que totes elles presenten activitat lisil oxidasa, aquests enzims mostren patrons d'expressió diferents, de manera que probablement desenvolupin funcions diverses [214], [215].



**Figura 16. Família Lisil Oxidasa.** La família Lisil Oxidasa comparteix un domini catalític conservat a l'extrem C-terminal que conté un domini d'unió a cuore, un cofactor lisil-tirosina-quinona i un domini tipus citoquina. Aquests dominis són necessaris per la seva conformació proteica i l'activitat enzimàtica. La LOXL2 i la 4 formen una subfamília caracteritzada per la presència de dominis *receptors scavenger* rics en cisteïna mitjançant el qual medien l'adhesió cel·lular i les interaccions proteïna-proteïna [imatge obtinguda de Barker *et al.* (2012) [216].

Recentment, s'ha descrit una segona variant transcripcional de la LOX (LOX-v2) (*GenBank accession number* NM\_001178102). L'ARNm de la variant LOX-v2 no conté l'exò 1 de la LOX, però conté una seqüència adicional de 222 pb de la regió intrònica a 5' de l'exò 2. La proteïna resultant conté el domini catalític C-terminal conservat però no conté el propèptid i presenta diferent especificitat de teixit que la LOX degut a un element regulador present a l'exò 1. Així, el gen humà de la LOX codifica per dues variants, LOX i LOX-v2, ambdues presenten activitat amina oxidasa però amb diferent especificitat de teixit [217].

Els substrats més clarament establerts de la LOX són el col·lagen i l'elastina [218]. Aquest enzim es troba fortament associat a aquestes molècules de la MEC, sobre les quals exerceix un paper estabilitzador i insolubilitzant, participant així en la maduració i manteniment de la MEC [218]. En teixits adults humans, trobem LOX en abundància associada a fibres de col·lagen, principalment a la pell i a l'aorta; en teixits embrionaris, la trobem associada tant a col·lagen com a elastina [219]. La modificació de la MEC per la LOX és un factor crític en el desenvolupament i manteniment del teixit connectiu de

diversos sistemes de l'organisme, tals com l'ossi, el respiratori i el CDV, però també en algunes condicions patològiques [212], [220]. De fet, els ratolins deficients per aquest enzim moren perinatalment, presenten aortes tortuoses i fràgils, i una elevada freqüència de ruptures diafragmàtiques [221], [222].

### 4.2. Expressió i regulació de la LOX

La LOX s'expressa en un ampli ventall de cèl·lules, entre les quals en destaquen fibroblasts, CE, CMLV, osteoblasts i condròcits [223]–[225]. A nivell tissular, trobem una abundant expressió de LOX a l'aorta fetal i adulta, la placenta, la pell i el pulmó [219], [226]. La LOX juga un paper important durant el desenvolupament, variant la seva expressió en funció de l'estadi embrionari [219], [221], [222], [227]. L'expressió de LOX disminueix notablement amb l'edat, contribuint a la pèrdua d'elasticitat dels teixits pròpia de l'envelliment. L'expressió de la LOX també es veu alterada en processos fisiopatològics, com la cicatrització de ferides, la tumorigènesi o la fibrosi. És obvi, doncs, que la LOX es troba regulada per una multitud d'efectors, entre els quals hi trobem citocines, factors de creixement, segons missatgers, ions metàl·lics o hormones. La Taula 3 resumeix els efectes dels reguladors de la LOX descrits fins ara.

### 4.3. Biosíntesi de la LOX

La LOX és sintetitzada per diversos tipus cel·lulars; a nivell vascular és produïda per fibroblasts, CMLV i CE. Es sintetitza com a precursor o preproteïna (preproLOX), la qual conté un pèptid senyal de 21 aminoàcids a l'extrem amino terminal [212], [228]. Aquest pèptid dirigeix la preproLOX al sistema de reticle endoplàsmic (RE) i, per tant, a la via de secreció. En el seu transcurs a través del RE i Golgi, el preproenzim pateix una sèrie de modificacions fins a donar una forma catalíticament inactiva de 50 kDa (proLOX): en primer lloc es proteolitza el pèptid senyal, a continuació es produeix una N-glicosilació [228], s'incorpora un àtom de Cu (II) [229] i, finalment, es forma el cofactor LTQ (lisil tirosil quinona) a través de la unió covalent dels residus de lisina 320 i tirosina 355 (corresponents a la seqüència humana) [230]. Finalment el proenzim (proLOX) es secreta a l'espai extracel·lular [231], [232], on és proteolititzat per les procol·lagen C-proteïnases (PCP) codificades pel gen BMP1 [principalment la proteïna morfogènica òssia-1 (BMP-1), i en menor grau la *mammalian Tolloid*

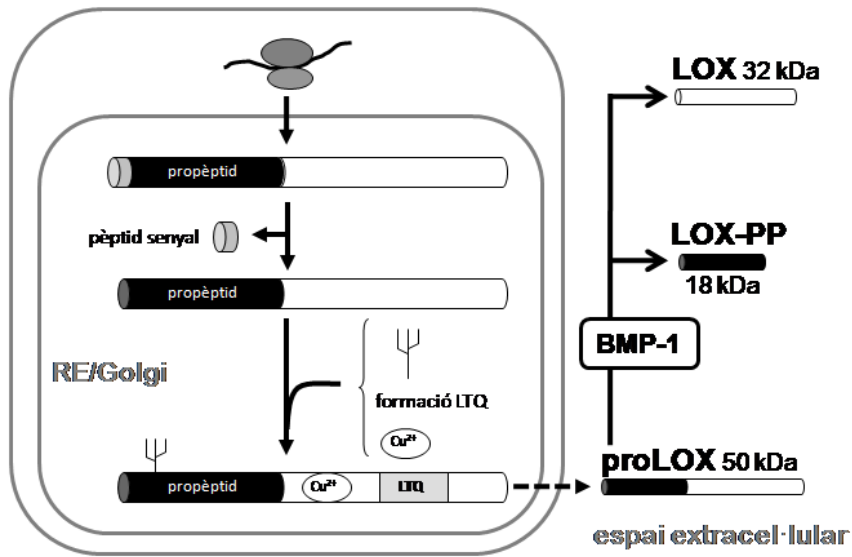
(mTLD)], així com per les proteïnases *mammalian tolloid-like* mTLL-1 i mTLL-2 [233]. Aquesta proteòlisi dona com a resultat la forma madura i catalíticament activa de 32 kDa (LOX) i el propèptid de 18 kDa (LOX-PP) (Fig. 17) [233]–[235].

Taula 3. Principals reguladors de la LOX i els seus efectes.

Molècula efectora	Teixit o tipus cel·lular	Efecte	Referències
IFN- $\gamma$	Rn: CML d'aorta	↓ nivells ARNm ↓ vida mitjana ARNm	[236]
bFGF	Mm: Osteoblasts	↓ nivells ARNm (1-10 nM) ↑ nivells ARNm (0,01-0,1 nM)	[237]
bFGF i IGF-1	Rn: Teixits buccals inflamats Rn: Fibroblasts	↑ nivells ARNm	[238]
PGE2	Rn: Fibroblasts de pulmó Hs: Fibroblasts embrionaris de pulmó	↓ activitat enzimàtica ↓ nivells ARNm	[239], [240] [241]
TGF- $\beta$ 1	Rn: CML d'aorta Hs: fibroblasts gingivals Mm: Cèl·lules tipus osteoblast	↑ nivells ARNm ↑ activitat enzimàtica	[239], [241]–[246]
Testosterona	Bt: CML d'aorta	↑ activitat enzimàtica	[247]
AMPC	Hs, Rn: CMLV	↑ nivells ARNm	[240], [248]
PDGF Angiotensina II	Rn: CMLV	↑ nivells ARNm	[249], [250]
LDL	CE (Hs, Ss) Hs: CMLV	↓ nivells ARNm ↓ activitat enzimàtica ↓ nivells ARNm	[251] dades no publicades
TNF- $\alpha$	Mm: osteoblasts CE (Hs, Ss, Bt) Rn: fibroblasts cardíacs	↓ nivells ARNm ↓ activitat enzimàtica ↓ nivells ARNm (1-5 ng/ml) ↑ nivells ARNm (10-20 ng/ml)	[252] [253] [254]
Hipòxia	Hs: diversos tipus cel·lulars	↑ nivells ARNm	[255]
Homocisteïna	Hs: CE	↓ activitat enzimàtica	[256]
Fibronectina cel·lular	Mm: fibroblasts embrionaris	↑ activació proteolítica	[257], [258]
Endotelina	Gg: CMLV aorta	↓ nivells ARNm	[259]

Rn, rata; Mm, ratolí; Hs, humans; Bt, vaca; Gg, pollastre; Ss, porc.



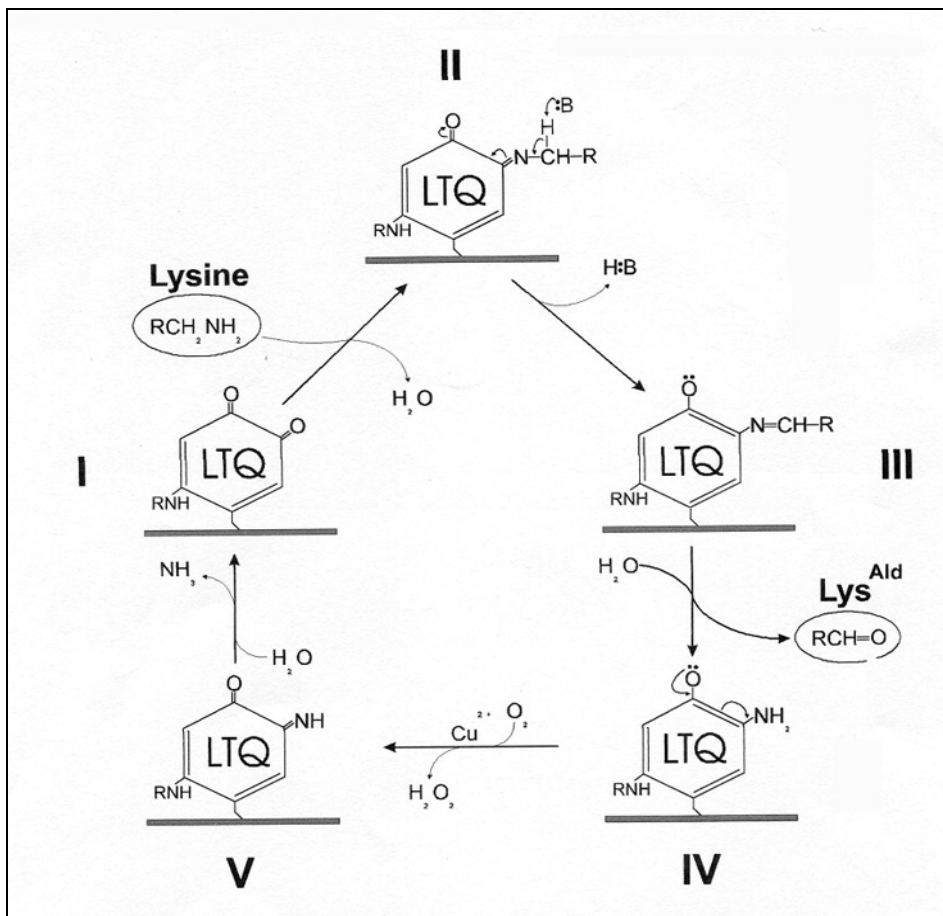


**Figura 17. Biosíntesi i funcions de la LOX.** Representació esquemàtica mostrant les principals etapes en la biosíntesi de la LOX, així com les principals funcions atribuïdes a la LOX catalíticament madura i al seu propèptid. BMP-1, proteïna morfogènica òssia-1; LOX-PP, propèptid de LOX. Imatge adaptada d'Alcudia *et al.* (2008) [260].

Si bé la LOX presenta una localització extracel·lular, sorprenentment, se n'han identificat formes intracel·lulars, tant citosòliques com nuclears [261]. Tot i que els possibles substrats intracel·lulars de la LOX no estan ben establerts, diversos estudis indiquen la participació d'aquest enzim en el control de l'expressió gènica, la motilitat i l'adhesió cel·lulars [214]. A més a més, la LOX participa en processos d'invasió, transició d'epiteli a mesènquima (EMT) i senyalització intracel·lular [255], [262]

#### 4.4. Activitat catalítica: mecanisme de reacció

La LOX catalitza la desaminació oxidativa de residus de lisina i hidroxilisina de les cadenes de col·lagen i elastina [263]. Aquesta reacció es dona en quatre passos, que s'il·lustren a la Fig. 18. En primer lloc es forma una base de Schiff entre la lisina substrat i el cofactor LTQ (I→II). D'aquesta manera, el substrat roman unit a l'enzim fins que una base, probablement una de les histidines del centre actiu, provoca el desplaçament dels electrons del substrat carbaníon al cofactor LTQ, provocant-ne la reducció (II→III). La hidròlisi de l'amina formada allibera com a producte l'aldehid derivat de la lisina, que espontàniament reaccionarà amb residus anàlegs de la mateixa proteïna o de proteïnes veïnes. Així, s'estableixen enllaços covalents inter- i intra- moleculars entre aquests substrats (III→IV). Un cop alliberat l'aldehid, l'enzim reduït es torna a reoxidar amb O<sub>2</sub> amb l'ajuda del Cu (II), produint peròxid d'hidrogen i amoni. Així es completa el cicle catalític i l'enzim, oxidat, torna a ser funcional (IV→V→I) [218], [264]. Els diferents mètodes que s'utilitzen per determinar l'activitat LOX es basen en la mesura del peròxid d'hidrogen alliberat en aquesta darrera etapa (Fig. 18).



**Figura 18. Mecanisme de reacció de la LOX.** RNH representa el residu peptidil lisina 314 de la LOX bovina, la lletra B representa una base genèrica, LTQ equival al cofactor lisina tirosilquinona, i Lys<sup>Ald</sup> representa el producte final de la reacció que s'unirà espontàniament i covalent amb residus anàlegs. Figura modificada de Smith-Mungo *et al.* (1998) i Akagawa *et al.* (2001) [218], [264].

La LOX pot interactuar amb altres substrats proteics a part del col·lagen i l'elastina, com a mínim *in vitro*. L'enzim purificat pot oxidar residus peptidil lisina en proteïnes globulars bàsiques amb punts isoelèctrics superiors a 8, com les histones H1 i H2 [265], o fins i tot factors com el bFGF o el PDGFR-β [266]. La possibilitat d'utilitzar altres proteïnes com a substrat més enllà de components de la MEC atorga a la LOX la capacitat de regular múltiples processos cel·lulars, tal i com anirem comentant a continuació.

#### 4.5. Altres funcions biològiques de la LOX: activitats intracel·lulars i intranuclears

La LOX madura (32kDa) no només es localitza a l'espai extracel·lular, sinó també a nivell intracel·lular en fibroblasts, condrocits, CMLV i en una gran varietat de cèl·lules no fibroblàstiques [261], [267], [268]. L'origen d'aquestes formes actives intracel·lulars de la LOX és desconegut, tenint en compte que la maduració de l'enzim es realitza a l'espai extracel·lular. S'ha suggerit la captació i internalització de la LOX madura des de l'espai extracel·lular, tot i que de moment se'n desconeix el mecanisme, que, segons Nellaippan *et al.*, seria independent de l'activitat enzimàtica de LOX [269].

La LOX intracel·lular s'associa al control de l'adhesió i migració cel·lular en cèl·lules canceroses. La LOX pot oxidar residus de lisina del bFGF, inhibint així els seus efectes en la progressió en el cicle cel·lular i en la fosforilació de MAPK [266]. Sorprenentment, també s'ha localitzat LOX al nucli [261], [269], on controlaria l'expressió gènica. S'han observat alteracions en la condensació de cromatina dependents de LOX [261], [267]–[270], fet que és coherent amb la seva capacitat d'utilitzar histones H1 i H2 com a substrat, com a mínim *in vitro* [271], [272]. De fet, la LOX, mitjançant la seva activitat enzimàtica, és capaç de regular l'activitat transcripcional de gens implicats en la síntesi de MEC o en la progressió tumoral, tals com el col·lagen III, la  $\beta$ -catenina, la ciclina D1 o l'elastina [272]–[274] (Revisat a [275]).

Un aspecte destacable de la biologia de la LOX és el fet que el seu propèptid presenta activitat biològica. El LOX-PP s'ha detectat dins el compartiment cel·lular, fins i tot al nucli [276], [277]. La cèl·lula podria internalitzar el propèptid sense l'ajuda de cap receptor específic gràcies al seu elevat punt isoelèctric, que és de 12,5 [278], [279]. A més a més, el LOX-PP té un senyal putatiu de localització nuclear [261], [280] que podria ser el responsable de la seva translocació al nucli. La presència del propèptid al nucli s'ha relacionat amb la regulació dels microtúbuls durant el desenvolupament dendrític en cèl·lules de Purkinje [277]. El LOX-PP també sembla jugar un paper important en processos metastàtics, ja que la seva expressió ectòpica reverteix el fenotip de fibroblasts transformats per *ras* de manera independent de l'activitat lisil oxidasa [279].

La sublocalització de la LOX a la cèl·lula sembla ser dependent del moment del cicle cel·lular en què es troba. Així, en osteoblasts en proliferació, el LOX-PP s'ha associat principalment a Golgi i al reticle endoplàsmic, mentre que la LOX madura s'ha localitzat al nucli i a la regió perinuclear. En canvi, en osteoblasts en diferenciació, tant el propèptid com la forma madura de la LOX s'han localitzat en els microtúbuls [276].

### 4.6. La lox en el desenvolupament

La LOX és essencial per al desenvolupament embrionari en mamífers. La inactivació del gen LOX en ratolins provoca la mort perinatal deguda a defectes greus en la formació de la pell i dels sistemes CDV i respiratori. A més a més, aquests ratolins presenten elastòlisi generalitzada i una deposició de col·lagen anormal en diversos teixits [221], [222], [281]. També en models murins de desenvolupament embrionari, s'ha observat que el patró d'expressió temporal de la LOX se superposa amb el dels principals col·làgens (I i IV) i l'elastina [282], [283]. Aquest fet fa que sigui sorprenent que els principals problemes en el desenvolupament no apareguin fins als darrers estadis, suggerint un efecte compensatori per part dels altres isoenzims de la família [284]. La funció més notòria de la LOX durant l'embriogènesi sembla ser el d'atorgar unes propietats físiques òptimes a la MEC de diversos teixits [284]. No obstant, la LOX també sembla exercir un paper clau dirigint els processos cel·lulars propis del desenvolupament, a jutjar pels treballs publicats durant els darrers anys que mostren les accions intracel·lulars de la forma madura de la LOX i del seu propèptid [276].

### 4.7. Patologies relacionades amb alteracions en l'activitat lox

S'han descrit múltiples patologies associades a l'alteració del patró d'expressió de la LOX. La majoria d'aquestes patologies presenten un desequilibri en el balanç síntesi/degradació de la MEC. Per exemple, s'han observat nivells elevats de LOX en fenòmens fibròtics a nivell hepàtic, miocàrdic, pulmonar o renal [285]–[292]. En la majoria dels casos hi està implicat el TGF- $\beta$ 1, un factor pro-fibròtic que estabilitza l'ARNm de la LOX i en facilita la maduració en incrementar l'expressió de les PCP [244], [293], [294]. De fet, la inhibició de l'activitat de la LOX mitjançant el tractament amb agents quelants del coure o el seu inhibidor específic ( $\beta$ -aminopropionitril; BAPN), alleuja la fibrosi en dos

models murins de fibrosi pulmonar [295], [296]. La LOX també està involucrada en processos neuro-degeneratius com l'Alzheimer, la demència o l'esclerosi lateral amiotròfica [297]–[299]. La reducció de l'expressió de la LOX, per altra banda, s'ha relacionat fortament amb l'emfisema pulmonar [300], [301] i amb el prolapse pèlvic associat a l'edat [302]. En canvi, una inducció de la seva expressió s'ha relacionat amb la hipertensió pulmonar [303], [304].

Més enllà dels problemes de teixit connectiu derivats d'un excés o d'un dèficit en l'activitat LOX, les múltiples funcions d'aquest enzim i del seu propèptid fan que la LOX estigui implicada en patologies complexes com el càncer i les malalties CDV. El paper de la LOX en aquestes patologies és complex i en alguns casos controvertit, tal i com comentarem a continuació.

#### 4.7.1. LOX i càncer

La LOX es va identificar com a supressora de la tumorigènesi induïda per *ras* [305]. Diversos estudis han observat un descens en l'expressió de la LOX en línies tumorals de fibrosarcoma, coriocarcinoma, rabdomiosarcoma i adenocarcinoma, així com en carcinomes de colon, esòfag, gàstric, pancreàtic i prostàtic, i en melanomes [220], [306]–[310]. Així mateix, la inhibició experimental de LOX pot promoure la transformació maligna de fibroblasts en cultiu [311] així com la proliferació, migració i invasió cel·lular de cèl·lules de càncer de faringe [312].

La LOX inhibeix la transformació induïda per *ras* a través dels seus efectes en la senyalització intracel·lular [299]. L'expressió de LOX evita l'activació del factor de transcripció NF- $\kappa$ B i fa disminuir els nivells de la proteïna antiapoptòtica Bcl2 [274], [313], [314]. La inhibició de la transformació induïda per *ras* sembla ser principalment dependent del propèptid, i no de la forma catalíticament activa. El LOX-PP pot inhibir el fenotip transformat de cèl·lules de càncer de mama, pulmó i pàncrees [279], [313], [315]. En cèl·lules de càncer de mama, l'expressió ectòpica del propèptid de LOX atenua la senyalització d'integrines via FAK i p130<sup>Cas</sup> (que indueix proliferació cel·lular) [316]. Cèl·lules d'hepatocarcinoma presenten una disminució de l'expressió del PP-LOX que correlaciona amb l'estadi tumoral i la metàstasi. El PP-LOX inhibeix la proliferació i la migració, i promou l'apoptosi cel·lular a través d'un mecanisme dependent de la via MAPK/ERK [317]. L'activitat lisil oxidasa també pot exercir

efectes supressors de la proliferació tumoral: la LOX pot oxidar el bFGF, inhibint així els seus efectes en la progressió del cicle cel·lular i en la fosforilació de MAPK [266].

Tot i que el paper de la LOX com a supressora de tumors està àmpliament acceptat, en els últims anys ha generat una certa controvèrsia, ja que també s'han descrit nivells elevats d'aquesta proteïna en línies cel·lulars i en els seus teixits tumorals corresponents [299], com per exemple en càncer de mama, cèl·lules escamoses de cap i coll, pròstata o ronyó [255], [318], [319]. A més, per a alguns tipus de càncer, l'augment dels nivells de LOX correlacionen en la clínica amb la metàstasi i la progressió tumoral [255], [320], [321].

La LOX promou la migració i l'adhesió en cèl·lules invasives de càncer de mama a través d'un mecanisme dependent de la producció de peròxid d'hidrogen derivada de la seva activitat catalítica, i mitjançant l'activació de la via de senyalització FAK/Src [218, 300]. En línies cel·lulars derivades de càncer de mama poc invasives, l'expressió exògena de LOX promou l'activació de Src i FAK, que al seu torn activen la via de senyalització p130<sup>Cas</sup>/Crk/DOCK180, la qual, en augmentar l'activitat de Rac i Cdc42 i disminuir l'activitat Rho, promou el canvi a un fenotip migratori mitjançant la reorganització dels filaments d'actina [301]. S'ha descrit que la inhibició de la LOX inhibeix la proliferació, la invasió, la migració i la metàstasi en cèl·lules de càncer de tiroides anaplàsic, tant *in vitro* com *in vivo*, de forma independent de la seva activitat catalítica [322].

La hipòxia, un fenomen característic del procés tumoral, indueix l'expressió de LOX en cèl·lules tumorals de càncer de mama a través del factor HIF-1. La inducció de la LOX per hipòxia indueix la motilitat cel·lular via activació de FAK a través d'un mecanisme dependent de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i de l'activació de les integrines β1 [255], [323] així com la inhibició de la β-caderina [324]. De fet, la inhibició de LOX en tumors ortotòpics comporta una reducció del grau de metàstasi [255]. En concordança amb aquest paper de la LOX en la progressió tumoral, diversos estudis demostren que l'activitat LOX, induïda per hipòxia a través de HIF-1, participa en l'EMT [325]–[327]. En els últims anys s'han realitzat estudis que mostren que la LOX és essencial en la formació del nínxol premetastàtic en cèl·lules de càncer de mama hipòxiques per un mecanisme dependent de HIF-1. L'acumulació de LOX i fibronectina en resposta a hipòxia en zones

premetastàtiques promou el reclutament de cèl·lules derivades de medul·la òssia CD11b+ [328], [329]. Aquestes cèl·lules creen l'entorn adequat per a la subsegüent invasió i creixement de cèl·lules tumorals [330], [331]. Finalment, mitjançant la seva activitat catalítica, la LOX pot activar HIF-1 via PI3K-Akt. Per tant, LOX i HIF-1 actuarien sinèrgicament fomentant la formació de tumors [332].

S'ha descrit que la teràpia anticancerígena (radiacions ionitzants) indueix l'expressió de la LOX i s'associa a la inducció d'un fenotip migratori de les cèl·lules tumorals irradiades que s'associa a metàstasi [333].

Oleggini i els seus col·laboradors han demostrat que la LOX, mitjançant l'ús de la histona H1 com a substrat i la consegüent alteració en el grau de condensació de la cromatina, indueix l'activació del promotor del virus tumoral mamari del ratolí (MMTV), un conegut mutagen insercional que causa carcinomes mamaris [334]. Aquest resultat s'afegeix a la gran quantitat d'estudis que relacionen la LOX amb el càncer, molts aparentment contradictoris, però que en definitiva ens indiquen que el paper de la LOX en la tumorigènesi varia en funció de la localització i el tipus cel·lular i de l'estadi de la transformació maligna, i ens suggereixen que la LOX podria ser una bona diana terapèutica en el tractament i la prevenció de les metàstasis tumorals [255].

#### 4.7.2. LOX i malalties cardiovasculars

A la paret vascular, la LOX s'expressa en fibroblasts, CE i CML. És la isoforma responsable del 80% de l'activitat lisil oxidasa a les CML d'aorta [281]. Mitjançant la generació de ratolins deficients en la LOX, s'ha demostrat que aquest enzim és clau tant en el desenvolupament com en el manteniment del sistema CDV. Els animals LOX<sup>-/-</sup> moren perinatalment i presenten greus alteracions a nivell vascular, incloent-hi aortes tortuoses i aneurismàtiques. A nivell microscòpic, s'hi observen fibres elàstiques fragmentades, discontinuïtats en la capa mèdia i alteracions en la morfologia de les CE, les quals perden la seva adhesió a la lamina basal [221], [222].



### 4.7.2.1. LOX i disfunció endotelial

En els ratolins LOX<sup>-/-</sup> es perd la integritat de la barrera endotelial [221]. Els estudis desenvolupats pel nostre grup demostren que, *in vitro*, la inhibició de la LOX augmenta la permeabilitat de CE cultivades en monocapa, permetent l'intercanvi de macromolècules [335]. Aquests resultats suggereixen que la desestructuració de la MEC, com a conseqüència de l'alteració de la LOX, afecta la funcionalitat de la barrera endotelial. De fet, factors desencadenants de disfunció endotelial com la hipercolesterolèmia i la hiperhomocisteïnèmia disminueixen l'expressió i/o l'activitat enzimàtica de LOX en CE en cultiu i/o a la paret vascular. Així, en un model porcí d'aterosclerosi primerenca, es va observar una disminució dels nivells d'expressió de la LOX després de l'administració de dieta hipercolesterolèmica. Els estudis *in vitro* han demostrat que concentracions aterogèniques d'LDL disminueixen tant l'expressió com l'activitat de LOX en CE a través d'un mecanisme transcripcional [256], [335]. Pel que fa a l'homocisteïna (HC), s'ha observat que, a concentracions patològiques, inhibeix l'activitat lisil oxidasa en CE mitjançant un mecanisme que sembla estar lligat a l'estrès oxidatiu generat pel grup tiol de la HC [256]. Anàlogament, la citocina proinflamatòria TNF- $\alpha$ , que promou disfunció endotelial i aterosclerosi [26], [336], també redueix l'expressió i l'activitat de la LOX en CE i *in vivo* a la paret vascular, i ho fa a través d'un mecanisme transcripcional dependent de PKC i de proteïnes geranilgeranilades com RhoA [253], [337]. Cal destacar que les estatines contraresten l'efecte inhibitori del TNF- $\alpha$  i de les LDL sobre l'expressió i l'activitat de la LOX en CE [337]. Aquests fàrmacs hipolipemians, àmpliament utilitzats en la clínica, milloren la funció endotelial com a conseqüència de mecanismes dependents i independents (pleiotròpics) de la reducció dels nivells del colesterol [314-318]. El tractament amb estatines també va contrarestar l'increment de la permeabilitat endotelial induïda per les LDL i va normalitzar l'expressió vascular de la LOX en el model porcí d'hipercolesterolèmia, fet que suggereix que la regulació de LOX per aquests fàrmacs pot contribuir al seu efecte beneficiós a nivell vascular [337].

Per tant, els resultats del nostre grup indiquen que la inhibició de la LOX podria estar relacionada amb la disfunció endotelial desencadenada per factors de risc ateroscleròtic i citocines proinflamatòries, implicant aquest enzim en les fases inicials del procés ateroscleròtic [253], [256], [260], [335].

#### *4.7.2.2. Regulació de la LOX a les CMLV*

L'activitat LOX té propietats quimiotàctiques per CMLV i monòcits, tot i que també podria participar en el control de la proliferació i la migració de les primeres [338], [339]. Així, diversos factors de creixement i citocines implicats en processos de restenosi i aterosclerosi tenen la capacitat d'induir la LOX en CMLV. Per exemple, el TGF- $\beta$ 1 n'incrementa l'expressió i l'activitat. Per altra banda, el PDGF, un potent agent mitogen que promou l'engruiximent de la neoíntima en models d'angioplàstia [340], incrementa l'expressió de la LOX en CMLV [249]. De fet, la LOX oxida el seu receptor, el PDGFR- $\beta$ , millorant així la sensibilitat de les cèl·lules a agents quimioatracients [341]. El factor estimulador de colònies de granulòcits i macròfags (GM-CSF), també implicat en el remodelat vascular, indueix l'activitat lisil oxidasa en augmentar l'expressió de la LOX i de la BMP-1 en CMLV [342]. Finalment, la generació de peròxid d'hidrogen com a subproducte de l'activitat LOX promou la formació d'adhesions focals i de fibres d'estrès en CMLV, promovent la resposta quimiotàctica [339]. La LOX, per tant, podria induir la deposició de MEC afavorint l'engruiximent de la neoíntima associat a la progressió de la placa ateroscleròtica i la restenosi [343], [344].

#### *4.7.2.3. Paper de la LOX en l'inici, la progressió i l'estabilitat de la placa ateroscleròtica*

Si bé no existeixen estudis que analitzin en detall el paper de la LOX en l'aterosclerosi, sí que s'ha analitzat en profunditat la seva capacitat de controlar processos clau en la biologia de les cèl·lules vasculares (com ara la proliferació, la migració cel·lulars o la síntesi de matriu extracel·lular), els quals participen en l'inici, la progressió i l'estabilitat de la lesió. Els estudis realitzats pel nostre grup en el model porcí d'hipercolesterolèmia indiquen que durant els primers estadis del procés ateroscleròtic es produeix una disminució de l'expressió de la LOX, fet que s'observa en les aortes de porcs sotmesos a dieta hipercolesterolèmica [335], [345].

En canvi, s'ha descrit un increment de LOX en models d'aterosclerosi avançada en plaques estables i fibròtiques [343], [344]. Per altra banda, la inducció de LOX per hipòxia en CE recolza la seva implicació en els processos d'angiogènesi propis de les lesions avançades. Pel que fa al possible paper de la LOX en el

control de l'estabilitat de la placa, s'ha proposat que un defecte en l'activitat LOX podria afeblir l'estructura de la MEC i augmentar-ne el risc de ruptura [236]. En aquest sentit, l'IFN- $\gamma$ , una citocina proinflamatòria associada a processos de degradació de la MEC i de remodelat vascular, que es troba augmentat tant en aneurismes com en plaques ateroscleròtiques que han patit processos de ruptura [346], redueix els nivells de LOX en CMLV i és un important regulador negatiu de la biosíntesi de col·lagen [236]. Aquests mecanismes poden explicar la seva contribució a l'aneurisma i la inestabilització de la lesió.

Un estudi recent, ha associat nivells elevats d'expressió de la LOX amb un fenotip més estable de les plaques ateroscleròtiques. De fet, en la població estudiada, els nivells d'ARNm de LOX en plaques carotídies predien el risc d'un futur infart de miocardi [347].

Finalment, cal destacar que estudis en ratolins deficients en ApoE<sup>-/-</sup> i IL-6, que presenten una alteració del patró lipídic amb increments en colesterol total i LDL, mostren una disminució dels nivells d'ARNm de LOX a nivell aòrtic, una reducció del contingut de col·lagen i un increment en l'activitat MMP-9, fets que contribuirien a la desestructuració de la MEC i a la inestabilització de la lesió [348].

En resum, aquests estudis suggereixen que la regulació de l'expressió de LOX podria contribuir a l'inici, la progressió i la inestabilització de la lesió.

#### *4.7.2.4. Paper de la LOX en la restenosi*

Tal i com s'ha indicat en el punt 6.7.2.2, la LOX participa en el control de la migració i la proliferació de CMLV, fenòmens clau en el procés de restenosi. Per tant, es podria especular amb la participació de la LOX en aquest procés, sobretot si tenim en compte que el TGF- $\beta$ 1 i el PDGF, inductors de l'expressió de LOX en CMLV, són factors fonamentals en el procés de restenosi [349], [350].

Nuthakki *et al.* (2004) mostren, en un model de restenosi induïda per baló en caròtida de rata, que la inducció de la LOX precedeix l'acumulació màxima de col·lagen i el moment de major creixement de la neointima, i conclouen que el paper de la LOX en el desenvolupament de processos restenòtics sembla ser

dependent del temps o de l'etapa de la lesió [344]. Tanmateix, a la bibliografia trobem resultats contradictoris. Mentre que en un estudi previ d'angioplàstia en conills, la inhibició de la LOX no afectava la reducció de la llum del vas per angioplàstia [351], més recentment, s'ha descrit que aquesta mateixa estratègia limita la restenosi en el mateix model animal [352].

#### *4.7.2.5. Paper de la LOX en l'aneurisma i la dissecció arterial*

Diversos estudis han suggerit que una reducció en l'expressió de LOX podria estar involucrada en la formació d'aneurismes. Per una banda, s'han observat nivells baixos d'expressió o d'activitat LOX en models animals d'aneurismes [159], [353], [354]. En un model d'aneurisma cerebral en rata, es va observar que el tractament amb  $\beta$ -aminopropionitril (BAPN) provocava una major formació d'aneurismes [354]. L'administració d'angiotensina II en ratolins ApoE<sup>-/-</sup>, susceptibles al desenvolupament d'aterosclerosi, indueix la formació d'AAA a diferència de ratolins C57BL6/J. En canvi, s'ha descrit que la coadministració d'angiotensina i BAPN indueix un 50% d'AAA en ratolins C57BL6/J [355]. Tanmateix, s'ha descrit que la sobre-expressió local de LOX en els ratolins tractats amb clorur càlcic normalitza el diàmetre aòrtic i evita la formació d'AAA. De fet, en aquest model, la sobre-expressió de LOX redueix la resposta inflamatòria vascular, disminuint la secreció de MCP-1, la infiltració de macròfags i l'activació de JNK, fet que contribueix a una menor progressió de l'AAA [356].

Anàlogament, la reducció de la LOX s'ha relacionat amb una pèrdua d'elasticitat vascular i amb fenòmens de calcificació, un procés que s'associa a una major progressió de l'AAA [357]. La possible alteració en l'estructura de la MEC associada a la reducció de LOX s'ha implicat també en un cas de dissecció espontània d'artèria coronària [358].

Tots aquests resultats evidencien la importància de la LOX en la funcionalitat del sistema CDV i posen de manifest la necessitat de realitzar nous estudis que aprofundeixin en el paper d'aquest enzim sobre el desenvolupament de patologies CDV.

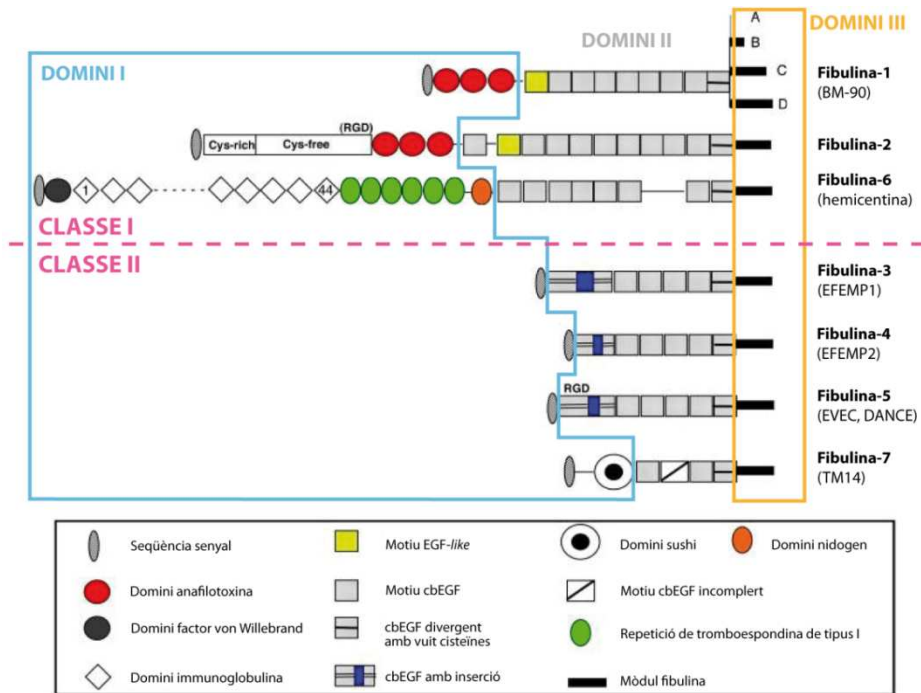
### 5. LA FIBULINA 5

#### 5.1. Introducció

La Fibulina-5 (FBLN5, UP50, EVEC, DANCE) és una glicoproteïna de MEC essencial per a la formació i manteniment de les fibres elàstiques [359]–[363]. L'interès per la FBLN5 va sorgir el 1999, quan dos grups d'investigació, de manera independent, la van identificar com una proteïna expressada a la vasculatura durant el desenvolupament embrionari així com en diverses situacions patològiques. Inicialment la van anomenar EVEC (*Embryonic Vascular EGF-like repeat-containing protein*) [360] i DANCE (*Developmental Arteries and Neural Crest EGF-like protein*)[364]. Tanmateix, poc temps després es va identificar com el cinquè membre de la família de les fibulines.

En mamífers, la família de les fibulines consta de 7 glicoproteïnes diferents que se secreten i s'associen a membranes basals, fibres elàstiques i altres components de MEC [365]. La família es defineix per la presència de dos mòduls estructurals: el domini III, a l'extrem C-terminal, amb un mòdul de tipus fibulina específic de les fibulines i les fibrilines; el domini II, amb diverses repeticions en tàndem de mòduls *epidermal growth factor-like* (EGF-like); i el domini I, en posició amino-terminal, que és variable. La majoria dels mòduls EGF-like contenen una seqüència consens d'unió a calci, que s'anomenen mòduls *epidermal growth factor-like* d'unió a calci (cbEGF) (Fig. 19).

Les glicoproteïnes de la MEC poden tenir un pes molecular relativament gran, com les laminines, la fibronectina o l'elastina, o bé més petit, les quals, més que un paper estructural, tenen la funció de modular el comportament i funcions cel·lulars. Les fibulines, que formen part d'aquest segon subgrup, reuneixen i estableixen estructures de la MEC durant els processos d'organogènesi, vasculogènesi, fibrogènesi i tumorigènesi [366]. Es tracta de proteïnes multifuncionals degut a la seva capacitat d'interaccionar i unir-se a d'altres proteïnes de la MEC, i en el cas concret de la FBLN5, també a integrines de superfície cel·lular. Així doncs, a més de donar suport a components de la MEC, les fibulines actuen com a mediadores de la comunicació intercel·lular i cel·lula-matriu [367].



**Figura 19. Representació esquemàtica de la família de les fibulines.** Els set membres de la família presenten una disposició modular similar, dividida en tres dominis: I, II i III. El domini I, a l'extrem N-terminal, és variable, tant pel que fa a la llargada com als motius. El domini II, al centre, consta de motius EGF-like. El domini III, a l'extrem C-terminal, conté un mòdul de tipus fibulina. Les fibulines es classifiquen en dos subgrups segons el domini I: la classe I, que inclou les fibulines llargues (fibulina-1, -2 i -6) i la classe II, amb les fibulines curtes (fibulina-3, -4, -5 i -7). La fibulina-5 conté una seqüència RGD evolutivament conservada, mentre que la seqüència RGD a la fibulina-2 no està conservada entre espècies. Els parèntesis indiquen els sinònims de les corresponents fibulines. Figura adaptada de Yanagisawa *et al.* (2009) [348].

## 5.2. Propietats físico-químiques i estructurals

La FBLN5, en mamífers, té un pes molecular teòric d'uns 50 kDa. Tanmateix, pateix un conjunt de glicosilacions als microsomes donant lloc a una proteïna de 64-66 kDa [360]. Forma part de la classe II de les fibulines, les denominades "curtes" (Fig. 19). Igual que la resta de fibulines, la FBLN5 té un pèptid senyal per a la via de secreció i diverses repeticions en tàndem de mòduls cbEGF-like.

### 5.2.1. Els motius EGF-like

El mòdul EGF-*like* és un motiu molt freqüent en proteïnes dirigides a vies de secreció i està present en moltes proteïnes de MEC, com les fibrilines 1 i 2 o el nidogen. També el trobem en reguladors de la coagulació sanguínia com la trombomodulina, en el receptor d'LDL (LDLR), en les proteïnes d'unió al TGF- $\beta$  latent (LTBP), o en les proteïnes involucrades en diferenciació cel·lular Notch, Delta i Serrate [368].

Els mòduls cbEGF són un subgrup del motiu EGF-*like* que contenen una seqüència d'aminoàcids particular que els permet unir-se al calci. Repeticions en tàndem de dominis cbEGF formen estructures helicoidals allargades de tipus vara que s'estabilitzen amb ponts disulfur i s'ordenen seguint un patró característic, conferint integritat estructural a les proteïnes [368]. Les fibulines-3, -4 i -5 contenen sis dominis cbEGF; el primer conté una inserció rica en prolines, i el sisè és un domini divergent amb vuit cisteïnes. La FBLN5, però, és l'únic membre de la família que conté un domini conservat RGD. Aquest es troba ubicat al primer domini cbEGF (Fig. 19).

### 5.2.2. El motiu RGD

El motiu RGD és una seqüència d'arginina-glicina-aspartic (RGD) evolutivament conservada i present en la majoria de llocs de reconeixement a integrines ( $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 11\beta 3$ , i totes les integrines  $\alpha\beta$ ) [369]. Les proteïnes de MEC amb motius RGD transmeten senyals de l'entorn cel·lular a les cèl·lules mitjançant la unió a integrines, activant vies de senyalització que promouen canvis en el citoesquelet o en l'expressió de proteïnes reguladores de matriu [370]. La presència d'un domini RGD en la FBLN5 la diferencia de la resta de fibulines i li confereix unes propietats úniques que li permeten actuar com a nexa entre les cèl·lules i les proteïnes estructurals de la MEC [361]. Estudis d'interacció directa entre proteïnes revelaren que la FBLN5 només era capaç d'unir-se a la integrina  $\alpha\beta 3$  després de la seva reducció i alquilació que desemmascara i exposa la seqüència RGD a la superfície de la proteïna.

### 5.3. Patró d'expressió

La FBLN5 és una proteïna d'expressió força ubiqua. A nivell vascular s'expressa en CE, CMLV i fibroblasts [360], [364]. Durant l'embriogènesi, s'expressa abundantment en les regions d'EMT durant el desenvolupament de les artèries (sobretot les de gran calibre), al coixí endocàrdic, a la cresta neural i al teixit mesenquimal [367]. En adults, els nivells d'expressió baixen dràsticament, excepte a l'úter, que manté una angiogènesi cíclica. Tot i això, també trobem FBLN5 en els teixits adults, principalment en els que són rics en fibres elàstiques com les grans artèries, el cor, el pulmó, la pell o el colon; i també a l'ovari, el ronyó, el pàncrees i els testicles. Els nivells d'expressió en vasos adults poden augmentar significativament en resposta a dany vascular o en l'aterosclerosi [360], [364].

### 5.4. Interaccions moleculars

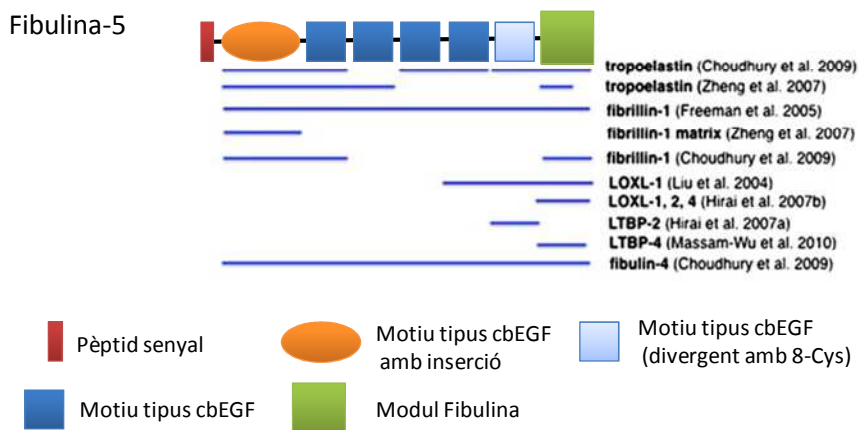
La FBLN5 és una molècula multifuncional que pot exercir diversos efectes segons el context. Aquesta versatilitat es deu, en gran part, a la multiplicitat dels seus lligands, que es resumeix a la Taula 4 (Revisat a [371]). Així, segons les interaccions moleculars de la FBLN5 amb altres components de la matriu, la FBLN5 regula processos diversos com l'elastogènesi (Figura 20), l'angiogènesi o l'adhesió i proliferació cel·lulars.

**Taula 4. Interaccions moleculars de la FBLN5.**

Interacció amb	Lloc(s) d'unió a FBLN5	Funció cel·lular i/o biològica
FBLN5	ND	Desconeguda
Tropoelastina	cbEGF	Elastogènesi
LOXL1	Domini C-terminal	Elastogènesi
LOXL2, 4	Mòdul de tipus fibulina	Elastogènesi
Emilina-1	ND	Elastogènesi
LTBP-2	6 <sup>e</sup> cbEGF	Elastogènesi
Fibrilina-1	N- i C-terminal	Elastogènesi
SOD3	Domini C-terminal	Modulació de l'estrès oxidatiu
$\alpha 5\beta 1$ , $\alpha 4\beta 1$	RGD	Adhesió cel·lular Antagonisme de la senyalització per fibronectina
$\alpha v\beta 3$ , $\alpha v\beta 5$	RGD	Adhesió cel·lular
$\alpha 9\beta 1$	ND	Adhesió cel·lular
Lipoproteïna(a)	Domini C-terminal	Desconeguda

ND, no determinat.





**Figura 20. Presentació esquemàtica de la Fibulina-5 i les seves interaccions en la formació de les fibres elàstiques.** Les línies blaves indiquen el domini d'interacció determinat per assajos d'unió en fase sòlida, Biacore, o Co-IP. La línia que abasta la seqüència sencera indica que el domini d'unió no s'ha determinat. Imatge obtinguda de Yanagisawa *et al.* (2014) [372].

Des de la seva identificació el 1999 fins a l'actualitat, s'han pogut caracteritzar alguns dels factors implicats en la regulació de la FBLN5 (Taula 5) (Revisat a [371]), i també s'han pogut establir les funcions cel·lulars que duu a terme. Tot i això, queden molts aspectes per caracteritzar de la biologia de la FBLN5. De fet, gran part de les respostes vehiculades per la FBLN5 depenen del context i del tipus cel·lular (Taula 6) (Revisat a [371]). Així, segons el tipus cel·lular, els canvis fenotípics promoguts per la FBLN5 poden ser fins i tot oposats. Els mecanismes implicats en aquest comportament diferencial de la FBLN5 són desconeguts.

**Taula 5. Reguladors de la FBLN5.**

Estímul	Tipus cel·lular	Efecte
TGF-β1	Fibroblasts CE	↑ expressió FBLN5
Myc	Fibroblasts	↓ expressió FBLN5
IL-1β	Fibroblasts	↓ expressió FBLN5
Tropoelastina	Fibroblasts	↑ expressió FBLN5
Dany pulmonar	Fibroblasts	↑ expressió FBLN5
VEGF	CE	↓ expressió FBLN5
Dany vascular Aterosclerosi	CMLV CE	↑ expressió FBLN5

Taula 6. Efectes específics de context de la FBLN5.

Tipus cel·lular	Efectes
CE	↑ Adhesió ↓ Proliferació ↓ Invasió ↓ Ramificació angiogènica ( <i>sprouting</i> ) ↑ Expressió TIMP-1 i 3 ↓ Expressió MMP-2 i 3 ↑ Expressió TSP-1 → ↓ activitat MMP-9
CMLV	↑ Adhesió ↓ Proliferació
Cèl·lules epitelials	↓ Proliferació
Cèl·lules epitelials de càncer de mama	↑ Activitat MMP-2 ↑ Activitat MMP-9
Cèl·lules de càncer de pulmó	↓ Expressió MMP-7
Fibroblasts	↑ Proliferació
Fibrosarcoma	↑ Proliferació ↑ Migració ↑ Invasió
Cèl·lules d'estroma vaginal	↓ Activitat MMP-9

## 5.5. Paper de la FBLN5 en l'elastogènesi

L'elastina és la responsable de les propietats elàstiques d'extensibilitat i resiliència de la MEC d'una gran varietat de teixits, com els vasos sanguinis de gran calibre, el parènquima pulmonar, la pell o els lligaments elàstics. La seva forma monomèrica, la tropoelastina, s'acobla per formar les fibres elàstiques seguint un procés complex i ordenat que coneixem com a elastogènesi. En l'elastogènesi són necessàries múltiples interaccions entre proteïnes regulades en el temps i l'espai (Revisat a [373], [374]). En els darrers anys s'han publicat nombrosos estudis que intenten aclarir com ocorre aquest procés. Tots coincideixen que per a assolir una matriu elàstica funcional, cal que la tropoelastina interaccioni amb altres proteïnes de matriu, incloent-hi fibrilines i fibulines. Els darrers models proposats atorguen un paper essencial a la FBLN5, així com la fibulina-4, la LOX, la LOXL1 i les LTBP. La FBLN5 té una estructura modular que pot interaccionar amb diverses molècules durant cada etapa del procés (Fig. 20) [372].

La participació de la FBLN5 en l'elastogènesi es va suggerir el 2002 quan, de manera simultània, els dos grups d'investigació que van descriure la FBLN5 el 1999 van publicar dos treballs pràcticament idèntics en els quals, mitjançant

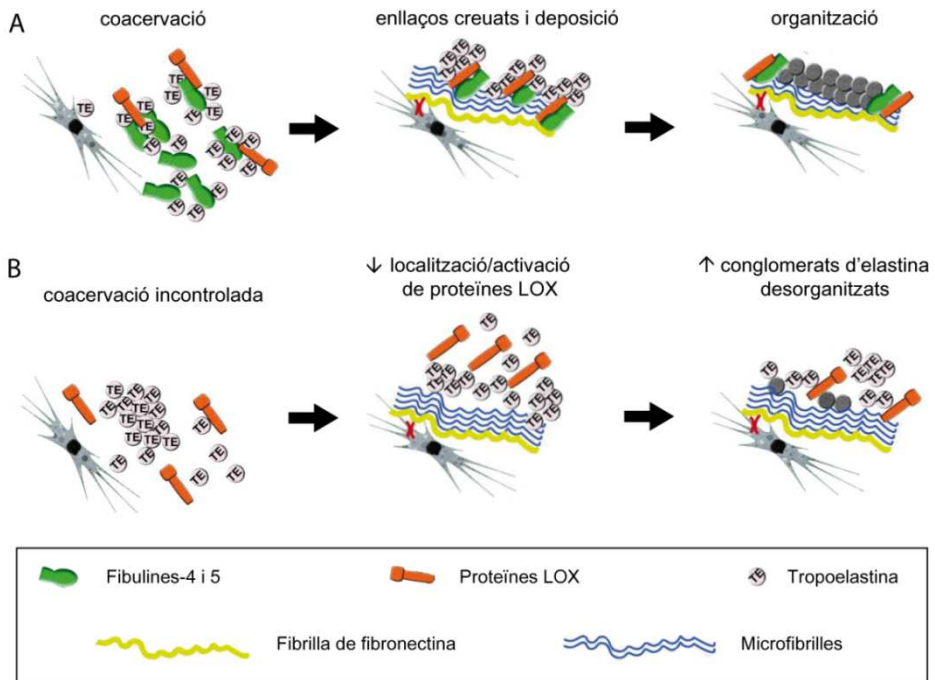
l'ús de ratolins deficients per al gen de la FBLN5, mostraven que aquesta proteïna jugava un paper essencial en l'organització de les fibres elàstiques. El fenotip dels ratolins *Fbln5*<sup>-/-</sup> indica un desenvolupament defectuós d'aquestes fibres [361], [363]. A nivell vascular, aquests animals presenten aortes tortuoses i fràgils i una major ramificació vascular a nivell sistèmic. Un estudi més recent mostra que, a la dermis d'aquests animals, l'elastina és immadura, amb un nivell molt baix d'enllaços i que forma glòbuls desvinculats de les microfibrilles [359].

La tropoelastina, després de ser secretada per les cèl·lules elastogèniques que la sintetitzen (fibroblasts dèrmics, CMLV i cèl·lules alveolars pulmonars), s'agrega amb altres molècules de tropoelastina, passant de ser una molècula soluble a formar agregats insolubles per un procés anomenat coacervació [375], [376]. Aquests agregats maduren fusionant-se entre ells i donant lloc a agregats més grans [377], els quals s'ordenen prenent com a motllo les microfibrilles, formades principalment per fibrilina-1 i -2. La FBLN5 interacciona amb fragments N-terminal de la fibrilina-1 i co-localitza amb les microfibrilles [378], [379] potenciant la interacció entre la tropoelastina i la fibrilina-1 i actuant com una proteïna adaptadora per formar l'estructura terciària de les fibres elàstiques [380]. Finalment, aquestes s'estabilitzen mitjançant l'activitat enzimàtica de LOX i LOXL1 [226], [381]–[383].

Inicialment es va pensar que la FBLN5 dirigia la correcta organització de les fibres d'elastina en unir-se simultàniament a tropoelastina, integrines i fibrilina-1 [361], [378]–[380], [384], [385] (Fig. 20). No obstant això, estudis més recents mostren que la interacció entre tropoelastina i FBLN5 no és necessària per a la co-localització d'elastina i microfibrilles [359], i que la unió de la FBLN5 a integrines via RGD tampoc no és necessària per a la formació de les fibres elàstiques [386]. En canvi, la FBLN5 sembla indispensable per a la correcta integració de l'elastina als feixos de microfibrilles [359] (Fig. 22).

Si bé la FBLN5 facilita la coacervació de tropoelastina *in vitro* (igual que la fibrilina-1) disminuint la temperatura de coacervació [387]–[389], també s'ha observat que alenteix el procés de maduració mitjançant la inhibició de l'ensamblatge i el creixement aberrant dels agregats coacervats [377] (Fig. 22). De manera que la FBLN5 (i també la FBLN4) controlaria el tamany dels agregats de tropoelastina impedit que es fessin massa grossos, permetent així una col·locació correcta a

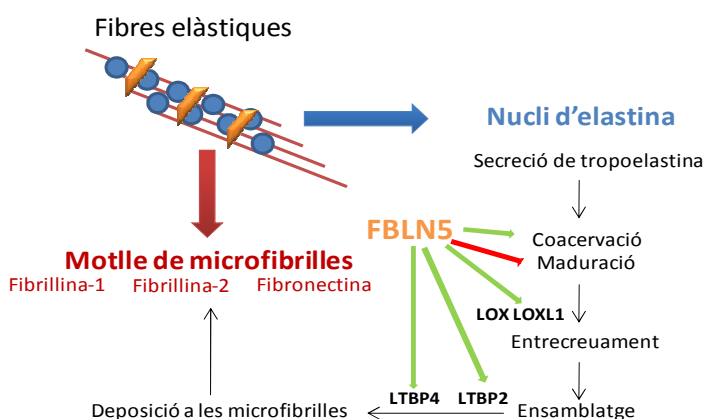
les microfibrilles (Fig. 21)[374]. En aquest sentit, s'ha descrit que l'oxidació de la tropoelastina facilita la coacervació però disminueix la unió a la FBLN5 resultant en la formació d'agregats d'elastina [390].



**Figura 21. Model d'elastogènesi proposat per Yanagisawa *et al.* (2010).** A) Procés normal de formació de les fibres elàstiques, comprenent els passos de coacervació, enllaços creuats, deposició i organització. Les fibulines-4 i -5 regulen el procés de coacervació a la perifèria de les cèl·lules elastogèniques, amb la presència de formes inactives de les proteïnes LOX. Les fibrilles de fibronectina ancorades a les cèl·lules serveixen de motllo per a l'assemblatge de microfibrilles, les quals serveixen de motllo per a la deposició de tropoelastina (TE). Les fibulines potencien l'activació proteolítica de les proteïnes LOX, les quals inicien els enllaços creuats entre agregats de tropoelastina. Un cop polimeritzada l'elastina, és probable que les fibulines romanguin a la perifèria de les fibres elàstiques. B) Situació hipotètica sense fibulines-4 ni -5. Els processos de coacervació i maduració no estan regulats, dificultant els enllaços creuats entre coacervats de TE. Els complexos LOX/LOXL1-TE no es poden incorporar correctament a les microfibrilles, i les proteïnes LOX no s'activen proteolíticament. El resultat són nombrosos agregats de TE i una reducció de fibres elàstiques madures. Figura adaptada de Yanagisawa *et al.* (2010) [374].

Finalment, els monòmers d'elastina han d'establir enllaços entre ells per tal de formar els polímers d'elastina, procés que inicien els enzims LOX i LOXL. Tot i que el paper que juga la FBLN5 en aquest punt encara no s'ha aclarit en la seva totalitat, sembla que facilitaria la formació d'enllaços creuats entre molècules de tropoelastina [362]. Per una banda, s'ha observat que la FBLN5 interacciona amb LOXL1, LOXL2 i LOXL4; i que es localitza amb LOXL1 específicament en les zones d'ensamblatge de fibres elàstiques [388], [391] (Fig. 22). Segons això, s'ha postulat que la FBLN5, en unir-se tant a la tropoelastina com a la LOXL1, estaria controlant espacialment la polimerització d'elastina [388], [391]. No obstant això, per altra banda, s'ha observat que la LOXL1 es posiciona en les fibres en formació mitjançant el seu propèptid (tot i que es desconeix per quin mecanisme), i que aquesta localització és independent de FBLN5 [359], [392]. Tot i això, sembla que la FBLN5 regula l'activitat lisil oxidasa, ja sigui directament o indirecta, ja que en la seva absència, el proenzim de LOXL1 no es proteolitza i per tant, és inactiu [359].

S'ha descrit també la interacció de la FBLN5 amb altres molècules com les proteïnes d'unió al TGF- $\beta$  latents facilitant la deposició de l'elastina a les microfibrilles. El silenciament de LTBP4 i LTBP1 aboleix la correcta deposició de l'elastina i la FBLN5 i la LTBP-2 competeix amb la tropoelastina per unir-se a la FBLN5 esdevenint un regulador negatiu de l'elastogènesi [393], [394].



**Figura 22. Funcions de la FBLN5 durant l'elastogènesi.** Les fibres elàstiques estan dividides en el nucli d'elastina (blau) i el motlle de microfibrilles (vermell). Cada etapa de l'elastogènesi es mostra a la dreta i les interaccions moleculars entre la FBLN5 i els diferents components de les fibres elàstiques i les funcions potencials de la FBLN5 es mostren amb fletxes (verd= interacció/activació; vermell= inhibició). Imatge obtinguda de Yanagisawa *et al.* (2014) [372].

La FBLN5, doncs, és una proteïna indispensable per a la correcta formació de les fibres elàstiques, un procés complex finament regulat per un gran nombre de proteïnes de MEC. De fet, sembla que la síntesi de FBLN5 podria estar induïda, directament o indirecta, per la tropoelastina en les cèl·lules elastogèniques, tal i com apunten Tsuruga *et al.* (2004) [395].

## 5.6. Regulació de l'adhesió, la proliferació i la migració cel·lulars

A part de ser indispensable en la formació de les fibres elàstiques, la FBLN5 té la capacitat de regular la funcionalitat de les cèl·lules en funció del context i del tipus cel·lular.

La FBLN5 promou l'adhesió de CE i CMLV al substrat mitjançant la seva unió simultània a integrines (com  $\alpha4\beta1$ ,  $\alpha\nu\beta3$ ,  $\alpha\nu\beta5$  o  $\alpha9\beta1$ ) i a components de la MEC. En aquestes cèl·lules, la FBLN5 inhibeix la proliferació i la migració, mentre que en fibroblasts i cèl·lules de fibrosarcoma indueix aquests dos últims processos. Sorprenentment, en cèl·lules epitelials, la FBLN5 té propietats antiproliferatives, tot i activar vies de senyalització similars a les que activa en fibroblasts [361], [384], [396]. En CE, la FBLN5 promou l'adhesió mitjançant el seu domini RGD, en unir-se a integrines  $\alpha\nu\beta3$ ,  $\alpha\nu\beta5$  i  $\alpha9\beta1$  [341, 344]. En models experimentals, s'ha observat que, si bé la FBLN5 no afecta l'adhesió de CE en condicions estàtiques, sí que incrementa l'adhesió d'aquestes cèl·lules a superfícies artificials en condicions d'estrès de cisalla [397].

La FBLN5 regula l'adhesió de CMLV a través de les integrines  $\alpha5\beta1$  i  $\alpha4\beta1$ . L'adhesió a la FBLN5 no comporta la formació de fibres d'estrès ni d'adhesions focals, a diferència de les CMLV que creixen en fibronectina, la qual també s'uneix a les mateixes integrines. De fet, en presència de FBLN5 es bloqueja l'activació de la integrina  $\beta1$  per fibronectina, atorgant a la FBLN5 un clar paper antiproliferatiu en CMLV i indicant que, si més no en CMLV, la FBLN5 actuaria com un antagonista d'integrines [384], [398]. En concordança amb aquestes observacions, cultius de CMLV provinents de ratolins deficientes per a la FBLN5 presenten unes taxes de proliferació i migració més elevades que les de ratolins silvestres en resposta al PDGF-BB [398], [399].

### 5.7. FBLN5 i angiogènesi

L'angiogènesi és el procés pel qual es formen nous capil·lars a partir de vasos pre-existents. En adults sans, només trobem aquest fenomen en el cicle reproductiu femení i en la cicatrizació. No obstant això, l'angiogènesi també participa en patologies com l'aterosclerosi o el càncer.

Aquest complex procés està finament regulat, jugant-hi un paper clau el control de la síntesi/degradació de MEC. De fet, s'inicia amb un procés de degradació de MEC per tal d'assolir una matriu que permeti la proliferació, migració i morfogènesi de les CE. El remodelat de la MEC també allibera factors biològicament actius segrestats per la matriu i essencials en el procés de la vasculogènesi. Finalment, la matriu torna a acoblar-se i els contactes entre cèl·lula i MEC es restableixen per tal d'estabilitzar els nous vasos acabats de formar [400], [401].

Els ratolins deficientes per a la FBLN5 presenten una major ramificació a nivell vascular i dèrmic [361], [363], [402]. La MEC d'aquests animals és més permissiva a l'angiogènesi, segons un model d'invasió fibrovascular amb esponges subcutànies [403]. *In vitro*, les CE en procés de tubulogènesi presenten una menor expressió de FBLN5. A més a més, la FBLN5 inhibeix la ramificació angiogènica en CE, així com la proliferació i invasió d'aquestes cèl·lules en matrius artificials (*Matrigel*) [404]. La FBLN5, doncs, es presenta com una molècula anti-angiogènica. Alguns estudis suggereixen que aquesta activitat anti-angiogènica seria, si més no en part, responsable del paper de la FBLN5 com a supressora de tumors [405].

Sembla que la FBLN5 exerceix aquests efectes anti-angiogènics regulant l'expressió de factors pro- i anti-angiogènics per part de les CE i antagonitzant la resposta d'aquestes cèl·lules al VEGF. Així, en CE, la FBLN5 induïx l'expressió dels inhibidors de MMP TIMP-1 i -3 i redueix l'expressió de les MMP-2 i -3 [404]. Tanmateix, la FBLN5 i el factor pro-angiogènica VEGF es contraresten mútuament. En CE, el VEGF inhibeix l'expressió de FBLN5 induïda per TGF- $\beta$ 1 [406], mentre que la FBLN5 redueix la resposta de les CE al VEGF, alhora que n'augmenta l'expressió de trombospondina-1, un factor anti-angiogènica [404]. La trombospondina-1 inhibeix l'activació de MMP-9, de manera que en ser

induïda per la FBLN5, estaria promovent la finalització del procés angiogènic [407], [408].

## 5.8. Patologies relacionades amb alteracions en la FBLN5

Les conseqüències d'una "alteració" en els nivells de FBLN5 s'observen naturalment en l'envelliment, de forma que, en humans, la dermis presenta una disminució dels nivells de FBLN5 associada a l'edat [409]. S'ha observat que la FBLN5 pot ser fragmentada específicament per una serina proteasa, alliberant un fragment amino-terminal que conté el domini RGD, de manera que la proteïna truncada perd la capacitat d'unir-se a microfibrilles o integrines. En la pell de ratolins, la quantitat de FBLN5 truncada augmenta amb l'edat, mentre que la de FBLN5 íntegra disminueix. Per tant, la proteòlisi de la FBLN5 podria estar involucrada en la pèrdua d'elasticitat de la pell pròpia de l'edat [388]. A nivell patològic, els ratolins deficients per a la FBLN5 ens donen una bona idea de com pot afectar la manca d'aquesta proteïna. Tal i com ja hem anat comentant, aquests ratolins tenen les fibres elàstiques totalment desorganitzades, fet que els provoca pell laxa, vasos sanguinis tortuosos i molt ramificats, emfisema pulmonar i prolapse genital; i de fet, s'han descrit associacions entre aquestes patologies i la FBLN5 en humans [361], [363], [371], [410]. Tanmateix, mutacions en el gen de la FBLN5 poden donar lloc a formes alterades d'aquesta proteïna o a una reducció dels seus nivells, ocasionant patologies com la síndrome de cutis laxa o la degeneració macular [411]–[414].

### 5.8.1. FBLN5 i càncer

La majoria de metàstasis humanes (ronyó, mama, ovari, pròstata, pulmó i colon) presenten nivells baixos o nuls de FBLN5 [406], [415]. La pèrdua de FBLN5 en tumors pot ser fruit de factors que n'inhibeixen l'expressió, com Myc (el producte del proto-oncogen *c-Myc*) o el VEGF [416], [417]. S'han publicat nombrosos estudis que mostren que la FBLN5 pot actuar com a supressora de tumors. La FBLN5 pot frenar el creixement tumoral de cèl·lules epitelials en controlar la ramificació angiogènica, la proliferació i la migració cel·lulars, i tot això amb un efecte apoptòtic mínim [404]–[406], [418]. La FBLN5 dificulta la creació d'una MEC propícia a la proliferació i migració cel·lulars en inhibir metal·loproteases de matriu com la MMP-7 i la MMP-9 en cèl·lules de càncer de pulmó i fetge [415], [419], [420]. La FBLN5 senyalitza aquests efectes mitjançant



la seva unió a integrines via RGD actuant com un lligand endògen competitiu (Revisat a [372]).

Malgrat aquests estudis, també s'ha suggerit que la FBLN5 pot augmentar la tumorigènesi: en fibroblasts i en cèl·lules epitelials, la FBLN5 exerceix un efecte sinèrgic amb el TGF- $\beta$ 1, augmentant-ne les respostes de creixement, motilitat i invasió cel·lulars, i induint l'EMT [406], [421]–[423]. S'ha descrit que l'expressió de la FBLN5 correlaciona amb la metastasi i un mal pronòstic en diversos tipus de càncer [423]–[425].

En definitiva, el paper de la FBLN5 en el càncer encara és una mica confús i, tal i com succeeix amb altres processos regulats per la FBLN5, varia en funció del context i del tipus cel·lular.

### 5.8.2. FBLN5 i malalties cardiovasculars

Ja hem comentat àmpliament la importància que té la FBLN5 en el desenvolupament i manteniment dels vasos sanguinis i en l'homeòstasi de les cèl·lules vasculars. Les anomalies vasculars observades en els ratolins *Fbln5*<sup>-/-</sup> (aortes tortuoses, disteses, fràgils i sense capacitat de resiliència, malformacions en l'arbre vascular, vasos excessivament ramificats i pressió arterial elevada) suggereixen la importància d'aquesta proteïna en el control del remodelat vascular [361], [363]. De fet, recentment s'ha descrit que la deficiència de FBLN5 provoca que les grans artèries, que mitjançant les fibres elàstiques emmagatzemen energia durant la sistole per utilitzar-la a la diàstole, presenten una distensibilitat arterial reduïda que provoca hipertensió i una reducció en la funció cardíaca [426]–[428].

Tal i com hem comentat anteriorment, l'expressió de la FBLN5 en vasos adults és molt baixa, excepte en l'úter i en aquells punts que, per qüestions hemodinàmiques, són més propensos a patir lesions ateroscleròtiques, com per exemple els punts de ramificació intercostal de l'aorta toràcica [429], [430]. Mitjançant l'ús de models animals susceptibles al desenvolupament d'aterosclerosi (models murins *LDLR*<sup>-/-</sup> i *LDLR*<sup>-/-</sup>/*Tg:apoB*<sup>+/+</sup>) i models d'inducció de lesió per baló en artèria caròtida i aorta de rata, s'ha pogut observar que l'expressió de la FBLN5 s'activa fortament en les **lesions vasculars**. La FBLN5 també s'indueix en la vasculatura pulmonar sotmesa a hiperòxia. Aquests

increments dels nivells de la FBLN5 es produeixen, però, en els darrers estadis de remodelat de MEC, coincidint amb l'aturada de la proliferació de CMLV [360], [364], [431]. Resultats previs del nostre grup descriuen que la FBLN5 també s'indueix per hipòxia en CE i que aquesta promou la seva supervivència [432]. En concordança amb aquestes observacions, els ratolins deficients per a la FBLN5 sotmesos a lligadura de caròtida desenvolupen un remodelat vascular exagerat comparat amb els animals normals [398]. Per tant, tenint en compte aquests resultats, i que la FBLN5 té la capacitat d'inhibir la proliferació i la migració de CE i CMLV, tot indica que la seva reactivació en els darrers estadis de les lesions vasculares contraresta la proliferació de CMLV, donant a la FBLN5 un paper resolutiu i protector en aquestes lesions.

Tanmateix, la FBLN5 podria estar modulant l'estat redox a la paret vascular a través de la seva unió a la superòxid dismutasa extracel·lular (SOD3), la qual regula els nivells de l'ió superòxid ( $O_2^-$ ). Els ratolins deficients per a la FBLN5 mostren nivells més elevats de  $O_2^-$  a l'aorta respecte als ratolins silvestres, així com nivells superiors de SOD3 circulants. Aquests resultats suggereixen que, en absència de FBLN5, la SOD3 no queda retinuda a la paret arterial, fet que explicaria l'increment de  $O_2^-$  al teixit vascular [433]. Finalment, en models animals d'aterosclerosi i de lesió arterial per baló s'ha observat un fort increment de SOD3 i FBLN5 a la paret vascular [360], [364], [434], fet que podria interpretar-se com un efecte compensatori o reparador de la lesió. El control dels nivells de ROS per la FBLN5 es produiria a través d'un mecanisme dependent de les integrines  $\beta 1$  [435].

La FBLN5, tal i com hem vist, és una proteïna multifuncional implicada en múltiples aspectes de l'homeòstasi vascular i íntimament relacionada amb la LOX. Tot i que des del seu descobriment s'ha avançat molt en el seu coneixement, el paper de la FBLN5 en el control de la funcionalitat vascular no s'ha caracteritzat en profunditat.

## 6. ELS FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ SOX

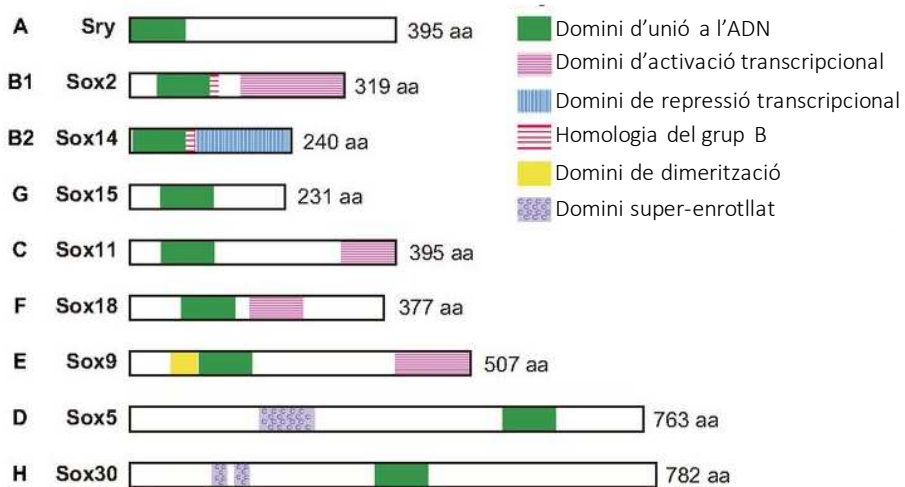
### 6.1. Introducció

Els factors de transcripció de la família SOX [sex-determining region Y (Sry) related High Mobility Grup (HMG) box] es caracteritzen per la presència d'un domini d'unió a l'ADN amb una elevada homologia de seqüència amb el grup HMG identificat originalment al gen Sry. La família de proteïnes SOX funcionen com a reguladors transcripcionals activant o reprimint la transcripció de gens de forma específica de teixit. Aquests participen en diferents processos biològics, especialment en la diferenciació de diversos llinatges cel·lulars durant el desenvolupament embrionari. El processos més destacats en que aquests gens estan involucrats són la determinació del sexe, la neurogènesi, el desenvolupament de la cresta neural, l'esqueletogènesi i l'hematopoesi (Revisat en [436]).

En humans, s'han descrit 20 gens d'aquesta família que es troben dividits en 8 grups (A-H) d'acord amb la seva anàlisi filogenètica (Taula 7). Tots ells presenten, com a mínim, un 50% d'identitat amb la seqüència d'aminoàcids del domini HMG del gen Sry amb un motiu de 9 aminoàcids comú (RPMNAFMVW) [437]. A més, els membres d'un mateix subgrup comparteixen similituds estructurals importants fora d'aquest domini que alberguen dominis funcionals comuns de dimerització, transactivació o transrepressió (Figura 23). En funció de la presència d'aquests dominis, les diferents proteïnes SOX, llevat del grup D, poden actuar com a activadors o repressors de la transcripció.

**Taula 7. Família de gens SOX**

<b>Subgrup</b>	<b>Integrants</b>
SOXA	SRY
SOXB1	SOX1, SOX2, SOX3
SOXB2	SOX14, SOX21
SOXC	SOX4, SOX11, SOX12
SOXD	SOX5, SOX6, SOX13
SOXE	SOX8, SOX9, SOX10
SOXF	SOX7, SOX17, SOX18
SOXG	SOX15
SOXH	SOX30



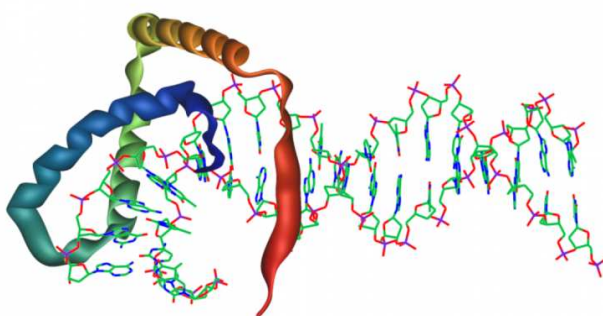
**Figura 23. Classificació i estructura de les proteïnes SOX.** Dominis estructurals de les proteïnes SOX de ratolí. Es mostra una proteïna SOX representativa de cada sub-grup de la família SOX (imatge obtinguda de Kamachi *et al.* (2013) [438]).

## 6.2. El domini HMG: unió a l'ADN

Totes les proteïnes SOX s'uneixen a l'ADN específicament a la seqüència consens hexamèrica 5'-(A/T)(A/T)CAA(A/T)-3' a través del seu domini HMG. Els nucleòtids adjacents a aquesta seqüència consens varien entre les diferents proteïnes SOX determinant l'especificitat per cada membre de la família. [439].

En funció del context, la unió del factor SOX al promotor d'un gen diana requereix la interacció amb altres proteïnes, determinant així l'especificitat de teixit. Les proteïnes SOX poden formar dímers entre proteïnes SOX (homo o heterodímers) o amb altres factors com l'Oct3/4, el factor esteroidegènic 1 (SF1) o  $\delta$ EF3 [440].

El domini HMG, d'aproximadament uns 80 aminoàcids, es troba format per tres hèlix- $\alpha$  disposades en forma d'L i una cadena  $\beta$ -N-terminal amb un nucli hidrofòbic [441]. En comparació amb la majoria de dominis d'unió al DNA, que interaccionen amb el solc major de la doble hèlix de l'ADN, el domini HMG interacciona amb el solc menor provocant un canvi conformacional de la molècula d'ADN característic de les proteïnes SOX (Figura 24) amb una curvatura de la doble hèlix en un angle que varia entre  $30^\circ$  i  $130^\circ$ , en funció de les condicions de l'estudi, i amb la consegüent ampliació del solc menor [442], [443].



**Figura 24. Domini HMG de SOX9.** Modelat 3D de la predicció estructural del domini HMG del factor de transcripció SOX9.

### 6.3. SOX9

SOX9, juntament amb els factors SOX8 i SOX10, pertany al subgrup de la família SOX E. Els tres components del subgrup estan estructuralment relacionats per la presència de tres dominis conservats: un domini d'auto-dimerització situat a l'extrem N-terminal del domini HMG, i dos dominis de transactivació, un en posició central i l'altre a l'extrem C-terminal. La presència del domini de dimerització i la consegüent formació de complexos entre proteïnes SOX té implicacions funcionals ja que regula l'especificitat de les respostes mediatees per SOX9. Per exemple, la homodimerització de SOX9 és necessària per a l'activació dels gens diana durant la condrogènesi però, en canvi, no ho és durant la determinació del sexe. El domini de transactivació situat a C-terminal és ric en prolina, glutamina i serina i, és necessari per a l'activació dels gens diana. Tanmateix, la funcionalitat del domini de transactivació central s'ha descrit només per a SOX8 i SOX10.

### 6.3.1. Patró d'expressió

SOX9 s'expressa en múltiples teixits durant el desenvolupament així com a l'edat adulta. En el ratolí, durant el desenvolupament del cartílag, SOX9 s'expressa durant la condensació de les cèl·lules osteo-condroprogenitores i en els condrocits en proliferació i diferenciació i és inhibida en els condrocits hipertròfics [444], [445]. Durant la determinació del sexe en vertebrats, SOX9 s'expressa en les cèl·lules mesenquimals diferenciades a la cresta genital. La seva expressió es troba fortament induïda en les gònades masculines mentre que és inhibida en les femenines. De fet, SOX9 s'expressa a les cèl·lules pre-Sertoli del testicle en desenvolupament i, la seva expressió, es manté en les cèl·lules de Sertoli del testicle adult [446], [447]. SOX9 també s'expressa en el desenvolupament de múltiples òrgans de ratolí [445]. D'acord amb aquests resultats, en humans, s'ha comprovat que SOX9 també s'expressa en el desenvolupament de les gònades masculines humanes [448], i en el cartílag fetal [449] i adult [450], així com en una varietat de teixits entre els quals destaquen el cervell, l'intestí, la pròstata i el ronyó entre d'altres.

El seu patró d'expressió espai-temporal està controlat per una regió genòmica de més de 2 Mb que conté diversos elements de regulació conservats que determinen l'especificitat del teixit [451]. S'han descrit diversos factors que modulen la seva expressió com el TGF $\beta$ , que la indueix, o les citocines proinflamatòries TNF $\alpha$  i IL1 $\beta$  que la inhibeixen [452]–[454].

### 6.3.2. Paper fisiopatològic i gens diana

SOX9 és un gen crucial en la condrogènesi i la determinació testicular [445], [447]. De fet, mutacions heterozigòtiques en el gen de SOX9 humà causen la síndrome semi-letal de malformació esquelètica displàsia campomèlica (CD) que, generalment, s'associa amb una inversió del sexe d'home a dona i altres defectes en les estructures derivades de cartílag [449].

Estudis funcionals amb ratolí han descrit que SOX9 regula diverses funcions essencials en la formació del cartílag i la determinació del sexe mitjançant la regulació de diverses funcions cel·lulars com la proliferació, diferenciació i l'apoptosi. Pel que fa a la condrogènesi, SOX9 regula la formació de condensacions de cèl·lules mesenquimals i la diferenciació dels condrocits [455], [456] i, en la determinació del sexe, controla la formació del cordó

testicular i la diferenciació de les cèl·lules de Sertoli [457], [458]. A més, s'ha descrit que participa en el control de diversos aspectes importants durant el desenvolupament i diferenciació de les cèl·lules gials, el cabell, el cor, l'epiteli intestinal, els melanòcits, les cèl·lules de la cresta neural, el notocordi, el pàncrees, la pròstata, l'esfínter pilòric i la retina (Revisat a [459]). No obstant això, la funció de SOX9 en altres òrgans és més redundat i possiblement pot ser compensada per altres membres de la família SOX, especialment pels membres del mateix subgrup E, SOX8 i SOX10, que s'expressen de manera similar [460], [461].

S'han identificat diversos gens diana de SOX9 *in vitro* entre els quals destaquen diversos gens de MEC com els col·làgens tipus 2, 9, 11 i 27 (Col2a1, Col9a1, Col11a2 i Col27a1), l'agrecà (Agc1), la matrilina-1 (Matn-1) i la proteïna oligomèrica de cartílag (Comp), així com gens relacionats amb la determinació testicular com l'hormona anti-mulleiran (AMH) o el SF-1, entre d'altres. Tanmateix, molts no han estat validats en estudis *in vivo*. Fins al moment, els més ben caracteritzats són els col·làgens Col2a1 [462]–[464] i Col11a2 [465], [466], i l'AMH [467], [468]. A banda de la seva funció com a activador transcripcional, s'ha descrit que SOX9 també es pot unir a les regions promotores de C/EBP $\beta$  i C/EBP $\delta$  amb la finalitat de suprimir la seva transcripció i evitar la diferenciació d'adipòcits [469]. El nombre de nous gens diana candidats és probable que vagi creixent tenint en compte les múltiples funcions de SOX9 en una gran varietat d'òrgans i sistemes.

En resum, SOX9 coordina l'equilibri entre el manteniment de les cèl·lules progenitores i la seva diferenciació a diferents tipus de cèl·lules més especialitzades. Aquesta funció reguladora suggereix que una expressió anormal de SOX9 podria ser un factor determinant en desenvolupament de diferents patologies com la fibrosi o el càncer [470]. De fet, s'ha descrit una expressió aberrant de SOX9 en diversos tipus de càncer, tot i que, es desconeix si es tracta d'una relació causal [471]. A nivell vascular es disposa de molt poca informació. SOX9 juga un paper important en el desenvolupament de les vàlvules aòrtiques i en la regulació de la calcificació vascular mitjançant el control de la diferenciació de les CMLV. Tanmateix, hi ha resultats discordants en models experimentals i no s'ha demostrat un increment de SOX9 en lesions calcificades humanes. El control de l'expressió de SOX9 és essencial per al manteniment de la funció contràctil de les CMLV i la prevenció de la seva reprogramació promovent la integritat de la paret vascular [472]–[474].

# OBJECTIUS





La LOX i la FBLN5 són dues proteïnes de MEC essencials en la formació i manteniment de les fibres elàstiques. Ambdues participen en processos fisiopatològics caracteritzats per l'alteració de l'equilibri síntesi/destrucció de la MEC i, en relació al sistema cardiovascular, han estat involucrades en el remodelat vascular, un procés crític en les malalties com l'aterosclerosi, la reestenosi coronària o l'aneurisma d'aorta abdominal. En resposta a una lesió, el remodelat vascular engloba una reorganització de la MEC que fomenta l'activitat migratòria i proliferativa de les CMLV. De fet, anomalies en les propietats biomecàniques de la matriu determinen canvis de fenotip i comportament de les CMLV.

Tot i que gairebé no hi ha estudis, més enllà dels realitzats pel nostre grup, que abordin la implicació de la LOX en el desenvolupament d'aterosclerosi, s'ha suggerit que la modificació del patró d'expressió de la LOX pot estar involucrat en la progressió de la lesió ateroscleròtica. Més enllà de la contribució de la LOX en el manteniment de les propietats tensores i elàstiques del teixit connectiu, estudis recents han descobert noves funcions biològiques d'aquest enzim en el control de l'expressió gènica i en la regulació de la proliferació, migració, adhesió i transformació cel·lular. El paper de la LOX en el control de la funció de les CMLV i la seva contribució a la formació de neointima encara no és prou clar i fins al moment, no s'han desenvolupat estratègies específiques viables que incloguin models animals modificats genèticament dirigits a establir el paper de la LOX en la progressió i estabilitat de la placa ateroscleròtica. La generació d'un model de ratolí transgènic que sobre-exprimeix LOX específicament a CML de la paret vascular, juntament amb l'estudi del model de lligadura d'artèria caròtida, seria de gran ajuda a l'hora d'abordar la caracterització del paper de la LOX en la formació de neointima.

A nivell vascular, la FBLN5 contribueix al manteniment de la integritat dels vasos sanguinis adults, després d'una lesió vascular, evitant un remodelat vascular anormal. De fet, els ratolins *knock-out* per la FBLN5 presenten diverses anomalies vasculares com aortes tortuoses, disteses, fràgils i sense capacitat de resiliència, vasos excessivament ramificats i pressió arterial elevada. El remodelat destructiu de la paret arterial és un procés clau en el desenvolupament de l'AAA. Fins al moment, no es disposa d'eines farmacològiques que limitin la progressió o promoguin la regressió dels AAA ja establerts. El desenvolupament de noves estratègies terapèutiques per a

aquesta patologia és un repte que requereix la caracterització dels mecanismes biològics responsables de la dilatació progressiva i la ruptura final de la paret vascular. Gran part de les estratègies terapèutiques per a aquesta patologia s'han centrat en limitar l'elastòlisi exacerbada i la degradació del teixit connectiu. Degut al fet que l'estabilització de l'elastina podria ser una estratègia efectiva en la limitació de la progressió de l'AAA, preservar l'expressió de la FBLN5 podria protegir la paret arterial de la degeneració vascular inherent a aquesta patologia.

En base a aquests antecedents, ens hem plantejat com a **hipòtesi** de treball que les proteïnes de MEC, LOX i FBLN5 són proteïnes clau en el control de l'homeòstasi vascular i contribueixen al desenvolupament de patologies vasculares com la restenosi i l'AAA a través de la regulació del remodelat vascular i que, per tant, poden constituir noves dianes farmacològiques per a aquestes malalties.

En aquest context, ens hem proposat els següents **objectius**:

- 1- Generar un animal transgènic que sobre-expressi la LOX en CML com a eina per a determinar el paper d'aquest enzim en el desenvolupament de malalties cardiovasculars.
- 2- Avaluar el paper de la LOX en el remodelat vascular induït per la lligadura de l'artèria caròtida.
- 3- Caracteritzar el patró d'expressió de la FBLN5 en l'AAA humà i establir els mecanismes implicats en la seva regulació per estímuls inflamatoris en CMLV.

# METODOLOGIA



## 1- OBTENCIÓ DE MOSTRES DE PACIENTS

Es van recollir mostres de paret abdominal d'aorta aneurismàtica de pacients amb AAA amb elevat risc de ruptura (diàmetre de l'aorta > 5-5,5 cm) diagnosticats i intervinguts al Servei de Cirurgia Vasculard de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau per cirurgia oberta convencional. Com a controls, es van recollir mostres d'aorta no aneurismàtica provinents de donants d'òrgans, gràcies a la col·laboració del Servei de Trasplantaments del mateix hospital. Tant els pacients com els familiars dels donants van signar un document de consentiment informat autoritzant l'ús de les biòpsies o necròpsies amb finalitats científiques. Les mostres es van preservar immediatament per al seu processat posterior per tal d'obtenir RNA i proteïna o realitzar estudis immunohistoquímics.

## 2- EXPERIMENTACIÓ ANIMAL

### 2.1. Manipulació i supervisió dels animals

Els ratolins de la soca C57BL6/J es van mantenir en cicles de 12 h llum / 12 h fosc a una temperatura de  $21 \pm 1$  °C. Els ratolins s'alimentaren *ad libitum* amb una dieta comercial estàndard (2014C Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet, Harlan Iberica SL). La manipulació i sacrifici dels animals es va realitzar segons les directrius establertes per l'*American Physiological Society for Animal Research*. Tots els procediments experimentals han estat aprovats pel Comitè d'Ètica del *Centre d'Investigació Cardiovascular*, tal i com s'estipula a la llei 5/1995 del 21 de juny aprovada per la Generalitat de Catalunya.

#### 2.1.1. Procediment de supervisió del benestar animal

El benestar dels animals es va supervisar sota els següents paràmetres estandarditzats:

##### A. Pèrdua de pes

- 0) Pes normal.
- 1) Menor del 10%.
- 2) Entre un 10 i un 15%.
- 3) Consistent o ràpida, superior a un 20% mantinguda durant 72 h.

### B. Aspecte físic

- 0) Normal.
- 1) Deshidratació, aprimament. Canvis en el color de la pell.
- 2) Pèl “no brillant” o “despentinat”. Pal·lidesa. Cianosi.
- 3) Encorbament. Pèrdua de massa muscular (emaciació).

### C. Manifestacions clíniques

- 0) Cap.
- 1) Hipotèrmia.
- 2) Secrecions mucoses i/o sanguinolentes per qualsevol orifici. Diarrea.
- 3) Distensió abdominal. Volum de líquid ascític superior al 10% del pes corporal inicial. Respiració dificultosa (particularment si va acompanyada de descàrrega nasal i/o cianosi).

### D. Alteracions en la conducta

- 0) Cap.
- 1) Incapacitat de moure's amb normalitat.
- 2) Impossibilitat d'arribar al menjar/beguda. Aïllament de la resta dels animals de la gàbia.
- 3) Inconscient o comatós. Intenció “d'amagar-se” en la viruta, manca de resposta a estímuls.

### E. Ferides

- 0) Cap.
- 1) Esgarrapades.
- 2) Ferides que no cicatritzen.
- 3) Ferides ulceroses que fins i tot poden supurar.

Si es dona la circumstància que hi hagi més d'un paràmetre amb un valor de 3, automàticament tots els 3 passaran a 4. La puntuació obtinguda s'interpreta tal i com s'indica a continuació:

- De 0 a 5 punts: Normalitat.
- De 6 a 10 punts: Possible existència de dolor o angoixa. Cal plantejar-se l'ús d'analgèsia.
- De 11 a 15 punts: Utilització obligatòria d'analgèsia. Cal plantejar-se el sacrifici de l'animal.
- De 16 a 20 punts: sacrifici obligatori de l'animal.

Tots els animals van obtenir puntuacions inferiors a 5. No obstant això, en les primeres hores de recuperació de la intervenció de lligadura de caròtida, s'administraren dosis de record d'atipamezol en casos d'hipotèrmia perllongada o de dificultats de moviment (veure *Metodologia 2.7.*)

## 2.2. Generació d'un model de ratolí transgènic que sobre-expressa la LOX humana en CML

Es va generar un ratolí transgènic dissenyat per dirigir l'expressió del transgèn específicament a CML. El procediment va ser el següent:

### 2.2.1. Construcció del transgèn

La construcció utilitzada per a crear els ratolins transgènics es va generar a partir del plasmidi pCAGGS. El promotor del pCAGGS, actiu en pràcticament tots els tipus cel·lulars de mamífers, es va substituir per la regió proximal del promotor del gen SM22 $\alpha$  de ratolí, que s'expressa abundantment en cèl·lules musculars llises [475], [476]. El promotor es va amplificar per PCR a partir del plasmidi pXP1 (cedit generosament pel Dr. E. Olson, del *Department of Molecular Biology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, EE. UU.*), mitjançant els següents oligonucleòtids:

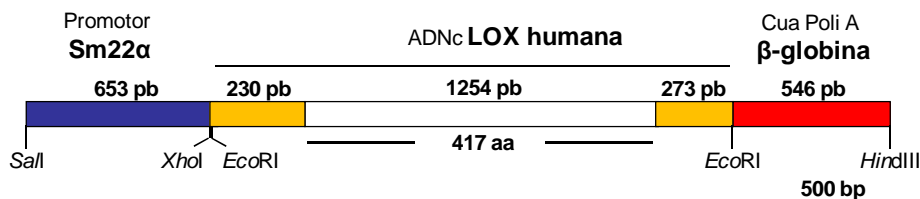
Oligonucleòtids per amplificar el promotor de SM22 $\alpha$		Diana
Sentit	5'-GTCGACATGTTCTGCCACGCACTTGG-3'	<i>Sall</i>
Antisentit	5'-CTCGAGGCTTGGTCGTTTGTGGACT-3'	<i>XhoI</i>

Les dianes de restricció es mostren subratllades.

Els 1734 pb corresponents al promotor del pCAGGS es van eliminar per digestió enzimàtica (*Sall-XhoI*) i es van substituir pel promotor de la SM22 $\alpha$  (653 pb) mitjançant lligació enzimàtica, obtenint el plasmidi **pCAGGS-SM22 $\alpha$** . L'ADNc de la LOX humana es va obtenir per digestió (*EcoRI*) del plasmidi pBlueScript-LOX (cedit generosament pel Dr. Mäki, Universitat d'Oulu, Finlàndia). Finalment, el plasmidi pCAGGS-Sm22 $\alpha$  es va digerir per *EcoRI* i s'hi va clonar l'ADNc de la LOX, obtenint la construcció **pCAGGS-Sm22 $\alpha$ -hLOX** (Fig. 25).

El plasmidi pCAGGS-Sm22 $\alpha$ -hLOX es va linealitzar amb *Sall* i *HindIII* (Fig. X). L'ADN es va aïllar per electroforesi en gel d'agarosa i es va purificar amb el *Gel extraction Kit* de Qiagen.





**Figura 25. Esquema de la construcció a microinjectar per obtenir el transgèn.** En groc s'indiquen les regions no traduïdes. La seqüència de Poli(A), inclosa en el vector pCAGGS, correspon al gen de la  $\beta$ -globina de conill.

### 2.2.2. Generació dels ratolins transgènics TgLOX

La generació d'animals fundadors portadors del transgèn la va dur a terme l'equip del Dr. Jesús Osada (*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Universidad de Zaragoza*) tal i com es descriu a continuació:

L'ADN prèviament digerit i purificat es va microinjectar en el pronucli d'un zigot fertilitzat provinent d'una femella de la soca Balb/c. Amb aquesta tècnica, el transgèn es pot integrar aleatòriament (tant pel que fa al lloc d'inserció com al nombre de còpies) al genoma del ratolí. Els embrions microinjectats viables es transferiren a l'oviducte de varies femelles pseudo-gestants, i així s'obtingué una descendència de la qual es seleccionaren els animals fundadors, és a dir, aquells que tenien el transgèn incorporat al seu genoma. Així, a les 3 setmanes de vida, els ratolins es van genotipar a partir d'un petit fragment de cua (veure apartat 2.2.4.), i es van identificar 4 fundadors. Ja a l'estabulari del *Centre d'Investigació Cardiovascular*, els fundadors es van creuar amb ratolins de la soca C57BL/6J (Charles River) fins a 10 generacions per tal d'obtenir animals transgènics amb un fons genètic C57BL/6J d'una puresa >99,9%. D'aquesta manera es va aconseguir establir 2 famílies (*a i b*), a partir de 2 dels 4 fundadors. Els ratolins es van criar en condicions controlades i en una atmosfera lliure de patògens específics (*SPF, Specific Pathogen Free*). Cal constatar que els ratolins transgènics per a la LOX humana (TgLOX) no presenten cap diferència fenotípica evident amb els seus germans no transgènics.

### 2.2.3. Creuament, cria i identificació dels ratolins

Els ratolins TgLOX es van creuar a partir dels 2 mesos d'edat. Els ratolins transgènics híbrids, preferiblement mascles, es van creuar amb ratolins de la soca C57BL/6J durant 2 setmanes. Passat aquest temps, els mascles es retiraren i les femelles es van deixar soles a les gàbies amb pinso especial per a la cria, més ric i més tou (*2019 Teklad Global 19% Protein Extruded Rodent Diet*, Harlan Iberica SL). Les cries es van deixar fins a 3 setmanes amb les mares, moment en què es van separar en gàbies diferents segons el sexe. Les mares van tenir un període de descans mínim de 2 setmanes abans de tornar-se a creuar. Les cries es mantingueren amb pinso de cria, fins a les 7 setmanes aproximadament, moment en què van passar a consumir la dieta estàndard (*2014 Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet*, Harlan Iberica SL). A les 6-7 setmanes d'edat, els ratolins es van marcar perforant-los les orelles per tal d'identificar-los. El sistema de numeració s'indica a la Fig. 26. Per tal de facilitar la tasca de marcatge i reduir l'estrès dels animals, aquests s'anestesiaren lleument amb isoflurà (un èter halo-genat) moment en què també es va aprofitar per tallar un tros de cua per genotipar.

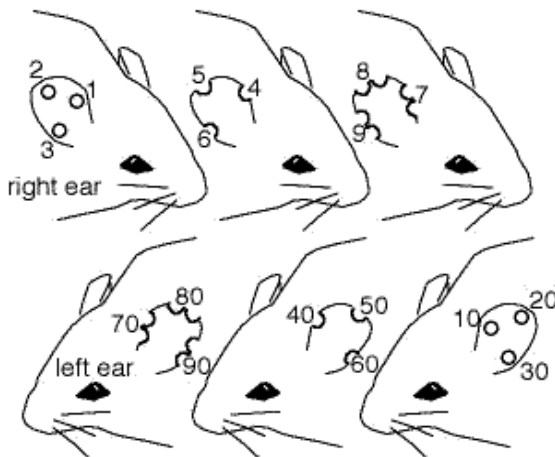


Figura 26. Sistema d'identificació dels ratolins.

### 2.2.4. Anàlisi de l'ADN genòmic

L'ADN genòmic dels ratolins es va aïllar a partir de biòpsies de <0,5 cm de cua segons les instruccions del *DNeasy® Blood & Tissue kit* de Qiagen. L'ADN purificat es va utilitzar per a genotipar els ratolins per PCR, utilitzant els

oligonucleòtids encebadors indicats a continuació, els quals generen un amplicó de 360 pb.

Oligonucleòtids encebadors usats per genotipar		Regió reconeguda
Sentit	5'-GACAGACTGCTCCAACCTGG-3'	promotor SM22α
Antisentit	5'-AGCACGGGTATCTCAGTCTCC-3'	ADNc LOX humana

La reacció de PCR es va realitzar amb la *Taq* polimerasa (Fermentas) amb les següents condicions:

Mescla de reacció de PCR per genotipar:		Cicles:	
ADN	50 ng	95 °C	3 min
dNTP	0,2 mM cadascun	95 °C	1 min
oligonucleòtids encebadors	0,4 μM cadascun	56 °C	1 min x 30
DMSO	3%	72 °C	50 seg
10x <i>Taq</i> Buffer + KCl 500 mM	1 μl	72 °C	7 min
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	4 °C	∞
<i>Taq</i> Polimerasa	0,125 U/μl		
H <sub>2</sub> O q.s.p.	10 μl		

Com a control positiu de la reacció es van amplificar 20 ng del plasmidi pCAGGS-SM22α-hLOX i els productes de PCR es visualitzaren per electroforesi en gels d'agarosa a l'1%.

### 2.3. Mesura de la pressió sanguínia

Es va mesurar la pressió arterial sistòlica amb els ratolins conscients i immobilitzats en un cep. Per tal de minimitzar l'efecte de l'estrès per la immobilització i poder d'obtenir mesures reproduïbles i fiables, els ratolins es van acostumar a la immobilització en el cep durant les setmanes prèvies a la presa de dades. La mesura de la pressió es va realitzar mitjançant un mètode no invasiu que utilitza un maneguet especial que determina la pressió de forma intermitent basant-se en l'oclusió periòdica del flux sanguini de la cua del ratolí (*ML125*, PowerLab). Es van realitzar 10 mesures per cada ratolí i dia durant 3 dies consecutius i a partir de la mitjana d'aquestes dades es va establir el valor de pressió final.

## 2.4. Hemograma

El seguiment del número de cèl·lules blanques en ratolí es va realitzar a partir de 50 µl de sang extrets de la cua de cada ratolí mitjançant columnes d'extracció de sang per capil·lar (*Microvette®*, Sarstedt). Aquestes columnes contenen àcid etilendiamintetraacètic (EDTA), un anticoagulant que no produeix dilució de la sang i respecta la morfologia eritrocitària i leucocitària. Seguidament, la sang es va diluir 1:200 en tampó Mediton i es va obtenir l'hemograma mitjançant un analitzador hematològic de sang total (*Medionic CA620-530*; Boule) que realitza el recompte i distribució per mida de les cèl·lules sanguínies mitjançant el principi d'impedància electrònica. Els resultats obtinguts es van comparar amb els valors de referència (Taula 8) descrits per Charles River tenint en compte la soca, el sexe i l'edat dels ratolins.

**Taula 8. Valors de referència del recompte de cèl·lules blanques per a ratolins de la soca C57BL/6 de 8-10 setmanes.**

C57BL/6		CBT (K/µl)	NEUT (K/µl)	LIMF (K/µl)	MONO (K/µl)	EOS (K/µl)
<b>Mascle</b>	Mitjana	8,90	1,44	6,87	0,41	0,14
<b>Interval 95%</b>	Mínim	4,45	0,53	3,24	0,15	0,01
	Màxim	13,96	3,09	11,15	0,94	0,42
	N	123	123	123	123	123
<b>Femella</b>	Mitjana	8,44	1,19	6,1	0,36	0,15
	Mínim	3,90	0,42	2,88	0,17	0,01
	Màxim	13,94	2,55	10,92	0,69	0,50
	N	125	125	125	125	125
C57BL/6		BASO (K/µl)	NEUT (%)	LIMF (%)	MONO (%)	EOS (%)
<b>Mascle</b>	Mitjana	0,03	15,85	77,41	4,61	1,55
<b>Interval 95%</b>	Mínim	0,00	7,36	61,26	2,18	0,13
	Màxim	0,13	28,59	87,18	11,02	4,42
	N	123	123	121	121	121
<b>Femella</b>	Mitjana	0,03	14,00	79,55	4,37	1,69
	Mínim	0,00	7,44	70,19	2,19	0,20
	Màxim	0,14	22,67	87,82	7,06	4,51
	N	125	125	123	123	123

CBT: cèl·lules blanques totals; NEUT: neutròfils; LIMF; limfòcits; MONO: monòcits; EOS: eosinòfils; BASO: basòfils

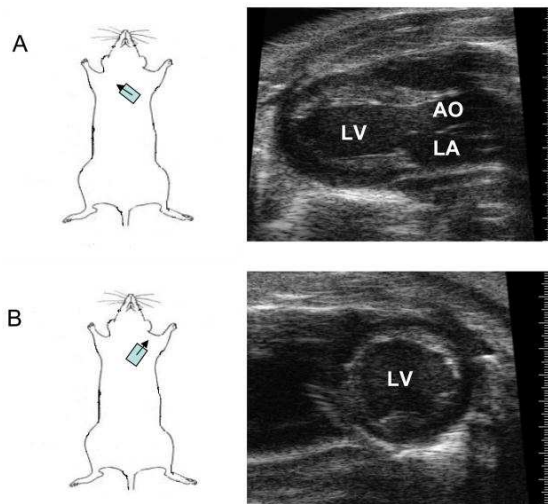
## 2.5. Mesura de lípids en plasma

Es va extreure sang de la cua de ratolins de 8 setmanes d'edat mitjançant les columnes d'extracció de sang per capil·lar prèviament descrites (veure apartat Metodologia 2.4.) (*Microvette® CB-300*, Sarstedt) i el plasma es va obtenir per centrifugació d'aquesta a 3.500 rpm durant 20 minuts a 4 °C. Els nivells de colesterol, triglicèrids i HDL es van mesurar enzimàticament utilitzant kits comercials (reactius Gernon) en un espectrofotòmetre (*MC-15 SOFT*; RAL).

## 2.6. Mesura de paràmetres ecocardiogràfics

El ratolí es va anestesià amb isoflurà al 2% mitjançant una màscara d'inhalació i un cop anestesià, es va depilar la zona ventral del pit amb crema depilatòria ja que la presència de pèl interfereix en la presa d'imatges. El ratolí es va col·locar en posició supina sobre una plataforma temperada per mantenir la temperatura corporal a 37 °C i les extremitats es van mantenir en contacte amb uns transductors d'electrocardiograma per tal de monitorar l'activitat cardíaca. La freqüència cardíaca es va monitorar durant el procés i, de forma general, es va mantenir entre 400-500 batecs per minut. Seguidament es va aplicar gel d'ecografia en el pit depilat del ratolí. L'ecografia del cor del ratolí es va analitzar mitjançant la plataforma d'imatge digital d'alta freqüència i resolució VeVo 2100 (Visual Sonics). Les imatges es captaren amb un transductor lineal (*M400 MicroScan™ Transducer*) i es visualitzaren, en temps real, seccions transversals (de dues dimensions, 2D) a través del cos, on la part superior de la imatge representa la posició més propera a la sonda del transductor, normalment la superfície de la pell [477]. Els diagrames que mostren les posicions i direccions del transductor per a la mesura dels paràmetres ecocardiogràfics bàsics en ratolí es mostren a la Figura 27. L'ecografia bidimensional permet obtenir informació en temps real de la forma, arquitectura, localització i mida de les estructures anatòmiques inclòs d'estructures en moviment, com el cor. En el mode de captació B (mode brillant), la formació d'imatges es realitza de tal manera que la mateixa sonda del transductor emet i rep el feix d'ultrasons i les imatges es mostren en escala de grisos on les estructures més denses s'observen més brillants (blanc) que les estructures que ho són menys (gradient de grisos). En aquest mode, es va col·locar el transductor al llarg de l'eix vertical del ventricle esquerre, i dirigint aquest cap al costat dret del coll del ratolí es va obtenir la imatge de l'eix llarg

del ventricle esquerre en dues dimensions. Seguidament es va girar el transductor 90° en el sentit de les agulles del rellotge per tal de visualitzar l'eix curt del ventricle esquerre i es van obtenir imatges de talls transversals a diferents profunditats a través d'aquest.



**Figura 27.** Diagrames que mostren les posicions i direccions del transductor per a la mesura dels paràmetres ecocardiogràfics bàsics en ratolí. A) Posició i direcció (fletxa petita) del transductor (superior esquerra) per a la visió de l'eix llarg del ventricle esquerre (LV). B) Posició i direcció (fletxa petita) del transductor (superior esquerra) per a la visió de l'eix curt del ventricle esquerre (LV). LA = aurícula esquerra, AO = aorta

Un cop orientat el transductor, es va passar al mode M (mode de moviment) on es seleccionà una sola línia de dades d'ultrasons des de la imatge en mode B que es mostrà com una funció contínua en el temps, amb la profunditat al llarg de l'eix vertical i el temps en l'eix horitzontal (Fig. 27). Les imatges en mode M presenten una alta resolució temporal que permet visualitzar els moviments ràpids de la paret. Per a les mesures de gruix de la paret la línia de mode M es va col·locar just a continuació del múscul papil·lar. A la següent Taula 9 i Figura 28, es mostren les diferents mesures realitzades en mode M, tant al final de la diàstole com de la sístole, així com els paràmetres que es van calcular a partir d'aquestes mesures mitjançant el paquet de mesures cardiovasculars (Visual Sonics)[478]. Un cop obtingudes les imatges, es va retirar el gel residual i el ratolí es va tornar a la gàbia on es va recuperar de l'anestèsia en un temps breu. Es van analitzar 5 ratolins per grup experimental amb 3 captacions per ratolí.

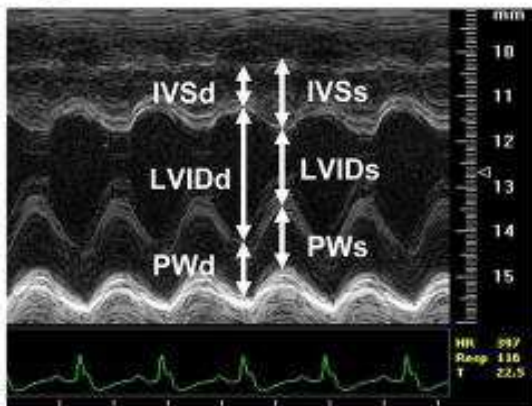


Figura 28. Imatges de les mesures ecocardiogràfiques en ratolí. Imatge representativa presa en mode M amb les indicacions per a la mesura de paràmetres per a avaluar la funció sistòlica.

Taula 9. Mesures ecocardiogràfiques en mode M mitjançant el paquet de mesures cardiovasculars.

Mesures ecocardiogràfiques en ratolí		
LVPWd (mm)	Guix de la paret posterior del ventricle esquerre en diàstole	
LVPWs (mm)	Guix de la paret posterior del ventricle esquerre en sistole.	
IVSd (mm)	Guix de l'envà ventricular en diàstole.	
IVSs (mm)	Guix de l'envà ventricular en sistole.	
LVIDd (mm)	Diàmetre intern del ventricle esquerre en diàstole.	
LVIDs (mm)	Diàmetre intern del ventricle en sistole.	
FS (%)	Escurçament fraccional	$FS(\%)=100 \times [(LVIDd-LVIDs)/LVIDd]$
EF (%)	Fracció d'ejecció	$EF(\%)=100 \times [(LVIDd^3-LVIDs^3)/LVIDd^3]$
LV mass (mg)	Massa ventricle esquerre	$LVmass=1.05 \times [(IVSd+LVIDd+PWd)^3-LVIDd^3]$
Volum sistòlic (µL)		
Despesa cardíaca (ml/min)		

## 2.7. Lligadura de caròtida

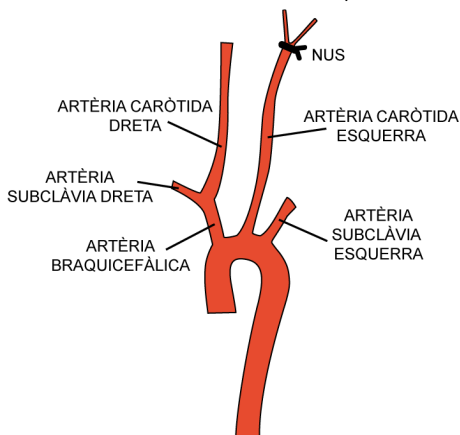
Per al model de lesió arterial per lligadura de caròtida es van fer servir ratolins TgLOX de 4 mesos d'edat i com a control s'utilitzaren els germans no transgènics. Els animals es van mantenir en dejuni durant les 4 h anteriors a l'operació i se'ls administrà intraperitonealment (i.p.) un còctel d'anestèsia (ketamina 45 mg/kg i medetomidina 0,6 mg/kg) i analgèsia (buprenorfina 0,1 mg/kg); la baixada de temperatura corporal es va prevenir amb una manta elèctrica. Se'ls protegiren els ulls de la dessecació amb pomada oftàlmica *Lubrifilm* (Cusi). La cara anterior del coll es va rasurar i desinfectar amb povidona iodada i, un cop els ratolins havien perdut els reflexes, se'ls practicà una incisió d'1 cm al coll (0,5 cm per sota de la boca) i es van separar la pell, les

glàndules i la musculatura que envolten la tràquea amb l'ajuda d'un retractor. A continuació, es va exposar la caròtida esquerra i es va lligar amb un fil de sutura de seda de 7-0 just en el punt anterior de la bifurcació en caròtida interna i externa (Fig. 29). Es lliga la caròtida esquerra perquè així s'aconsegueix un tram sencer d'artèria d'uns 9 mm de llarg on s'hi generarà una lesió per estrès hemodinàmic, ja que la sang que puja amb cada batec des de la crossa aòrtica no té cap via de sortida. No s'utilitza la caròtida dreta, ja que aquesta surt de l'artèria braquicefàlica, de manera que en lligar la caròtida, la sang tindria una via de sortida cap a l'artèria subclàvia dreta, i la lesió generada a la caròtida dreta seria menor que a l'esquerra (Fig. 30).



**Figura 29.** Imatge de l'artèria caròtida esquerra exposada i lligada.

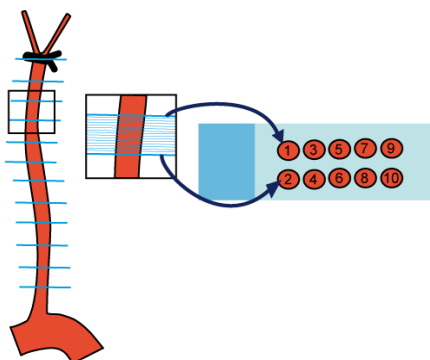
L'obertura practicada en els ratolins es va suturar amb fil de seda de 5-0. A continuació, se'ls administrà artipamezol (1 mg/kg) per via i.p. per tal de recuperar-los de l'efecte anestèsic. Durant les primeres hores posteriors a la cirurgia, es va controlar que els animals es recuperessin adequadament, i en els dos dies subsegüents se'ls va afegir buprenorfina a l'aigua de beguda (1,5 mg/L). Es va extreure 50 µl de sang de la cua dels ratolins abans de la intervenció i a diferents temps (3, 7 i 21 dies) per tal de realitzar el seguiment del número de cèl·lules blanques i obtenir plasma per diferents determinacions.



**Figura 30.** Il·lustració de la crossa aòrtica, les artèries caròtides i el punt de lligadura.



Tres setmanes després de la intervenció, els animals s'anestesiaren (ketamina 75 mg/kg i medetomidina 1 mg/kg) i es sacrificaren per tal de recuperar-ne les artèries caròtides esquerres, les quals es van fixar en paraformaldehid al 4% i es van incloure en blocs de parafina. Es van realitzar talls seriatos (de 5 µm de gruix) de cada artèria, els quals es disposaren en portaobjectes a intervals de 100 µm, des de la constricció ocasionada pel nus i cap a la crossa aòrtica. Els talls es van repartir de manera que cada portaobjecte tingués 10 seccions corresponents a intervals de 100 µm. Finalment, les preparacions es tenyiren amb hematoxilina-eosina. El procediment de fixació i tinció de teixits es detalla a l'apartat 8.3. d'aquesta secció. Finalment, es van captar imatges a 1,4, 1,5 i 1,6 mm a partir del punt de lligadura (el nus) amb el microscopi Olympus Vanox AHB3 a 100 augments, i es van analitzar amb el programa d'anàlisi d'imatge ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). Es va obtenir la quantificació de la llum de les artèries i es va traçar el contorn de les làmines elàstiques internes (LEI) i externes (LEE) en imatges digitalitzades. Per a les anàlisis morfomètriques, a partir del promig de les mesures obtingudes es va calcular l'àrea de la mèdia, l'íntima i la llum del vas per a cada condició. L'àrea de la mèdia es va calcular com l'àrea entre LEE i LEI, i l'àrea de l'íntima es va calcular restant l'àrea de la llum del vas de LEE. El percentatge d'estenosi es va calcular com:  $[\text{àrea de l'íntima} / (\text{àrea de l'íntima} + \text{àrea de la llum del vas})] \times 100$  [479].



**Figura 31.** Il·lustració esquemàtica del procediment seguit en l'obtenció de talls histològics de les mostres de caròtida. En els portaobjectes es van disposar 10 talls corresponents a un espaiat d'uns 100 µm, de manera que amb una preparació es cobria aproximadament 1 mm de mostra.

## 2.8. Tractament farmacològic dels animals

L'estudi *in vivo* de la modulació de l'expressió de la FBLN5 per estímuls inflamatoris a nivell vascular es va realitzar amb ratolins mascles de 8 setmanes d'edat, de la soca C57BL6/J (Charles River). Per a l'estudi, es va administrar als ratolins una dosi de 0,5 mg/kg de LPS (Sigma) per via intraperitoneal. El LPS es va diluir en tampó salí a un volum final de 200 µl i es va administrar el mateix volum de tampó salí sense LPS als ratolins control. En el cas pertinent, es va pretractar el ratolí amb l'inhibidor d'histones desacetilases de classe I, el MS-275 (S1053; SelleckChemicals) a una dosi de 5 mg/kg, 24 h abans de l'administració de LPS i es va administrar una segona dosi de forma simultània al tractament amb LPS. El MS-275 es va resuspendre en DMSO a un volum final de 100 µl. Es va administrar el mateix volum de DMSO sense MS-275 als ratolins control. Després de 24 h de tractament amb LPS, els ratolins es van anestesiari per via intraperitoneal amb una mescla de medetomidina (1 mg/kg) i ketamina (75 mg/kg) en salí (volum final 150 µl). Després de la pèrdua total de reflexes de l'animal, es va extreure sang (aproximadament 1 ml) per punció cardíaca, fet que va causar la mort de l'animal. Seguidament, es van obtenir els òrgans i ràpidament es van congelar, en N<sub>2</sub> líquid, i guardar a -80 °C, fins al seu processament. El greix que recobreix l'aorta es va eliminar completament i es va extreure la totalitat de l'aorta (des de l'arc aòrtic fins a les artèries ilíiaques). Es va aïllar aproximadament 0,5 cm de la zona central de l'aorta per a realitzar estudis immunohistoquímics i la resta es va congelar en N<sub>2</sub> líquid i guardar a -80 °C fins al seu processament. La totalitat del procés va durar menys de 15 min.

## 3. CULTIUS CEL·LULARS

En els nostres estudis s'han utilitzat cultius de cèl·lules musculars llises vasculares murines i humanes. Totes les cèl·lules es van cultivar a 37 °C i 95% d'humitat, 21% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub>. Per tal de mantenir un estoc de cèl·lules, aquestes es van congelar en SFB (sèrum fetal boví) al 7,5% de DMSO, a una densitat de 10<sup>6</sup> cèl·lules/ml.

### 3.1. Obtenció i cultiu primari de CMLV

#### 3.1.1. Obtenció i cultiu primari de CMLV d'aorta murines

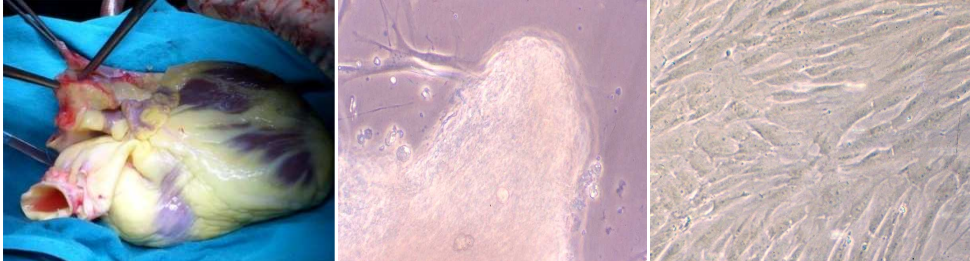
Els ratolins es van sacrificar per dislocació cervical i, amb l'ajuda d'una lupa binocular, es va extreure l'aorta i es va obrir longitudinalment des de la crosseja aòrtica fins a les ilíaqües. Seguidament es va incubar l'aorta amb col·lagenasa del tipus I (Gibco) (150 U/ml) a 37 °C durant 15 min i es va separar la capa mèdia de l'adventícia amb l'ajuda d'unes pinces corbes. La capa mèdia es va seccionar en petits segments (explants) d'aproximadament 1 mm<sup>2</sup>. Els fragments obtinguts es sembraren en 5 ml de medi DMEM-F12 (10% de SFB, 1% d'antibiòtics) en un flascó de 25 cm<sup>2</sup>. Els explants es van deixar en el flascó durant dues setmanes aproximadament, temps durant el qual les cèl·lules van anar migrant dels explants i proliferant.

Les cèl·lules es van recollir amb una solució de tripsina (0,05%) i EDTA (0,02%) (Gibco). Un cop resuspeses en medi, les cèl·lules i els explants, es van deixar reposar una estona per tal que els explants caiguessin per gravetat. El sobrenedant amb cèl·lules es va recollir i centrifugar per tal d'eliminar-ne la tripsina, obtenint les cèl·lules que anomenem en passatge 1. Els explants es van tornar a resuspendre en 2 ml de medi i es van sembrar en un flascó de 25 cm<sup>2</sup> per tal d'obtenir-ne més cèl·lules.

#### 3.1.2. Obtenció i cultiu primari de CMLV d'aorta humanes

Les CMLV humanes utilitzades en aquest estudi provenien d'aortes de pacients trasplantats de cor a la Unitat de Transplantament Cardíac de la Divisió de Cardiologia i Cirurgia Cardíaca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Les cèl·lules es van obtenir al nostre laboratori mitjançant una tècnica d'explants modificada [480]. En condicions d'esterilitat, es va eliminar el greix i el teixit conjuntiu adherit, es va obrir el vas longitudinalment i la superfície interior es va rascar acuradament amb un bisturí per eliminar-ne les cèl·lules endotelials. Amb l'ajuda d'unes pinces corbes, es va separar la capa mèdia de l'adventícia i es va seccionar en petits fragments (explants) d'aproximadament 1 mm<sup>2</sup> d'àrea, que es van col·locar en plaques de cultiu amb medi de cultiu M199 suplementat amb un 20% de SFB, 2% de sèrum humà, 1% d'antibiòtics i 1% de L-glutamina. Els explants es van incubar a 37 °C en una atmosfera humida amb un 21% O<sub>2</sub> i

5% CO<sub>2</sub> i cada 3 dies s'afegí medi fresc. Al cap d'1-2 setmanes les cèl·lules van començar a migrar de l'explant i a proliferar i, un cop van assolir un grau de confluència elevat, es van tripsinitzar i subcultivar.



**Figura 32. Procediment simplificat de l'obtenció de CMLV humanes a)** Cor extret d'un pacient transplantat. **b)** CMLV migrant d'un explant de l'aorta humana. **c)** CMLV confluents en cultiu.

Per a la tripsinització, les cèl·lules es van rentar dues vegades amb PBS prèviament temperat i a continuació es va afegir el volum mínim de tripsina-EDTA (Gibco BRL) per a que tota la superfície quedés coberta. Es van observar les cèl·lules amb el microscopi òptic i quan van començar a separar-se de la superfície de la placa, es va afegir medi complet temperat i les cèl·lules es van resuspendre amb l'ajuda d'una pipeta de 10 ml. Es van comptar les cèl·lules amb l'ajuda d'una cambra de *Neubauer* i es van ressemar en flascons a una densitat de 10.000 cèl·lules/cm<sup>2</sup>. Quan les cèl·lules van arribar de nou a la confluència, es van tornar a tripsinitzar i es van congelar per a una utilització posterior.

### 3.1.2.1. Caracterització de les CMLV humanes

Les cèl·lules es van identificar mitjançant l'observació amb el microscopi òptic en base a la seva morfologia i patró de creixement. La morfologia de les CMLV varia en funció del teixit d'origen, l'edat i l'espècie del donant i el passatge. Les cèl·lules d'artèries sense lesions arterioscleròtiques generalment presenten un aspecte fusiforme i creixement en "*hill and valley*" (muntanya i vall), mentre que les CMLV d'artèries amb lesions presenten fenotips alterats amb aspecte polimòrfic i un creixement desordenat.

Per a una caracterització específica de les CMLV, es va analitzar l'expressió de diferents proteïnes mitjançant immunofluorescència. Per un banda, es van analitzar els nivells d'actina de múscul llis, una proteïna de citoesquelet

característica de les CMLV. Per descartar possibles contaminacions amb fibroblasts i cèl·lules endotelials, es van incubar les cèl·lules amb l'anticòs específic per a la proteïna de superfície de fibroblasts (FSP, *Fibroblast Surface Protein*) i per al factor de Von Willebran (vWF), respectivament.

## 4. CLONATGE, AMPLIFICACIÓ I PURIFICACIÓ D'ADN PLASMÍDIC

En aquest apartat s'exposen els trets generals de la tècnica de clonatge ja que en aquest estudi s'han realitzat diversos clonatges amb diferents objectius i que s'expliquen en els apartats dels procediments experimentals corresponents.

### 4.1. Obtenció de la seqüència a clonar (insert)

Aquesta es va dur terme de dues maneres, segons el cas, que es concreten en:

**a. Per amplificació per PCR**, realitzada amb oligonucleòtids encebadors que contenen dianes de restricció. Les amplificacions es van realitzar amb la polimerasa d'alta afinitat PfU *DNA polymerase* (Fermentas) per tal de minimitzar la introducció d'errors. Els productes amplificats es van purificar amb el *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) i es van digerir segons les dianes de restricció introduïdes en els oligonucleòtids encebadors utilitzats per a l'amplificació.

**b. Per digestió a partir d'una construcció prèvia.** Els productes digerits es van separar per electroforesi en gel d'agarosa i es van purificar amb el *QIAquick Gel extraction Kit* (Qiagen).

Digestió enzimàtica		Condicions de digestió	
Buffer específic	10 %	Temperatura	Temps
ADN	0.5-1 µg	37 °C	1-16 h
Enzim	0.5-2 µl		
H <sub>2</sub> O	Fins a 20 µl		

Es va ajustar la temperatura, el temps de digestió i les concentracions segons les especificacions de cada enzim

## 4.2. Digestió i defosforilació del plasmidi receptor de l'insert

Per tal de generar extrems cohesius on clonar els inserts, els plasmidis es van digerir amb els enzims de restricció pertinents, es van purificar en gel d'agarosa i els extrems 5' lliures generats es van defosforilar per tal de minimitzar el risc de religació del plasmidi sense incorporació d'insert. Es va utilitzar la fosfatasa alcalina CIAP (0,001 U per 10 µg de plasmidi; *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, Invitrogen).

## 4.3. Lligació

La lligació de l'insert en el vector d'interès es va realitzar amb la *T4 DNA Ligase* (1 U/ 10 µl de reacció, Fermentas), incloent 25-50 ng de vector i una quantitat d'insert que, seguint una proporció molar d'insert:plasmidi de 3:1, es calculà segons la fórmula:  $(\text{ng plasmidi} \times \text{kb insert}) / \text{kb vector} \times 3 = \text{ng insert}$

## 4.4 Transformació

Per tal d'amplificar i seleccionar les construccions generades, les lligacions es van transformar en bacteris competents tal i com s'indica en els següents apartats.

### 4.4.1. Preparació de bacteris competents

Aquest mètode va ser descrit per Hanahan el 1985 [481]. En primer lloc es va preparar un precultiu d'*E. coli* (soca DH5α) inoculant 10 µl d'una reserva de bacteris congelats a -80 °C en 10 ml de medi LB en un tub de 50 ml, que es va deixar en agitació a 37 °C tota la nit. L'endemà, s'inocularen 2 ml del precultiu saturat en 50 ml de medi SOB amb 10 mM MgSO<sub>4</sub> (en un *Erlenmeyer* de 250 ml), que s'incubà en agitació orbital a 37 °C fins que s'assolí una absorbància de 0,5 a una longitud d'ona de 650 nm. Aleshores, el cultiu es va transferir a un tub de 50 ml i es va deixar refredar de 10 a 15 min en gel. Seguidament, es centrifugà a 1000 g a 4 °C durant 12 min, i el precipitat que en va resultar es resuspendé en 16 ml de solució RF1 i s'incubà 15 min en gel. La solució es va centrifugar a 1000 g a 4 °C durant 12 min i el precipitat de bacteris es va resuspendre en 4 ml de la solució RF2 i s'incubà durant 15 min en gel. Finalment, s'hi va afegir un 15% de glicerol i els bacteris es van congelar en

alíquotes de 200 µl submergint-les en N<sub>2</sub> líquid. Els bacteris, llestos per ser transformats, es van conservar a -80 °C fins al seu ús.

### 4.4.2. Transformació de bacteris competents amb ADN plasmídic

Les transformacions es van realitzar per xoc tèrmic. Els bacteris competents es van descongelar en gel durant uns 20 min. A continuació, s'hi va afegir l'ADN a transformar (5 µl de lligació, 1 µl de producte de mutagènesi o 1 ng de vector) i es van incubar en gel durant 30 min. Transcorregut aquest temps, se sotmeteren a un xoc tèrmic de 60 seg a 42 °C, seguit de 5 min en gel. Els bacteris es van recuperar amb 800 µl de medi SOC i es van incubar a 37 °C en agitació durant 1 h. Seguidament, es van centrifugar a temperatura ambient (1000 g, 1 min), es van resuspendre en 100 ml de SOC i es van sembrar en Luria Bertain (LB)-agar amb l'antibiòtic adequat per a la selecció. Les plaques s'incubaren a 37 °C tota la nit.

### 4.4.3. Comprovació dels clons

Passades unes 16 h, es va comprovar la presència de colònies i les plaques es van guardar a 4 °C fins al seu ús per tal d'evitar l'aparició de colònies satèl·lits per esgotament de l'antibiòtic de selecció. Les colònies es van picar individualment i s'inocularen en 3 ml de medi LB amb l'antibiòtic de selecció pertinent. El precultiu es va deixar créixer a 37 °C i en agitació tota la nit. L'endemà s'utilitzaren 2 ml de cada precultiu per fer una preparació d'ADN plasmídic (*Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System*, Promega) i comprovar si les construccions eren correctes mitjançant anàlisis de restricció i/o amplificació per PCR. El ml restant es reservà a 4 °C.

### 4.4.4. Purificació d'ADN plasmídic

Un cop identificats els clons correctes, a partir del precultiu reservat es va fer una sembra en estria en LB-agar amb antibiòtic. Es van deixar créixer tota la nit a 37 °C i l'endemà s'inoculà una única colònia aïllada en 5 ml de medi LB amb antibiòtic, i es va fer créixer a 37 °C en agitació durant tot el dia. A última hora del dia, s'inocularen 100 µl del precultiu en 100 ml de medi LB i antibiòtic en un *Erlenmeyer* de 500 ml. El cultiu s'incubà a 37 °C en agitació durant tota la nit. L'endemà, es va recuperar 1 ml de cultiu per preparar un glicerolat (20% glicerol), que es va guardar a -80 °C. La resta es va centrifugar a 3200 g a 4 °C

durant 15 min i el precipitat s'utilitzà per extreure'n ADN plasmídic mitjançant el *QIAfilter Plasmid Midi Endotoxin Free kit* (Qiagen). L'ADN plasmídic obtingut es va comprovar mitjançant electroforesi, anàlisi de restricció, PCR i/o seqüenciació.

## 5. ANÀLISI D'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL

La regulació de l'activitat transcripcional de la FBLN5 en resposta a estímuls inflamatoris es va avaluar mitjançant la transfecció transitòria de CMLV humanes amb un vector reporter que conté el promotor de la FBLN5 acoblat a luciferasa. Estudis de deleccions seriades ens van permetre acotar les regions implicades en aquesta resposta.

### 5.1. Generació de les construccions

El promotor de la FBLN5 o fragments del mateix es van amplificar per PCR. Els paràmetres de reacció de PCR s'optimitzaren segons les característiques dels oligonucleòtids encebadors i la mida del fragment a amplificar. Els productes de PCR es purificaren i es van digerir gràcies a les dianes de restricció incorporades als oligonucleòtids utilitzats per a l'amplificació. A continuació, es van clonar en el plasmidi reporter per a la luciferasa pGL3-Basic (Promega).

#### 5.1.1. Construccions del promotor de FBLN5

Partint d'ADN genòmic de placenta humà (Sigma), es va amplificar un fragment del promotor de la FBLN5 humana de 1650 pb (posicions -1650 a +17, segons el codó d'inici de traducció, ATG) i es van clonar en el vector pGL3-Bàsic usant les dianes de restricció *KpnI* i *XhoI*, obtenint el plasmidi pGL3/pFBLN5-1650. A partir d'aquesta construcció es van generar dues deleccions seriades per amplificació per PCR, obtenint així les construccions pGL3/pLOX-635 i pGL3/pLOX-329. Els oligonucleòtids encebadors usats en cada cas han estat els següents:



Oligonucleòtids encebadors per generar les construccions del promotor de FBLN5		Dianes
Sentit pFBLN5-1650	5'- TTAAGGTACCCCTTTGGTTGCCCTTACTTTATT-3'	<i>KpnI</i>
Sentit pFBLN5-635	5'-GAGTTCGGTACCCCTTTCCTCCGGAGCGCA-3'	<i>KpnI</i>
Sentit pFBLN5-329	5'-TGTAATCGGTACCAGCTGTGTCCAGACTG-3'	<i>KpnI</i>
Antisentit comú*	5'-TAACTCGAGGTCCAAGACGCGCGAGGAGGAGATGCGAA-3'	<i>XhoI</i>

Les dianes de restricció es mostren subratllades. \*S'ha utilitzat el mateix oligonucleòtid antisentit per a les diferents construccions.

## 5.2. Anàlisi de seqüències

Les seqüències dels diferents promotors es van analitzar mitjançant el programa *MatInspector* (Genomatix) per tal d'identificar-hi elements putatius d'unió de factors de transcripció a l'ADN.

## 5.3. Mutagènesi dirigida

La mutagènesi dirigida permet determinar la funcionalitat d'un element de resposta mitjançant la modificació de la seva seqüència nucleotídica. Dos possibles elements d'unió del factor de transcripció SOX presents en els promotor de FBLN5, localitzats a -304 pb i -251 pb des de l'inici de traducció es van mutagenitzar per PCR utilitzant el *QuikChange™ II Site-Directed Mutagenesis kit* (Stratagene). Els oligonucleòtids encebadors usats per mutagenitzar es van dissenyar amb l'ajuda del programa *QuikChange® Primer Design* (Stratagene). Les noves seqüències introduïdes es van comprovar per seqüenciació, i analitzar *in silico* (*MatInspector*) per descartar que no generessin cap nou element.

Les modificacions introduïdes per mutagènesi van seguir el patró descrit per De Santa Barbara et al. per demostrar la funcionalitat de l'element SOX del promotor de l'hormona anti-Müllerian [468]:

Oligonucleòtids usats en les mutagènesis dirigides	
SOX mut -304pb sentit	5'-TTCATTTTCTAAGTATGTTAAACccTGCAAATGGGGCCTCAGCTGG-3'
SOX mut -304pb antisentit	5'-CCAGACTGAGGCCCCATTGCAggGTTTAACTACTTAGAAAAATGAA-3'
SOX mut -251pb sentit	5'-TCAGTAATTCAGCATTTAAACCCcTTGGAGGAGGAATGTTAAAAATGAACACT-3'
SOX mut -251pb antisentit	5'-AGTGTTTCATTTTAAACATTCTCCTCCAAGgGGTTTAAATGCTGAATTACTGA-3'

S'han subratllat els elements putatius. Les minúscules indiquen els canvis introduïts.

## 5.4. Transfecció transitòria i assaig de luciferasa

Els experiments de transfecció és van dur a terme amb *Lipofectamine*<sup>®</sup> LTX amb Plus<sup>™</sup> Reagent (Invitrogen). Les CMLV es van transfectar amb el vector reporter de luciferasa pFBLN5-1650, amb dues deleccions seriades d'aquest (pFBLN5-635 i pFBLN5-329) o amb el vector pFBLN5-1650 mutagenitzat en els diferents elements de resposta SOX.

Les CMLV es van sembrar en plaques de 12 pous (80.000 cèl·lules/pou), i es transfectaren passades 24 h. Per a cada pou, es van diluir 0,5 µg de l'ADN corresponent en 100 µl d'Opti-MEM lliure de sèrum juntament amb 0,5 µl de PLUS<sup>™</sup> Reagent i es va incubar a temperatura ambient durant 10 minuts. Passat aquest temps, es va afegir 1,25 µl de Lipofectamine<sup>®</sup> LTX, es va mesclar suaument i es va incubar 30 minuts a temperatura ambient per tal de facilitar la formació de complexos ADN-liposoma. Les plaques de cultiu es varen rentar amb PBS i es varen afegir 400 µl de medi complet sense antibiòtic a cada pou (M199- 20% SFB). Seguidament, es va afegir la mescla plasmidi/liposoma (100 µl/pou) i es va incubar tota la nit. Passat aquest temps, el medi es va substituir per medi sense sèrum i després de 24 h, les cèl·lules es tractaren amb LPS (100 ng/µl) o TNFα (50 ng/ml) durant 24 h més. Finalment, les cèl·lules es lisaren amb 250 µl de tampó de lisi RLB (*Reporter Lysis Buffer*, Promega). Els lisats es van congelar en N<sub>2</sub> líquid i es van descongelar per tal d'optimitzar-ne la lisi. L'activitat luciferasa es va detectar mitjançant el *Luciferase Assay System* (Promega) i el luminòmetre *Orion I* (Berthold Detection Systems). Els resultats obtinguts es van normalitzar per la concentració de proteïna.

## 6. ANÀLISI D'EXPRESSIÓ

### 6.1. Extracció d'ARN

En la majoria dels casos, l'ARN de cèl·lules es va extreure amb el reactiu *Ultraspec*<sup>™</sup> (Biotecx) seguint el protocol del fabricant. Aquesta tècnica està basada en el mètode de Chomczynski [482], el qual, mitjançant l'ús de sals de guanidina, urea, fenols i cloroform, separa l'ARN en un medi aquós, deixant l'ADN i les proteïnes en una fase orgànica.

Les cèl·lules crescudes en monocapa es van lisar amb *Ultraspec*<sup>TM</sup> (500 µl/10 cm<sup>2</sup>) i es recolliren amb l'ajuda d'un raspador. Les mostres de teixit (100 mg com a màxim) es van triturar en N<sub>2</sub> líquid en un morter de porcellana fins aconseguir una pols fina, a la qual s'hi afegí 1 ml d'*Ultraspec*<sup>TM</sup> i s'homogeneitzà amb l'ajuda d'un politró. Ambdós tipus de lisats es congelaren a -80 °C i es descongelaren per facilitar-ne la lisi. El protocol es continuà segons les especificacions del fabricant.

Alguns procediments experimentals, com els estudis amb siRNAs, van requerir la utilització del sistema d'extracció per columnes *RNeasy Mini kit* (Qiagen) ja que aquest sistema elimina molècules d'ARN de baix pes molecular com els siRNA, els quals poden interferir en l'amplificació per PCR a temps real per determinar els nivells d'ARNm (veure *Metodologia* 6.3.). Aquest sistema es basa en columnes d'afinitat que retenen l'ARN en una membrana de sílice mitjançant tampons amb etanol i concentracions de sal elevades.

Finalment, l'ARN obtingut, resuspès en aigua lliure de RNases, es va mantenir en gel per al seu ús immediat o es va guardar a -80 °C.

### 6.2. Determinació de la quantitat i qualitat de l'ARN

L'ARN es va quantificar segons l'absorbància a 260 nm (1 U.A. = 40 µg ARN), llegida en un espectrofotòmetre (*NanoDrop*, Thermo Scientific). La puresa de l'ARN ve determinada pel quocient 260/280, que per a ser òptim ha de tenir un valor d'entre 1,8 i 2. Per tal d'avaluar la integritat de l'ARN es van realitzar electroforesis en gels d'agarosa a l'1,2% en tampó MOPS i en condicions desnaturalitzants i lliures d'*RNases*. Les mostres s'escalfaren a 65 °C durant 10 min en tampó de càrrega amb bromur d'etidi i es van migrar durant 1 h a 60 V abans d'examinar-les amb llum UV. L'estat de l'ARN es va estimar segons la integritat de les bandes corresponents als ARNr 18S i 28S.

### 6.3. RT-PCR a temps real

La quantificació relativa dels nivells d'ARNm dels gens d'interès es va realitzar per RT-PCR a temps real.

L'ARNm es va retro-transcriure a ADN de cadena senzilla complementària (ADNc) utilitzant el *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems). Aquest mètode utilitza seqüències aleatòries com a oligonucleòtids encebadors (*random primers*) i la transcriptasa reversa

*Multiscribe™*. Les reaccions es van realitzar a partir de 500 ng d'ARN en un volum total de 10 µl de reacció, seguint les instruccions de la casa comercial. L'ADNc s'emmagatzemà a -20 °C fins a l'amplificació per PCR a temps real, que es va realitzar mitjançant el sistema *TaqMan® Gene Expression Assay* i l'equip de detecció ABIPRISM 7000 o 7900HT (Applied Biosystems). Aquest mètode permet mesurar a temps real l'amplificació de productes mitjançant un sistema de dos oligonucleòtids encebadors i una sonda específica per a la seqüència diana. La sonda té un fluorocrom en el seu extrem 3' i una molècula inhibidora o *quencher* en 5' que, per proximitat, bloqueja l'emissió de fluorescència de la primera. La sonda híbrida a la part central de l'amplicó, però no emet fluorescència fins que la polimerasa topa amb ella i la hidrolitza. D'aquesta manera es detecta l'amplificació d'un determinat producte amb una elevada especificitat. A l'Apèndix 1 s'inclou un llistat de les sondes *TaqMan* utilitzades. Les condicions de PCR van ser les següents:

Mescla de reacció per a la PCR a temps real ( <i>Taqman</i> )		Cicles	
ADNc diluït 1/0 (440ng)	8,8 µl	50 °C	2 min
<i>Master Mix (2X)</i>	11 µl	96 °C	10 min
Sonda (25X)	0,88 µl	95 °C	15 seg
H <sub>2</sub> O lliure de nucleases	1,32 µl	60 °C	1 min
<b>TOTAL</b>	<b>22 µl</b>		x 40

En el cas de la quantificació dels nivells d'ADN immunoprecipitats mitjançant ChIP (veure l'apartat de *Metodologia* 13.1.), aquesta es va realitzar per PCR a temps real amb *SYBR-Green* i oligonucleòtids específics (*Apèndix 1*). El *SYBR-Green* és un agent intercalant que s'insereix a la doble hèlix d'ADN i s'acobla energèticament als àcids nucleics que el formen, de manera que s'incrementa notablement la seva taxa d'emissió fluorescent. El complex resultant presenta un pic d'absorció a 498 nm i un pic d'emissió a 522 nm. S'utilitza el *Quantifast™ SYBR® Green PCR kit* (Qiagen) i l'equip de detecció ABIPRISM 7900HT (Applied Biosystems). Les condicions de la PCR s'indiquen a continuació:

Mescla de reacció per a la PCR a temps real ( <i>SYBR-Green</i> )		Cicles:	
ADN (440ng)	8,8 µl	95 °C	10 min
<i>FastStart Universal Mix</i>	11 µl	95 °C	10 seg
Oligonucleòtids encebadors, 20 µM cadascun	0,66 µl	60 °C	30 seg
H <sub>2</sub> O lliure de nucleases	1,54 µl	95 °C	15 seg
<b>TOTAL</b>	<b>22 µl</b>	60 °C	15 seg
		95 °C	15 seg

Corba de dissociació

Per cada 22 µl de reacció es realitzaren dues rèpliques de lectura de 10 µl cadascuna, que es sembraren en plaques de 384 pous. Els resultats es van normalitzar per l'expressió del gen endogen mitjançant una recta patró preparada amb dilucions seriades d'ADNc, o segons el mètode de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## 7. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ PROTEICA

### 7.1. Obtenció d'extractes proteics

#### 7.1.1. Extractes cel·lulars

Les cèl·lules cultivades en monocapa es van rentar 2 cops amb PBS i es van lisar amb tampó de lisi (veure *Apèndix 1*) bullint (80-100 µl/pou 10 cm<sup>2</sup>) amb l'ajuda d'un raspador [483]. El lisat es va congelar a -80 °C, es descongelà per optimitzar-ne la lisi, i es disgregà mecànicament amb l'ajuda d'una xeringa d'insulina. La concentració proteica s'avaluà segons el mètode de l'àcid bicinonínic (BCA) [484] amb el *BCA Protein Assay<sup>TM</sup>* (Pierce). Els extractes proteics es van conservar a -20 °C fins a la seva utilització.

#### 7.1.2. Sobrenedants de cèl·lules en cultiu

Les cèl·lules es van cultivar en medi lliure de sèrum en les condicions indicades. Passats els temps corresponents, es va recollir el sobrenedant (3-5 ml), i es va concentrar en PBS mitjançant columnes d'exclusió (*Amicon Ultra 10.000 MWCO*, Millipore), les quals descartaren les proteïnes amb un pes molecular inferior a 10 kDa. Aquestes columnes permeten concentrar la mostra i realitzar un canvi de tampó en passar-hi un volum total de PBS equivalent a 5 vegades el volum inicial de mostra mitjançant centrifugacions successives. Els sobrenedants es van concentrar fins a un volum d'uns 250 µl. La concentració proteica dels sobrenedants es va quantificar segons el mètode del BCA.

#### 7.1.3. Extractes de teixit

Els teixits congelats es trituraren en N<sub>2</sub> líquid amb un morter de porcellana fins aconseguir-ne una pols fina, que es va recollir en un tub de centrifugació de 2

ml i s'hi va afegir 1 ml de tampó de lisi (amb inhibidors de proteases) (veure *Apèndix 1*) per cada 100 mg de teixit. La mescla s'homogeneïtzà en gel amb l'ajuda d'un politró, es congelà a -80 °C, es descongelà i es centrifugà a màxima potència durant 5 min a 4 °C. El sobrenedant es va recuperar i la concentració de proteïnes solubles es quantificà per BCA.

#### 7.1.4. Secretomes

Es van recollir mostres de paret abdominal d'aorta aneurismàtica de pacients amb AAA intervinguts en el protocol RESAA per cirurgia oberta convencional (n=16) i donants d'òrgans sans (n=12). Tant els pacients com els familiars dels donants van signar un document de consentiment informat i el protocol es va aprovar pel Comitè d'ètica francès (CPB, Cochin Hospital). Les aortes de donants d'òrgans es van obtenir amb l'autorització de l'Agència de Biomedicina Francesa (PFS 09-007). Les mostres de secretoma es van generar mitjaçant la secció del teixit en fragments petits (5 mm<sup>2</sup>) i la seva incubació en medi RPMI 1640 amb antibiòtic i antimicòtic (Gibco) lliure de sèrum, durant 24 h a 37 °C (6 ml/g de teixit humit). El secretoma (sobrenedant que conté les proteïnes alliberades pel teixit) es va obtenir per centrifugació a 3000 g durant 10 min a 20 °C [485]. Les mostres van ser congelades a -80 °C fins a la seva posterior anàlisi per Western Blot.

#### 7.2. Western-blot

Els extractes proteics es van bullir durant 5 min en tampó Laemli i es van separar per electroforesi en gel de poliacrilamida amb dodecil sulfat sòdic (SDS-PAGE) (gels al 7.5-10% d'acrilamida:bisacrilamida 37,5:1) en condicions reductores. Posteriorment, les proteïnes es van transferir a membranes de fluorur de polivinidè (*Immobilon-P*, porus de 0,45 µm; Millipore) en tampó de transferència amb metanol, a 200 mA durant 90 min a 4 °C. Les membranes es van tenyir amb roig Ponceau per tal de comprovar-ne la correcta migració i transferència; l'excés de colorant es va rentar amb aigua destil·lada. A continuació, les membranes es van saturar durant 1 h amb una solució al 5% de llet sense greixos en TBS-Tween 0,05%, i s'incubaren amb els anticossos primaris pertinents (veure *Apèndix 1*) durant 1 h a temperatura ambient i en agitació suau. Després de la incubació amb l'anticòs primari, es van fer 2 rentats

amb TBS-Tween 0,05% (2 cops, 5 min), seguits de 2 rentats més amb TBS (2 cops, 5 min) a temperatura ambient i en agitació. La unió de l'anticòs primari a la proteïna d'interès es detectà mitjançant l'addició d'un anticòs secundari que reconeix les IgG de l'espècie animal on es generà l'anticòs primari (veure *Apèndix 1*). Aquest anticòs secundari està unit a peroxidasa de rave (HRP, *horseradish peroxidase*), de manera que en afegir el substrat adequat (*SuperSignal<sup>TM</sup> West Dura*, Pierce), emet químicoluminiscència, la qual es va detectar mitjançant pel·lícules autoradiogràfiques CURIX RP2 PLUS (Agfa), revelades per procediments fotogràfics estàndards. Es va verificar que la càrrega de proteïna fos homogènia mitjançant la determinació dels nivells de  $\beta$ -actina o de gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH) (veure *Apèndix 1*).

### 7.3. Immunocitoquímica

#### 7.3.1. Detecció fluorescent

Les CMLV es van sembrar a una densitat de  $2 \cdot 10^4$  cèl·lules/pou, en un volum de 90  $\mu$ l, en plaques amb fons de vidre de 12 mm de diàmetre i 0,17 mm de gruix (*Willco Wells B.V.*). Un cop adherides (passades 1-3 h), s'hi va afegir 1,5 ml de medi. Per tal de caracteritzar la regulació de l'expressió de la FBLN5 per estímuls inflamatoris, les cèl·lules es van deixar 24 h en medi complet, després es van incubar durant 24 h en medi de quiescència i passat aquest temps, es van tractar les cèl·lules amb els estímuls inflamatoris corresponents durant 24 h més. A continuació, les cèl·lules es rentaren ràpidament amb PBS (2 cops), i es fixaren amb paraformaldehid al 4% durant 10 min a temperatura ambient. Seguidament es van rentar amb PBS (5 min, 2 cops) i es van permeabilitzar per tal d'analitzar la localització intracel·lular de la proteïna amb una solució de PBS-Tween 0,5% al 0,1% de BSA, que es va deixar actuar durant 30 min a temperatura ambient. A continuació, les preparacions s'incubaren amb solució de bloqueig (PBS al 0,1% de BSA) (15-30 min, 2 cops). Tot seguit, es van incubar amb *Image-IT<sup>TM</sup> FX Signal Enhancer* (Invitrogen) durant 30 min. Després de dos rentats amb PBS, s'hi van afegir els anticòs primaris (veure Taula 10) en solució de bloqueig, i es van incubar durant 1 h a temperatura ambient. Les preparacions es van rentar amb PBS (5 min, 2 cops) i se'ls afegí una mescla amb l'anticòs secundari (veure Taula 10), colorant de Hoechst (1:1000; 33342, Molecular Probes) tot plegat protegit de la llum. Després d'1 h d'incubació, les plaques es van rentar amb PBS (2 cops) i es van muntar amb medi *ProLong<sup>®</sup> gold antifade reagent* (Molecular Probes).

**Taula 10. Anticossos utilitzats en immunocitoquímica amb fluorescència.**

Antigen	Anticòs primari	Dilució	Anticòs secundari	Dilució
FBLN5	ab36611 (Abcam)	1:2000	Anti-IgG de ratolí fet en ase <i>Alexa Fluor 488</i>	1:1000

### 7.3.2. Detecció amb diaminobenzidina.

Les CMLV procedents dels ratolins control i transgènics es van sembrar a una densitat de  $5 \cdot 10^4$  cèl·lules/pou, en cambres Permax® Chamber Slides (*Lab-Tek*®). Per tal de caracteritzar l'expressió de la LOX, les cèl·lules es van deixar 24 h en medi complet i després es van incubar durant 24 h més en medi de quiescència. A continuació, les cèl·lules es rentaren ràpidament amb PBS (2 cops), i es fixaren amb paraformaldehid al 4% durant 15 min a temperatura ambient. Seguidament es van rentar amb PBS (5 min, 2 cops) i es van permeabilitzar per tal d'analitzar la localització intracel·lular de la proteïna amb una solució de PBS/Tritó 0.4 % durant 5 minuts a temperatura ambient. A continuació, les preparacions s'incubaren amb solució de bloqueig (PBS al 1% de BSA) (20-30 min). Després de dos rentats amb PBS, s'hi van afegir els anticossos primaris (veure Taula 11) en solució de bloqueig, i es van incubar durant 1 h a temperatura ambient. Les preparacions es van rentar amb PBS (5 min, 2 cops) i se'ls afegí una mescla amb l'anticòs secundari en solució de bloqueig (veure Taula X). Després d'1 h d'incubació, les plaques es van rentar amb PBS (2 cops) i es van incubar amb una solució de bloqueig de la peroxidasa ( $H_2O_2$  al 3% en PBS) durant 30 min. Posteriorment, es van rentar amb PBS (5 min, 3 cops) i s'incubaren amb el reactiu ABC (Vector Laboratories) durant 30 minuts. Finalment, es van tornar a rentar amb PBS (5 min, 3 cops) i a continuació, les preparacions es van revelar utilitzant diaminobenzidina com a substrat de la peroxidasa (*DAB Substrate*; Roche). La reacció es va aturar amb aigua de l'aixeta. Per acabar es va fer un rentat en aigua destil·lada i les mostres es van muntar en *Glicergel*.

**Taula 11. Anticossos utilitzats en immunocitoquímica amb diaminobenzidina.**

Antigen	Anticòs primari	Dilució	Anticòs secundari	Dilució
LOX	ab31238 (Abcam)	1:1000	Anti-IgG de conill fet en cabra (Dako)	1:200
PCNA	FL-261 (Santa Cruz)	1:1000	Anti-IgG de conill fet en cabra (Dako)	1:200
MYH10	Ab684 (Abcam)	1:500	Anti-IgG de conill fet en cabra (Dako)	1:200



### 7.4. Citometria de flux

Els nivells proteics de la LOX es van analitzar en CMLV procedents de ratolins transgènics TgLOX i d'animals control mitjançant citometria de flux. Les cèl·lules es van fixar i permeabilitzar mitjançant la solució Cytofix/cytoperm, es van rentar amb el tampó Perm/Wash (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) i es van tenyir amb un anticòs policlonal de conill específic per a la LOX (NB100-2527, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) per posteriorment, incubar-les amb un anticòs de cabra contra IgG de conill conjugat amb alofocianina. Per cada mostra es van captar al menys 10.000 esdeveniments mitjançant el citòmetre de flux equipat amb un làser d'argó de 488 nm (EPICS® XL™ Flow Cytometer, Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Es va quantificar la intensitat de fluorescència mitjana (IFM) de cada mostra. Com a control negatiu es van utilitzar les mostres incubades amb la mateixa concentració final de l'anticòs de l'isotip conjugat. Les dades obtingudes es van analitzar amb el programa informàtic Expo32 (Beckman Coulter).

### 7.5. ELISA

Els nivells d'MCP-1 en el plasma del ratolins o en els sobrenedants cel·lulars es va determinar mitjançant ELISA (ELM-MCP1; RayBiotech Inc, Norcross, GA, USA). En els sobrenedants cel·lulars els resultats obtinguts es van normalitzar per la concentració proteica del lisat cel·lular.

## 8. HISTOLOGIA

### 8.1. Processat de les mostres

Les mostres de teixit es van fixar en paraformaldehid al 4% el més ràpid possible després de la seva extracció, i es van incubar durant 24 h a temperatura ambient. La fixació es completà amb 2 banys successius en fixador *Gliofixx* (30 min cadascun). Tot seguit, els teixits es deshidrataven mitjançant 5 banys en etanol absolut (45 min x 5), seguits de 3 banys en xilol (45 min x 3). Finalment, les mostres es van parafinar en 2 banys, d'una hora cadascun, de parafina líquida (60 °C). A continuació, les mostres es van incloure en blocs de parafina i se'n van fer seccions de 5 µm de gruix amb un micròtom, que es van

disposar en portaobjectes prèviament xilanitzats (veure apartat 8.2). L'aigua romanent s'eliminà deixant assecar les preparacions a 40 °C i aquestes es van guardar a temperatura ambient fins al seu ús.

## 8.2. Preparació dels portaobjectes

Per tal de millorar l'adherència dels talls histològics als portaobjectes, aquests es van tractar amb xilà. Els portaobjectes es van rentar un a un amb etanol absolut i es van disposar en cistelles, les quals es van submergir en solució de xilanització (3-aminopropil-trietoxisilà al 2% en acetona) durant 1 h. A continuació, els porta-objectes es van rentar 2 cops amb aigua destil·lada, durant un màxim de 10 min per rentat. Finalment, els portaobjectes es van assecar a 60 °C, i es van mantenir a temperatura ambient fins al seu ús.

## 8.3. Tincions i immunohistoquímica

Les preparacions es van desparafinar amb 2 banys successius en xilol de 7 minuts cadascun per, a continuació, rehidratar-los mitjançant rentats successius amb etanol al 95%, etanol al 70% i aigua destil·lada.

### 8.3.1. Hematoxilina-Eosina

Aquesta tinció permet observar els nuclis en blau i el citoplasma cel·lular en rosa. Les mostres es van tenyir amb Hematoxilina de Mayer durant 5 min, i es van rentar amb aigua de l'aixeta durant 5 min més. A continuació, es van tenyir amb eosina durant 20 seg. i es rentaren amb aigua de l'aixeta 5 min més. Les restes de colorant s'acabaren d'eliminar amb un rentat breu en etanol al 95%. Les preparacions es van rentar en etanol al 70% i es van deshidratar en etanol al 95% i etanol absolut, seguit de dos banys de 3 min en *Histoclear*. Finalment es van muntar amb *Histomount*.

### 8.3.2. Immunohistoquímica

Les preparacions es van sotmetre al procés d'*antigen retrieval* o desemmascarament de l'antigen en un vas *Coplin* amb tampó citrat (pH 6) tot plegat en un bany de vapor a 95-99 °C, durant 20 min. A continuació el vas *Coplin* es va treure del bany i es va deixar refredar a temperatura ambient durant 30 min. Les preparacions es van col·locar en una cambra o suport humit, on es feren totes les incubacions posteriors. Les mostres es van rentar amb PBS (5 min, 2 cops), es van col·locar en un vas *Coplin* i es van incubar amb una solució de bloqueig de la peroxidasa (45 ml metanol + 5 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durant 30 min. De nou en cambra humida, es van rentar amb PBS (5 min, 2 cops) i es van permeabilitzar amb PBS-Tween 1% durant 5 min. Per tal d'evitar unions inespecífiques, les mostres es van bloquejar amb una solució de PBS-Tween 0,1% amb un 10% de sèrum de cabra durant 30 min i a continuació, es bloquejaren per a l'avidina i la biotina amb l'*Avidin/Biotin Blocking Kit* (Vector Laboratories). Per dur a terme aquest bloqueig, en primer lloc es van incubar amb solució d'avidina durant 15 min i es van rentar amb PBS-Tween 0,1% amb un 1% de sèrum de cabra (5 min, 3 cops), després s'incubaren amb solució de biotina (15 min) i es rentaren de la mateixa manera. A continuació, les mostres s'incubaren amb un anticòs primari específic (veure Taula 12) durant tota la nit en agitació suau. Les preparacions es van rentar amb PBS-Tween 0,1% (5 min, 3 cops), i s'incubaren amb un anticòs secundari biotinitat dirigit contra les IgG específiques de l'espècie on s'ha generat l'anticòs primari (dilució 1:200 en PBS-Tween 0,1% a l'1% de sèrum de cabra durant 30 min en agitació suau). Després de 3 rentats de 5 min amb PBS, les mostres es van incubar amb el reactiu *ABC* (Vector Laboratories), i es van tornar a rentar amb PBS (5 min, 3 cops). A continuació, les preparacions es van revelar utilitzant diaminobenzidina com a substrat de la peroxidasa (*DAB Substrate*; Roche), i la reacció es va aturar amb aigua de l'aixeta. Després de fer un rentat en aigua destil·lada, les mostres es van deshidratar i muntar tal i com s'ha indicat anteriorment.

**Taula 12. Anticossos utilitzats en immunohistoquímica.**

Antigen	Anticòs primari	Dilució	Anticòs secundari	Dilució
LOX	ab31238 (Abcam)	1:200	Anti-IgG de conill fet en cabra (Dako)	1:200
PCNA	FL-261 (Santa Cruz)	1:1000	Anti-IgG de conill fet en cabra (Dako)	1:200
MYH10	Ab684 (Abcam)	1:500	Anti-IgG de conill fet en cabra (Dako)	1:200
MCP-1	Sc-1304 (Santa Cruz)	1:1000	Anti-IgG de conill fet en cabra (Dako)	1:200
FBLN5	Ab66339 (Abcam)	1:250	Anti-IgG de conill fet en cabra (Dako)	1:200

Les imatges dels talls histològics es van captar per microscòpia òptica mitjançant un microscopi Olympus Vanox AHB3 acoblat a una càmera digital Sony DXC-S500, i es van processar amb el programa *Visilog S.M.* (Noesis).

## 9. SOBRE-EXPRESSIONIÓ PROTEICA EN CÈL·LULES EN CULTIU MITJANÇANT TRANSDUCCIÓ LENTIVIRAL

### 9.1. Clonatge en el vector lentiviral

Per tal d'estudiar l'efecte de la sobre-expressió de LOX o SOX9 en CMLV humanes, es va clonar l'ADNc de la LOX humana o de SOX9 murí en el vector d'expressió lentiviral pLVX-Puro, i se'n produïren partícules lentivirals mitjançant el sistema *Lenti-X<sup>TM</sup> Lentiviral Expression System* (Clontech). Aquest mètode permet la integració dels transgens al genoma de les cèl·lules infectades. Com a controls, també s'obtingueren partícules virals a partir del vector pLVX-Puro buit o amb l'ADNc de la proteïna verda fluorescent (GFP).

El sistema de sobre-expressió mitjançant transducció lentiviral desenvolupat per Clontech inclou un vector d'expressió (pLVX-puro) que conté les seqüències LTR (Long Terminal Repeats) necessàries per a la integració del transgèn al genoma de la cèl·lula diana, així com una seqüència d'empaquetament  $\psi$ . A més, presenta un MCS (*Multi Cloning Site*) amb diferents dianes de restricció que permeten clonar el gen d'interès sota el control del promotor de citomegalovirus (CMV). Finalment, el plasmidi pLVX-puro presenta un gen de resistència a la puromicina, l'antibiòtic utilitzat per a la selecció de les cèl·lules infectades (Fig. 33).

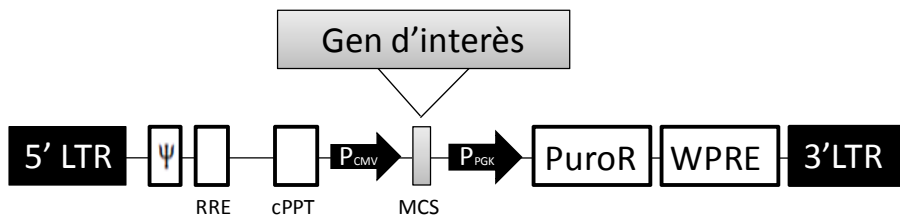


Figura 33. Esquema del vector pLVX-puro.

L'ADNc de la LOX humana es va amplificar a partir del vector pBlueScript-LOX, cedit generosament per el Dr. Mäki (Universitat d'Oulu, Finlàndia), mitjançant els oligonucleòtids encebadors indicats a continuació, i es va clonar en el vector pLVX-Puro en *Bam*HI.

Oligonucleòtids encebadors per a amplificar l'ADNc de la LOX humana		Dianes
Sentit	5'-CAAAGGATCCATGCGCTTCGCCTGGACCG-3'	<i>Bam</i> HI
Antisentit	5'-GCTTGGATCCTAATACGGTGAAATTGTGCAGCC-3'	<i>Bam</i> HI

Les dianes de restricció es mostren subratllades.

L'ADNc de SOX9 murí es va amplificar a partir del vector pWPXL-Sox9 (Addgene), cedit generosament pel Dr. Weinberg (WhiteHead Center, Cambridge), mitjançant els oligonucleòtids encebadors indicats a continuació, i es va clonar en el vector pLVX-Puro en *Xho*I-*Bam*HI.

Oligonucleòtids encebadors per a amplificar l'ADNc de laSOX9 de ratolí		Dianes
Sentit	5'-ATATCTCGAGATGAATCTCCTGGACCCCTTC-3'	<i>Xho</i> I
Antisentit	5'-TACTGGATCCTCAGGGTCTGGTGAGCTGT-3'	<i>Bam</i> HI

Les dianes de restricció es mostren subratllades.

## 9.2. Producció de lentivirus

Com a cèl·lules empaquetadores de partícules víriques s'utilitzaren cèl·lules HEK 293T, que es sembraren en plaques de 100 mm de diàmetre ( $4 \cdot 10^6$  cèl·lules/placa). L'endemà, les cèl·lules es transfectaren amb els plasmidis pLVX corresponents mitjançant fosfat de calci, segons les especificacions del *Lenti-X<sup>TM</sup> Lentiviral Expression System* (Clontech), juntament amb una mescla de plasmidis proveïda pel *kit*, els quals codifiquen les proteïnes víriques necessàries per a la producció de virus. Amb aquest sistema, les cèl·lules HEK 293T produeixen virus amb capacitat infectiva però no replicativa, de manera que les cèl·lules diana incorporen el transgèn però no produeixen virus. Les cèl·lules transfectades s'incubaren durant 48 h, moment en què es recollí el sobrenedant (portador de partícules víriques), es filtrà per eliminar-ne les cèl·lules mortes, i s'aliquotà en vials de criocongelació per emmagatzemar a -80 °C fins al seu ús.

### 9.3. Determinació de la concentració de puromicina i polibrè

El vector d'expressió lentiviral incorpora un gen de resistència a puromicina, un antibiòtic inhibidor de la síntesi proteica, que permet seleccionar les cèl·lules infectades. La concentració de puromicina adequada varia segons el tipus cel·lular i cal ajustar-la per tal de seleccionar eficientment les cèl·lules infectades. Amb aquest objectiu, es tractaren CMLV humanes i cèl·lules HeLa amb diferents concentracions de puromicina, i es seleccionà, per a cada tipus cel·lular, aquella concentració que va provocar la mort cel·lular massiva (70-80%) en les primeres 24-48 h, i la mort de totes les cèl·lules als 3-4 dies. Per a les CMLV fou de 1,2 µg/ml, i per a les HeLa de 0,8 µg/ml.

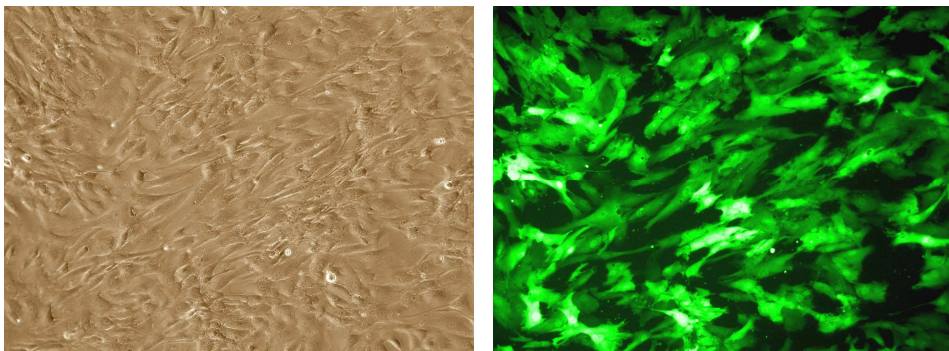
També es va determinar la concentració òptima de polibrè (bromur d'hexadimetrina), un polímer catiònic que neutralitza les càrregues que provoquen la repulsió entre virus i cèl·lula i, per tant, millora l'eficiència d'infecció. Per a les CMLV, es va determinar una concentració d'ús de 8 µg/ml.

### 9.4. Titulació

Un cop produïdes les partícules víriques, se'n va calcular la capacitat infectiva o títol viral mitjançant la infecció de cèl·lules HeLa amb un banc de dilucions dels sobrenedants amb virus i posterior selecció per puromicina, tal i com s'indica al protocol de la casa comercial. D'aquesta manera, s'obtingué un valor de *cfu* (*colony forming units*) per a cada producció vírica, el qual s'utilitzà per calcular el volum de virus necessari per infectar cèl·lules amb una MOI (*Multiplicity of Infection*) determinada, essent la MOI el nombre de partícules víriques/cèl·lula.

### 9.5. Transducció de CMLV

Les CMLV es van sembrar en plaques de 100 mm de diàmetre (600.000 cèl·lules/placa) i es van infectar amb els diferents lentivirus amb una MOI=15 amb 8 µg/ml de polibrè, tal i com indica la casa comercial. Passades 24 h, el medi amb virus es va substituir per medi complet, i les cèl·lules s'incubaren 24 h més abans d'afegir-hi puromicina (1,2 µg/ml). La selecció de cèl·lules infectades es va realitzar durant una setmana, i l'eficiència de la infecció es va poder avaluar visualment en les cèl·lules transduïdes amb pLVX-GFP (Fig. X).



**Figura 34. Imatge representativa de CMLV transduïdes amb el vector lentiviral per a la GFP.** Les CMLV es van infectar durant 24 h amb el lentivirus generat a partir del vector pLVX-GFP, i les cèl·lules transduïdes es seleccionaren amb puomicina (1,2 µg/ml, 5 dies). Es mostren imatges del mateix camp preses amb microscòpia òptica (panell esquerre) o microscòpia de fluorescència (panell dret).

## 10. SILENCIAMENT DE L'EXPRESSION GÈNICA MITJANÇANT siRNA

Un siRNA (*small interfering RNA*, o ARN d'interferència) és una molècula d'ARN de 20 a 25 nucleòtids dissenyada per a bloquejar específicament l'ARNm d'un gen en concret, interferint així en la seva expressió. Els siRNA, dirigits contra HDAC1, HDAC2 o HDAC3, o bé els seus controls corresponents (amb seqüències a l'atzar, siRAND), indicats al final d'aquesta secció, es van introduir en les CMLV mitjançant electroporació (o nucleofecció) utilitzant l'equip *Nucleofector*<sup>TM</sup> d'Amaxa i el l'*Amaxa*<sup>®</sup> *Smooth muscle cells Nucleofector*<sup>®</sup> *Kit* (Lonza), segons les indicacions de la casa comercial. Cada electroporació es va dur a terme amb 10<sup>6</sup> cèl·lules i 1 µg de siRNA mitjançant el programa A-033 del *Nucleofector*<sup>TM</sup>. Just després de l'electroporació, les cèl·lules es van resuspendre en 1,5 ml de medi temperat i es van repartir en 3 pous d'una placa de 6 (aproximadament 330.000 cèl·lules/pou) que contenen 1,5 ml de medi de cultiu. Passades 24 h, les cèl·lules es van incubar en medi reduït en sèrum (0,4% SFB) durant 24 h i passat aquest temps es van tractar amb els estímuls inflamatoris corresponents durant 24 h. El bloqueig de l'expressió gènica es va comprovar per PCR a temps real.

### siRNAs utilitzats per al silenciament gènic:

siRANDOM	ID#AM4611; Ambion
siHDAC1	ID#573; Ambion
siHDAC2	ID#s6493; Ambion
siHDAC3	ID#s16878; Ambion

## 11. ANALISI DE L'ACTIVITAT LISIL OXIDASA

L'activitat enzimàtica LOX es va mesurar mitjançant un assaig fluorescent d'alta sensibilitat basat en la mesura de la producció de  $H_2O_2$ , un subproducte de la reacció enzimàtica que catalitza la LOX. En la cèl·lula hi ha altres fonts d'aquest compost i per tant la mesura de l'activitat específica LOX s'obté mitjançant la incubació de les mostres en presència i absència de 500  $\mu\text{mol/l}$  de BAPN, un inhibidor específic de l'activitat LOX. Així, les diferències entre les mesures obtingudes per una mateixa mostra, sense i amb BAPN, corresponen a l'activitat específica de la LOX. Les CMLV es van sembrar a una densitat de 150.000 cèl·lules per pou en una placa de 6 pous i es van deixar créixer durant 48 h. Passat aquest temps, el medi de cultiu es va reemplaçar per medi RPMI lliure de *Phenol red* (Gibco) sense SFB, antibiòtics ni glutamina. Passades 24 h, es va recollir el sobrenedant, es va centrifugar per eliminar les restes cel·lulars i es va procedir a la mesura de l'activitat LOX. Una al·lquota de 50  $\mu\text{l}$  de sobrenedant es va incubar en presència i absència de 500  $\mu\text{mol/l}$  de BAPN a 37 °C durant 30 min amb 1 U/ml de peroxidasa horseradish i 10  $\mu\text{mol/l}$  1,5-diaminopentà com a substrat en 1,2 mol/l d'urea, 0,05 mol/l de borat sòdic pH 8.2. Passat aquest temps es va aturar la reacció en gel i es van determinar les diferències en la intensitat de la fluorescència entre mostres amb i sense BAPN (longitud d'ona d'excitació 563 nm; longitud d'ona d'emissió 587 nm).

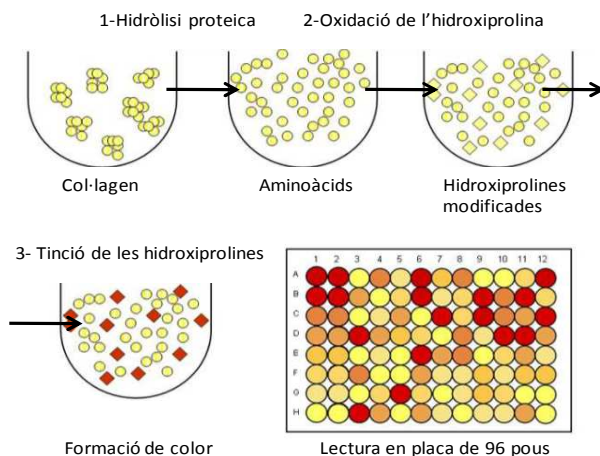
## 12. QUANTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DEL CONTINGUT DE COL·LAGEN

### 12.1. Quantificació del col·lagen total

El contingut de col·lagen total a l'aorta dels ratolins es va mesurar mitjançant el kit comercial *QuickZyme col·lagen* (*QuickZyme Biosciences*, Leiden, The Netherlands) seguint les indicacions del fabricant. De forma breu, el mètode es basa en la detecció de la hidroxiprolina, un aminoàcid no proteínogènic només present a la triple hèlix del col·lagen. Així, la mesura d'hidroxiprolina en hidrolisats de mostres de teixit es va utilitzar com a mesura indirecta de la quantitat de col·lagen total sense discriminar entre els diferents tipus de col·lagen o el grau de maduresa. Les aortes dels ratolins es van hidrolitzar en àcid clorhídric 6 M a 95 °C durant 20 h per tal d'alliberar els diferents



aminoàcids. Posteriorment es van quantificar els nivells d'hidroxiprolina per un mètode colorimètric que es basa en una modificació del mètode descrit per Prockop [486]. Els resultats es van determinar com a  $\mu\text{g}$  de col·lagen per mg de teixit sec.



**Figura 35.** Esquema representatiu del mètode colorimètric de mesura del contingut de col·lagen.

## 12.2. Anàlisi del grau d'entrecreuament del col·lagen: Tinció amb vermell siri

La tinció amb vermell siri és selectiva per al col·lagen i permet diferenciar el grau d'entrecreuament de les fibres sota llum polaritzada, podent extrapolar el grau de maduresa d'aquest. Quan s'observen les preparacions a través de llum polaritzada apareix un gradient de color que depèn del gruix de la fibra; a mesura que augmenta l'entrecreuament del col·lagen el color canvia de verd/groc (fibres poc entrecreuades) fins a taronja/vermell (fibres molt entrecreuades).

Les preparacions de les caròtides, lligades i contralaterals, es van desparafinar amb 2 banys successius en xilol de 7 minuts cadascun. A continuació es van rehidratar mitjançant etanol absolut, de 95% i de 70% i aigua destil·lada, realitzant dos banys successius de 3 min en cadascuna de les solucions. Les restes d'etanol s'eliminaren amb aigua de l'aixeta, abans de realitzar l'últim bany de 5 min en aigua destil·lada. Seguidament, les preparacions es van tenyir amb la solució de Vermell Siri durant 1 hora. Passat aquest temps, les

preparacions es van rentar dues vegades durant 3 minuts amb aigua d'àcid acètic i es van deshidratar mitjançant etanol al 80%, etanol al 95% i etanol absolut seguit de xilol, realitzant dos banys successius de 3 min en cadascuna de les solucions seguit de dos banys de 3 min en *Histoclear*. Finalment es van muntar amb *Histomount*.

### 12.3. Assaig de polimerització del col·lagen

Per tal d'avaluar la capacitat del sobrenedant de les CMLV procedents dels ratolins TgLOX per modificar el grau d'entrecruament del col·lagen *in vitro*, s'obtingueren CML d'aorta de ratolins TgLOX de les 2 famílies (a i b) i de ratolins control, de 2 mesos d'edat, tal i com es detalla a l'apartat *Metodologia* 3.1.1. Les CMLV, en passatge 2, es van sembrar a raó de 50.000 cèl·lules/pou en placa de 6. Passats 7 dies, se'ls canvià el medi, que es va recollir passats 3 dies. Els sobrenedants es van centrifugar per tal d'extreure'n les cèl·lules mortes i es van concentrar 4 vegades mitjançant columnes d'exclusió (*Amicon Ultra*, 10 kDa; Millipore). Es van pre-incubar 150 µl de col·lagen de tipus 1 neutralitzat (BD Biosciences) durant 40 min a 37 °C en plaques amb fons de vidre (*Willco Wells B.V.*). Un cop gelificat, es van afegir 400 µl del medi de cultiu concentrat sobre el gel i tot plegat es va mantenir en l'incubador a 37 °C durant 24 h més. Passat aquest temps, les preparacions es van observar per microscòpia de reflexió en un microscopi confocal, i les fibres de col·lagen es van captar realitzant seccions en Z [329].

## 13. ANÀLISI D'UNIÓ PROTEÏNA-ADN

### 13.1. Immunoprecipitació de cromatina (ChIP)

Aquest mètode permet analitzar la interacció de determinats factors de transcripció i altres proteïnes a una regió de l'ADN *in vivo*. Per tal d'avaluar tant la unió de SOX9 com el reclutament de la Histona H3 acetilada al promotor de la FBLN5, es va fer servir el següent procediment:

Es van sembrar CMLV en plaques de 100 mm de diàmetre ( $3 \cdot 5 \cdot 10^6$  cèl·lules/placa) i, passats 3 dies, es van mantenir en medi sense sèrum durant 48 h. A continuació, les cèl·lules es van tractar amb LPS (100 ng/ml) o TNF $\alpha$  (50 ng/ml) durant 24 h més. Seguidament, les cèl·lules es van fixar en formaldehid a l'1% durant 10 min. Aquest procés fixa la unió de les proteïnes a l'ADN. La fixació es va aturar afegint-hi glicina a una concentració final de 125 mM durant 5 min a temperatura ambient. Les CMLV es van rentar i recollir en PBS fred amb l'ajuda d'un raspador. Durant tot el procés, les mostres es van mantenir a 4 °C i en presència d'un còctel d'inhibidors de proteases (CIP). Els tubs es van centrifugar durant 5 min a 1250 g a 4 °C, i el *pellet* es va resuspendre en 500  $\mu$ l de tampó de lisi LB1 per lisar les membranes cel·lulars. Les mostres es van incubar 10 min més a 4 °C, es van centrifugar 5 min a 1350 g a 4 °C i el *pellet* es va resuspendre en 500  $\mu$ l del tampó LB2 per tal d'eliminar-ne detergents. Finalment, les mostres es van tornar a incubar 10 min a 4 °C amb agitació suau, es van centrifugar a 1350 g a 4 °C i el *pellet* es va resuspendre en 300  $\mu$ l de tampó LB3 per tal de lisar els nuclis.

LB1 (lisi de membrana cel·lular):			LB2 (eliminació de detergents):		LB3 (ruptura de nuclis):	
Hepes-KOH	pH	50 mM	Tris-HCl pH 8.0	10 mM	Tris-HCl pH 8.0	10 mM
NaCl		140 mM	NaCl	200 mM	NaCl	100 mM
EDTA		1 mM	EDTA	1 mM	EDTA	1 mM
Glicerol		10%	EGTA	0,5 mM	EGTA	0,5 mM
NP40		1%	CIP	1%	Na-Deoxtcholate	0,1%
Tritó X-100		0,3%			N-Lauroylsarcosine	0,5%
CIP		1%			CIP	1%

En aquest mateix tampó, el lisat es va sonicar a 4 °C en unes condicions prèviament optimitzades per a aquest tipus cel·lular i el sonicador *Bioruptor*<sup>TM</sup> UCD-200 (Diagenode) que permeten obtenir fragments d'ADN entre 200 i 500 pb: 2 cicles de 15 min (alternant 30 s en marxa i 30s apagat) amb una intensitat

mitja. A continuació, es va afegir Tritó X-100 (concentració final 1%) i les mostres es van centrifugar durant 10 min a 14.000 rpm a 4 °C. El sobrenedant que conté la cromatina fragmentada es va congelar a -20 °C fins al seu ús.

A continuació es van rentar 50 µl de boles d'agarosa acoblades a proteïna A (Millipore). Es van resuspendre 50 µl de boles en 950 µl de PBS i es van centrifugar a 1000 g durant 1 min. Es va repetir aquest rentat 3 cops i finalment, es van resuspendre en 900 µl de tampó de dilució.

Tampó de dilució	
Tris-HCl	16,7 mM
NaCl	167 mM
EDTA	1,2 mM
Tritó X-100	1%
SDS	0,01%
CIP	1%

A continuació es van diluir 100 µl de la cromatina sonicada en els 900 µl de tampó de dilució que contenien les boles d'agarosa i es va incubar durant 30 min a 4 °C en agitació. Aquest pas permet reduir les possibles interaccions inespecífiques generades per les boles d'agarosa. A continuació, els tubs es van centrifugar a 1000 g durant 1 min i es va recollir el sobrenedant. En aquest moment es va recollir un 5% de la mostra (50 µl) que es van utilitzar com a "input" (que serveix com a referència de la quantitat de material de partida). Als 950 µl restants es va afegir 5 µg de l'anticòs dirigit específicament contra la proteïna que es vol immunoprecipitar o la mateixa quantitat d'una IgG inespecífica de l'espècie en què s'ha generat l'anticòs que servirà com a control negatiu. Es va incubar la mescla durant 16 h a 4 °C en rotació. El dia següent, es van rentar 50 µl de boles d'agarosa acoblades a proteïna A com s'ha descrit anteriorment i es van afegir a les mostres. La mescla es va incubar durant 60 min a 4 °C en rotació, temps necessari per a que l'anticòs s'uneixi a les boles d'agarosa. Passat aquest temps, es van centrifugar els tubs (1000 g, 1 min, 4 °C) i es va descartar el sobrenedant.

El *pellet* que contenia els complexos anticòs/proteïna/ADN acoblats a les boles d'agarosa A es va rentar durant 5 min a 4 °C en agitació suau de forma successiva amb els següents tampons: tampó de rentat de baixa concentració en sals, tampó de rentat d'alta concentració en salts, tampó de rentat de LiCl i finalment tampó TE 1X.

1- Tampó de rentat baix en sals		2- Tampó de rentat concentrat en sals	
SDS	0,1%	SDS	0,1%
Tritó X-100	1%	Tritó X-100	1%
EDTA	2 mM	EDTA	2 mM
Tris-HCl pH 8,0	20 mM	Tris-HCl pH 8,0	20 mM
NaCl	150 mM	NaCl	500 mM

3- Tampó de rentat LiCl		4- Tampó TE	
LiCl	0,5 M	Tris-HCl pH 8,0	10 mM
NP40	1%	EDTA	1 mM
Deoxycholate	1%		
EDTA	1 mM		
Tris-HCl pH 8,0	20 mM		

Entre cada rentat, les mostres es van centrifugar a 1000 g durant 1 min a 4 °C i es descartava el sobrenedant. Després de l'últim rentat, el *pellet* es va resuspendre en 200 µl de tampó d'elució (SDS 1%, NaHCO<sub>3</sub> 100 mM) i es va incubar durant 15 min a 65 °C en agitació. El mateix es va fer amb les mostres "input", que s'havien separat prèviament, seguint el mateix protocol, a partir d'aquest punt, de forma paral·lela a totes les mostres. Es van centrifugar els tubs a 14.000 rpm durant 1 min i es va recuperar el sobrenedant.

Per tal de revertir la unió entre proteïna i ADN, es van afegir 8 µl de NaCl a 5 M (concentració final de 200 mM) i es van incubar les mostres durant 4 h a 65 °C en agitació. A continuació, es va afegir a cada mostra 8 µl de Tris-HCl pH 6,5 a 1 M, 4 µl d'EDTA a 0,5 M i 0,8 µl de Proteinasa K a 10 mg/ml, i es va incubar la mescla durant 1 h a 45 °C. Finalment l'ADN es va purificar mitjançant extracció per columna (*PCR purification kit*, Qiagen) i es va eluir en un volum final de 30 µl.

La quantificació de l'ADN immunoprecipitat es va realitzar per PCR convencional o per PCR a temps real segons el mètode de *SYBR-Green* (veure *Metodologia* 6.3.). Es van dissenyar oligonucleòtids encebadors específics per amplificar la regió del promotor de *FBLN5* desde -353 fins a -204 pb (respecte a l'ATG):

Oligonucleòtids encebadors per amplificar el gen <i>FBLN5</i> en els estudis de ChIP	
Sentit	5'-TTGGTGAGCGCTGTAATCT-3'
Antisentit	5'-AGAGGGCTAAGCAAACCA-3'

L'abundància relativa de les seqüències específiques en l'ADN immunoprecipitat es va determinar utilitzant el mètode del  $\Delta\Delta Ct$ . Les quantificacions es van corregir tenint en compte que el material immunoprecipitat corresponia a un 5% de l'*input*.

## 14. ANÀLISI DE LA PROLIFERACIÓ DE CMLV

### 14.1. Recompte cel·lular

Les CMLV es van mantenir en cultiu en condicions estàndards durant 72 h i passat aquest temps, es van tripsinitzar i comptar mitjançant el Multisizer™ 3 Coulter Counter® (Beckman Coulter).

### 14.2. Determinació de la síntesi d'ADN

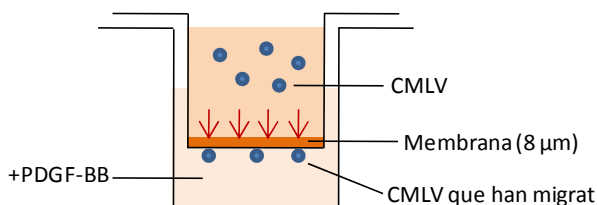
Per tal de determinar l'índex d'activitat mitogènica de les CMLV vam mesurar la síntesi *de novo* d'ADN determinada mitjançant l'assaig d'incorporació de timidina tritiada a l'ADN. Les CMLV es van sembrar en plaques de 24 pous i es van deixar créixer fins a subconfluència. Seguidament, les cèl·lules es van cultivar amb medi pobre en factors de creixement (0,2% de SFB) durant 24 h, i passat aquest temps, s'estimularen amb medi complet (20% SFB) moment en què també es va afegir, a les cèl·lules, la timidina- $[^3H]$  (23Ci/mmol; Amersham, Woburn, MA, USA) a una concentració de 0,5  $\mu Ci/ml$ . Paral·lelament es va realitzar el mateix experiment amb cèl·lules en medi complet durant 24 h abans de la incorporació de la timidina- $[^3H]$ . Després de 24 h, els pous es van rentar amb PBS, es van fixar amb metanol al 95% (5 min), es van tractar amb Tricloroacètic al 10% (10 min) a 4 °C i finalment, es van homogeneïtzar amb 250  $\mu l$  de NaOH 0,3 N. Com a resultat, es van obtenir dues alíquotes de 100  $\mu l$  que es van comptar amb un comptador- $\beta$  (Beckman Coulter™, LS 6500 Multipurpose Scintillation Counter).

## 15. ANÀLISI DE LA MIGRACIÓ DE CMLV

### 15.1. Assaig de migració per Cambra de Boyden modificada

L'assaig de migració cel·lular es va realitzar mitjançant cambres de Boyden amb membranes de policarbonat amb una mida de porus de 8  $\mu\text{m}$  recobertes amb col·lagen (CytoSelect™ 24-Well Cell Invasion Assay) tal i com es descriu a continuació:

En primer lloc, es van hidratar els *transwell* amb medi de cultiu base (sense complementar), aproximadament durant una hora a temperatura ambient. Es va preparar una solució de medi de cultiu amb PDGF-BB (Selleckchem, Munich, Germany), un potent agent quimiotàctic, a una concentració de 25 ng/ml i es van afegir 600  $\mu\text{l}$  d'aquesta solució al pou inferior per cada punt experimental. A continuació, es van col·locar els *Transwells* en els corresponents pous que contenien el medi amb PDGF-BB. Per a cada condició experimental es van resuspendre 50.000 CMLV procedents del l'aorta dels ratolins control o transgènics en 100  $\mu\text{l}$  de medi complet i es van transferir al compartiment superior dels *transwells*. Les CMLV es van incubar durant 4 h a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> en atmosfera humida i, passat aquest temps, es va eliminar el medi de cultiu. Amb un bastonet humit amb PBS calent es va netejar la part superior del *transwell* (on s'havien afegit les cèl·lules), per tal d'eliminar les cèl·lules que no havien migrat, i el PBS sobrant es va eliminar amb pipeta. Seguidament, es va incubar el *transwell* amb paraformaldehid al 3% (15 min) per fixar les cèl·lules i a continuació, es van tenyir les parts superior i inferior de cada *transwell* amb Cristall Violeta al 0,1% en metanol al 20% en PBS durant 2 minuts. Passat aquest temps, els *transwells* es van rentar amb PBS per eliminar-ne l'excés de colorant. Un cop el pou estava sec, es va afegir al pou inferior 200  $\mu\text{l}$  d'àcid acètic al 10% i el *transwell* es va incubar 10 minuts en un agitador orbital per tal d'eluir el cristall violeta que havia tenyit les cèl·lules que havien migrat. Passat aquest temps es van transferir 100  $\mu\text{l}$  de cada mostra a una placa de 96 pous i es va mesurar l'absorbància a 560 nm en un lector de plaques.



**Figura 36.** Esquema representatiu de l'assaig de migració en cambra de Boyden modificada.

## 15.2. Assaig de reparació de ferida

Es van sembrar CMLV de ratolí en plaques de 12 pous i es van deixar créixer fins assolir un 80% de confluència. La monocapa cel·lular va ser denudada mitjançant el raspat amb una punta de pipeta P200. Tot seguit es va rentar amb PBS per eliminar-ne les restes cel·lulars i es va afegir medi fresc complementat amb un 20% de sèrum fetal boví com a estímul migratori. La placa es va deixar en cultiu durant 16 h a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> en atmosfera humida i, passat aquest temps, es va determinar l'àrea envaïda mitjançant un microscopi invertit en mode contrast de fase (DMIRE2, Leica) amb el qual es van visualitzar i captar 4 camps diferents per punt experimental. L'àrea envaïda es va quantificar mitjançant el programa informàtic Image J (NIH, Bethesda, MD, USA).

## 16. ANÀLISI ESTADÍSTICA

Els resultats s'expressen com a la mitjana  $\pm$  l'error estàndard de la mitjana (SEM), o bé la desviació estàndard de la mitjana (SD). L'avaluació estadística dels resultats es va realitzar segons l'anàlisi de la variància (ANOVA) o per la prova *t de Student*, en funció del nombre de grups comparats. En els estudis realitzats amb animals o amb mostres humanes es va aplicar el test no paramètric *Mann-Whitney*. En aquells casos en què es van trobar diferències significatives entre grups, es va aplicar el test de comparació múltiple de *Tukey-Kramer*. L'anàlisi es va realitzar amb el programa estadístic *GraphPad Instat*. Les diferències es consideraren significatives per a  $p < 0,05$ .



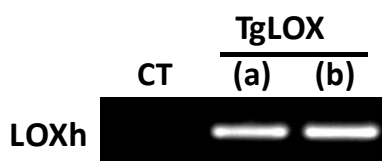


# RESULTATS



## 1. GENERACIÓ I CARACTERITZACIÓ D'UN RATOLÍ TRANSGÈNIC QUE SOBRE-EXPRESSA LA LOX ESPECÍFICAMENT EN CML

Per tal d'estudiar el paper de la LOX en el desenvolupament de l'aterosclerosi i de l'AAA hem desenvolupat un model animal (TgLOX) que expressa la LOX humana (LOXh) sota el control del promotor de SM22 $\alpha$ , el qual dirigeix l'expressió específicament a cèl·lula muscular llisa (CML). Tal i com s'explica a la secció de *Metodologia*, hem generat dues famílies de ratolins transgènics (*a* i *b*). El substrat genètic en què es va microinjectar el transgèn (Balb/c) s'ha purificat a C57BL/6J mitjançant creuaments successius i la descendència positiva pel transgèn s'ha seleccionant mitjançant PCR convencional (Fig. 37). Actualment, el model és >99,9% C57BL/6J i està llest per a utilitzar en diferents procediments experimentals. Abans, però, ha calgut fer una sèrie d'estudis de fenotipat per tal de demostrar que aquests ratolins no només han incorporat el transgèn, sinó que sobre-exprésen la LOXh a nivell proteic i que aquesta és funcional.



**Figura 37. Comprovació de la incorporació del transgèn de la LOXh en els ratolins TgLOX.** A) Es van establir dues línies transgèniques estables (*a* i *b*) mitjançant mètodes convencionals. La descendència es va seleccionar per PCR a partir de DNA genòmic de biòpsies de la cua dels ratolins. El gel d'agarosa mostra el fragment amplificat de 360 pb corresponent a una part del promotor SM22 $\alpha$  i la regió adjacent de l'ADNc de la LOXh en mostres de les dues famílies, *a* i *b*, fragment que no és detectat en el ratolí control (CT).

Els animals de les dues línies (*a* i *b*) són viables, sans, fèrtils i mostren una transmissió estable del transgèn entre generacions seguint les ràtios Mendelianes, suggerint que els ratolins TgLOX presenten un desenvolupament embrionari normal. Com mostren les Taules 13. i 14., els animals arriben a l'edat adulta amb normalitat, sense diferències fenotípiques evidents en el pes corporal, els valors de pressió sanguínia, la concentració de lípids en plasma o els paràmetres ecocardiogràfics, comparats amb els seus companys salvatges.

Taula 13. Pressió sanguínia sistòlica, pes corporal i valors lipídics (ratolins de 4 mesos)

	CT (n=8)	TgLOX (n=8)
<b>PSS (mmHg)*</b>	117 ± 9,88	105 ± 9,29
<b>Pes corporal (g)</b>	27,32 ± 1,48	27,5 ± 1,90
<b>TG (mg/dL)</b>	63,4 ± 19,15	90,6 ± 32,77
<b>Colesterol (mg/dL)</b>	89,6 ± 14,6	98,4 ± 13,05
<b>HDL (mg/dL)</b>	68,6 ± 12,8	72,5 ± 9,8

PSS: pressió sanguínia sistòlica; TG: triglicèrids. Dades expressades com a mitjana ±SD

\* Promig de 10 mesures per cada ratolí i dia. El valor de PSS es establir a partir de les mesures de 3 dies consecutius.

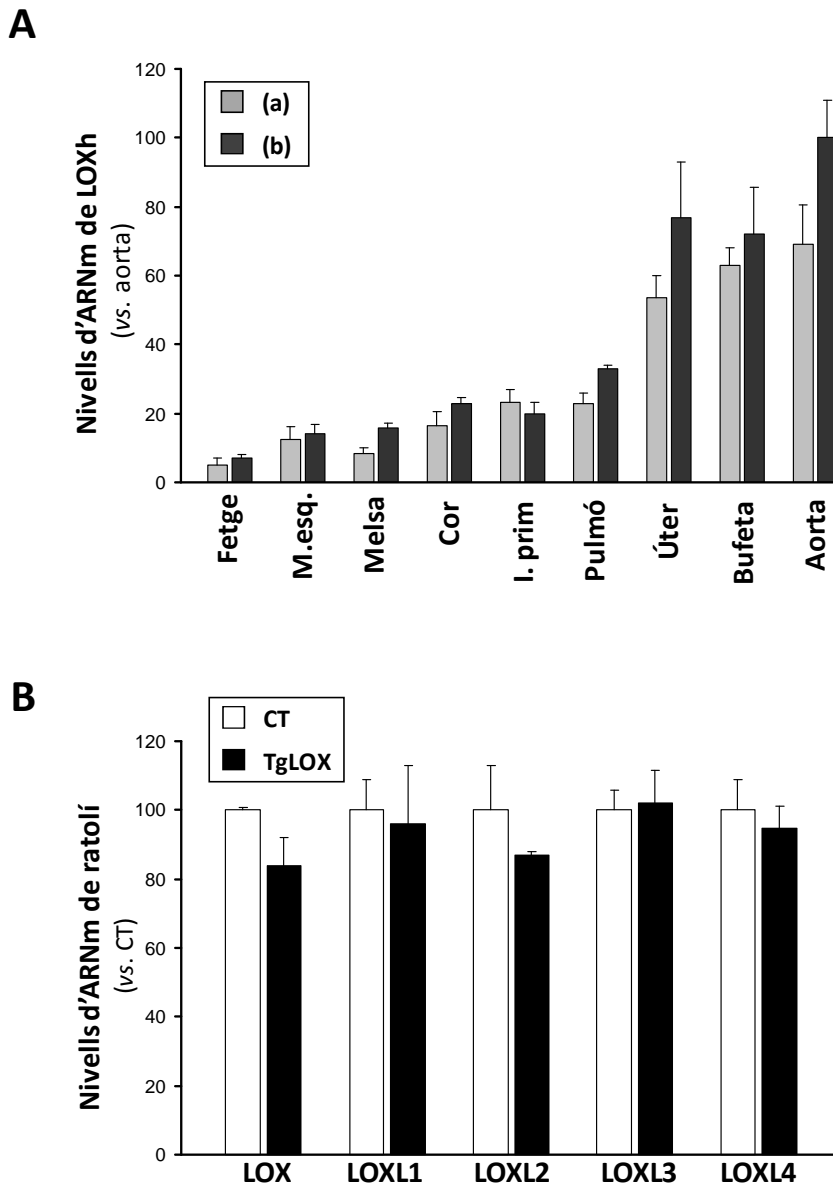
Taula 14. Paràmetres ecocardiogràfics

	CT (n=5)	TgLOX (n=5)
<b>LVPWd (mm)</b>	1,04 ± 0,11	0,98 ± 0,07
<b>LVPWs (mm)</b>	1,51 ± 0,17	1,41 ± 0,07
<b>IVSd (mm)</b>	1,05 ± 0,09	1,03 ± 0,11
<b>IVSs (mm)</b>	1,54 ± 0,13	1,46 ± 0,10
<b>LVIDd (mm)</b>	3,77 ± 0,15	3,42 ± 0,19
<b>LVIDs (mm)</b>	2,54 ± 0,1	2,25 ± 0,21
<b>FS (%)</b>	37,26 ± 2,85	39,54 ± 2,87
<b>EF (%)</b>	67,62 ± 3,57	69,77 ± 4,59
<b>LV mass (mg)</b>	104,46 ± 7,86	100,70 ± 4,09
<b>Volum sistòlic (µL)</b>	35,85 ± 1,14	33,04 ± 1,98
<b>Despesa cardíaca (ml/min)</b>	16,12 ± 0,34	19,25 ± 4,25

Els valors són la mitjana ± SEM.

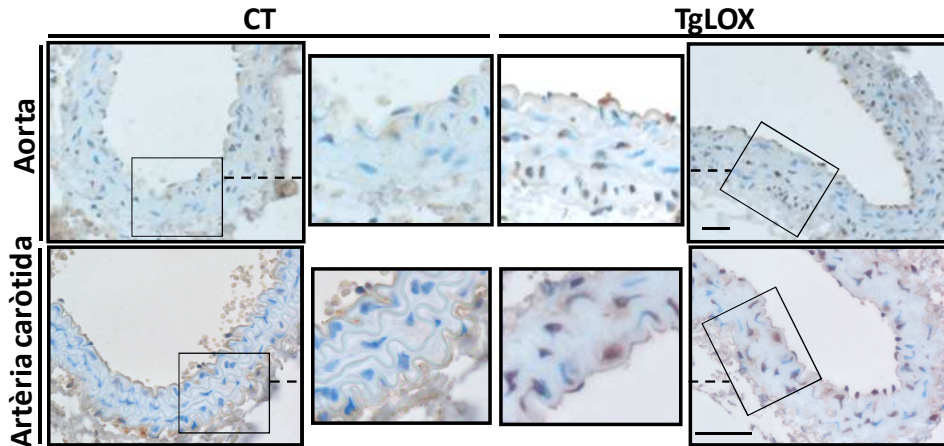
**LV:** Ventricle esquerre; **PW:** Gruix de la paret posterior; **d:** Diàstole; **s:** Sístole; **IVS:** Gruix de l'envà ventricular; **ID:** Diàmetre intern; **FS:** Escurçament fraccional; **EF:** Fracció d'ejecció.

Per tal d'analitzar la selectivitat del transgèn per a aquells teixits rics en CML, es van mesurar els nivells d'expressió d'aquest en 9 òrgans dels ratolins TgLOX adults mitjançant PCR a temps real. Així, es va detectar una forta expressió de la LOXh en aquells teixits rics en CML com l'aorta, la bufeta o l'úter, mentre que altres teixits com el fetge, presentaven una expressió més feble. Cal destacar que les dues famílies presentaven un patró d'expressió similar i, per aquest motiu, en els estudis posteriors es van utilitzar ambdues famílies indistintament (Fig. 38 A). A més, es va comprovar que l'expressió endògena de la LOX i els seus isoenzims no es veia afectada per la sobre-expressió del transgèn (Fig. 38 B).



**Figura 38. Caracterització del patró d'expressió tissular de la LOX en el ratolí transgènic TgLOX.** A) Nivells relatius d'ARNm de la LOXh en diferents teixits del ratolí TgLOX (famílies a i b) obtinguts per PCR a temps real. Per tal de comparar entre teixits, es va assignar un valor arbitrari de 100 a l'aorta (família b), teixit que mostra la major expressió. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM (n=9; M. esq., múscul esquelètic; I. prim, intestí prim). B) Nivells endògens d'ARNm de la LOX i els isoenzims LOXL en l'aorta dels ratolins control (CT; barres blanques) i dels ratolins transgènics (TgLOX; barres negres) obtinguts per PCR a temps real. Les dades s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM (n=9 ratolins per grup; \*p<0,001 vs CT).

Paral·lelament, es va corroborar la sobre-expressió de la LOX en la capa mèdia de l'artèria aorta i caròtida dels ratolins transgènics per immunohistoquímica (Fig. 39) sense observar, de nou, diferències significatives entre les dues famílies de transgènics.

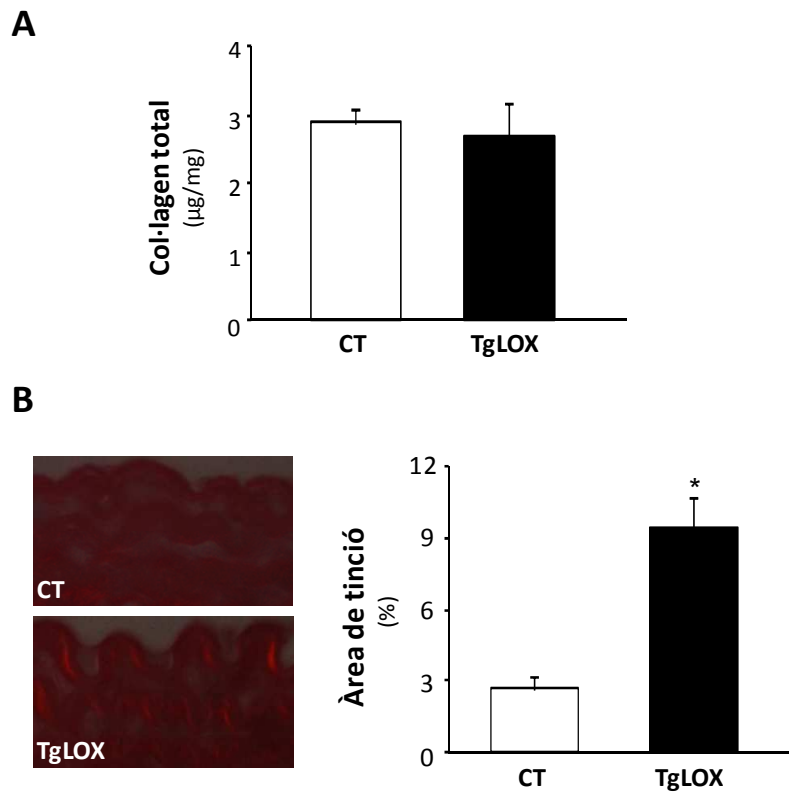


**Figura 39. Patró d'expressió de la LOX a la paret arterial del ratolí TgLOX.** Anàlisi per immunohistoquímica de l'expressió de la LOX (color marró) en les artèries aorta i caròtida dels ratolins control (CT) i transgènics (TgLOX). Les àrees seleccionades es mostren a major augment. Barra = 30 µm.

### 1.1. Els ratolins transgènics TgLOX sobre-expressen la LOX enzimàticament activa

Un cop establert el model de ratolí transgènic que sobre-expressa la LOX humana específicament en CML, vam comprovar que la proteïna sobre-expressada era catalíticament activa. Amb aquest objectiu, vam determinar si la sobre-expressió de la LOX tenia algun efecte en el contingut o estructura del seu substrat, el col·lagen. Vam analitzar el contingut de col·lagen a l'aorta dels ratolins TgLOX pel mètode colorimètric de quantificació d'hidroxiprolina. No vam detectar diferències significatives en el contingut de col·lagen total, entre els animals control i els transgènics (Fig. 40 A). Tanmateix, vam detectar diferències en el grau d'entrecruament d'aquest col·lagen mitjançant la tinció amb vermell siri analitzada sota llum polaritzada. Aquesta tinció, a diferència de les tincions de col·lagen clàssiques com la tinció amb tricòmic de Masson, permet diferenciar el grau d'entrecruament de les fibres de col·lagen. Quan s'observen les preparacions a través de llum polaritzada apareix un gradient de

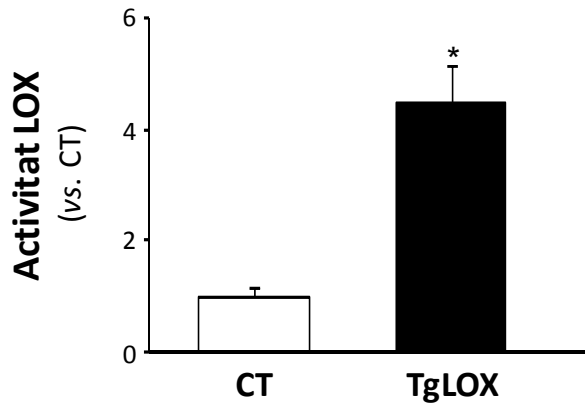
color que depèn del gruix de la fibra; a mesura que augmenta l'entrecreuament del col·lagen el color canvia de verd/groc (fibres poc entrecreuades) fins a taronja/vermell (fibres molt entrecreuades) [487]. Els resultats mostren uns nivells més elevats de col·lagen madur (color vermell) a la capa mèdia dels ratolins transgènics comparat amb els ratolins control (Fig. 40 B). Així, podem determinar que la sobre-expressió de la LOX provoca un augment de l'entrecreuament de les fibres de col·lagen a la capa mèdia vascular en el ratolins TgLOX comparat amb els ratolins control.



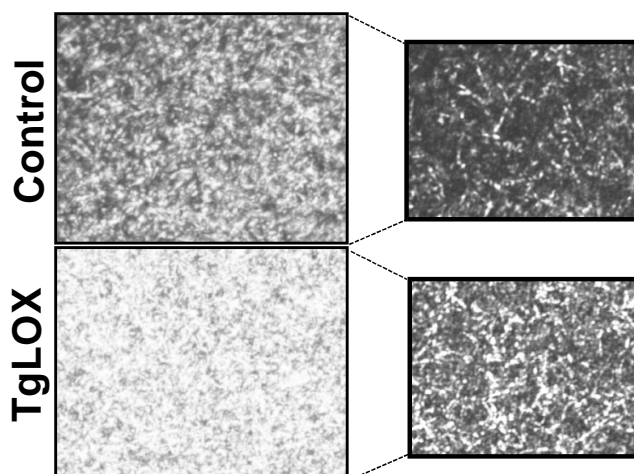
**Figura 40. La sobre-expressió de la LOX potencia la maduració del col·lagen a la capa mèdia de l'aorta del ratolí TgLOX.** A) Es va determinar el contingut de col·lagen vascular mitjançant l'anàlisi del contingut d'hidroxiprolina en l'aorta dels ratolins control (CT) i dels ratolins transgènics (TgLOX) (n=6). B) Anàlisi del grau d'entrecreuament de les fibres de col·lagen mitjançant la tinció amb vermell siri analitzada amb llum polaritzada en la capa mèdia de l'aorta dels ratolins TgLOX i els seus companys de camada control (CT) (n=7). Tinció representativa (panell esquerre) i quantificació de les àrees tenyides (panell dret). Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM (CT: n=7, TgLOX, n=6; \*p<0,001 vs. CT).



Amb l'objectiu de realitzar estudis funcionals de l'activitat de la LOX en aquests animals, es van aïllar CML de l'aorta dels ratolins transgènics i dels seus companys de camada salvatges mitjançant la tècnica d'explants i es va avaluar l'activitat LOX en els sobredants d'aquestes cèl·lules. Mitjançant un assaig fluorescent d'alta sensibilitat, es va detectar una major activitat enzimàtica LOX en aquells sobredants procedents de les cèl·lules que sobre-expressen la LOX que en els de les cèl·lules control (Fig. 41). La capacitat de la LOX secretada per les CMLV d'induir la polimerització de col·lagen es va avaluar mitjançant un mètode *in vitro* que permet visualitzar la formació de fibres de col·lagen per microscòpia confocal. Els sobredants de CMLV provinents de ratolins transgènics induïen una polimerització de col·lagen superior a la promoguda pels sobredants de les CMLV dels animals control (Fig. 42).

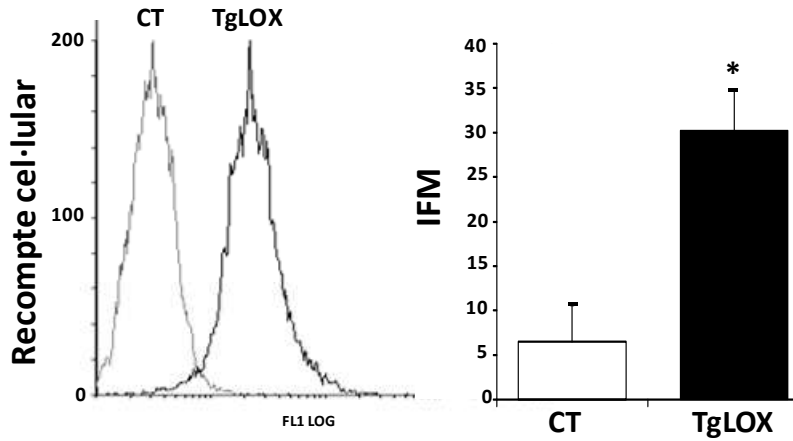


**Figura 41.** Els sobredants provinents de CMLV de ratolins transgènics presenten un augment de l'activitat enzimàtica LOX. Es va avaluar l'activitat LOX, expressada com a mitjana  $\pm$  SEM, en els sobredants de CMLV obtingudes dels ratolins control (CT) i transgènics (TgLOX) mitjançant un assaig fluorimètric (n=9; \*p<0,001 vs. CT).



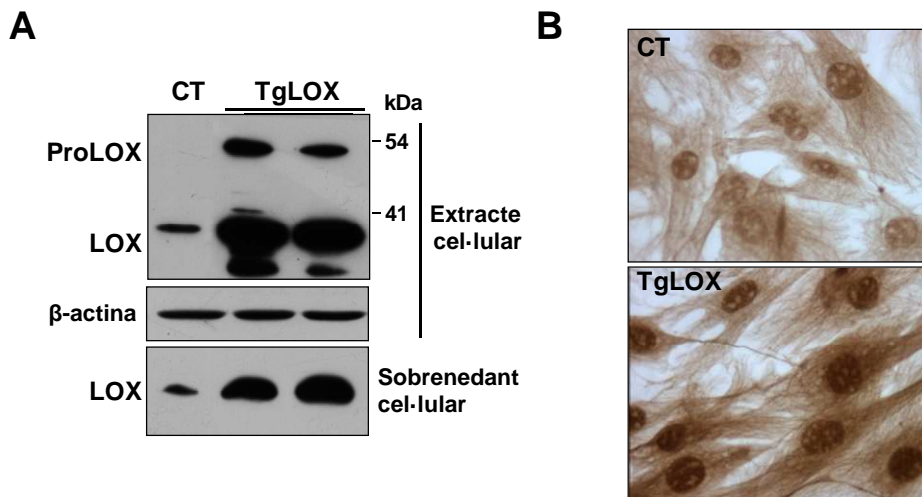
**Figura 42. Els sobrenedants de CMLV procedents dels ratolins TgLOX indueixen una major polimerització del col·lagen que els de les cèl·lules d'animals control.** Els sobrenedants concentrats obtinguts a partir de CMLV dels ratolins CT i TgLOX mantingudes en cultiu durant 3 dies es van incubar 24 h a 37 °C amb col·lagen tipus I, tal i com s'especifica a la secció *Metodologia*. Les preparacions es van observar per microscòpia de reflexió en un microscopi confocal i es van obtenir fotomicrografies corresponents a la màxima projecció d'una sèrie en Z (18 seccions); es mostra també un únic pla de la sèrie Z (panell dret). En les imatges es pot observar una major densitat de les fibres de col·lagen en els sobrenedants de les cèl·lules transgèniques.

Mitjançant citometria de flux, *Western blot* i immunocitoquímica vam comprovar que les CML procedents de l'aorta dels ratolins transgènics TgLOX presentaven nivells elevats de LOX humana, prenent com a control les cèl·lules procedents dels ratolins salvatges (Fig. 43 i 44).

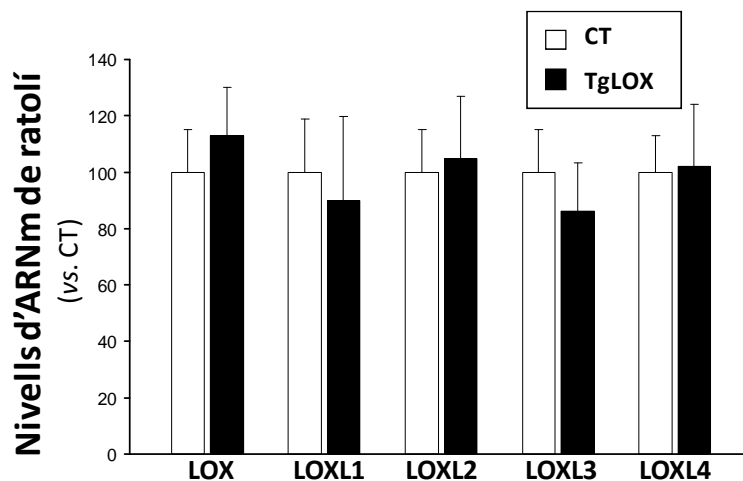


**Figura 43. CMLV dels animals TgLOX sobre-exprésen la LOX correctament.** Es van aïllar CML de l'aorta dels ratolins control (CT) i transgènics (TgLOX) tal i com s'especifica a la secció *Metodologia*. Histograma representatiu de l'expressió de la LOX analitzada per citometria de flux en CMLV de ratolins control (CT; línia grisa) i transgènic (TgLOX; línia negra). El gràfic de la dreta mostra la intensitat de fluorescència mitjana (IFM) detectada en cèl·lules procedents de 4 aïllaments de CMLV diferents tant d'animals CT com de TgLOX.

L'anàlisi per *Western blot* mostrà un augment tant del pro-enzim (50 kDa) com de la forma madura de la LOX (32-36 kDa) en les cèl·lules dels ratolins TgLOX, així com un augment de la secreció d'aquesta proteïna madura al medi de cultiu avaluada en el medi condicionat de les cèl·lules (Fig. 44 A). En concordança, també s'observà un augment de la immunotinció específica per a la LOXh a les cèl·lules dels animals transgènics (Fig. 44 B). Vàrem descartar que la transgènesi alterès l'expressió endògena de la LOX i dels seus isoenzims degut a un possible efecte compensatori. Efectivament, no s'observaren diferències en els nivells d'ARNm d'aquestes proteïnes entre les cèl·lules control i les transgèniques (Fig. 45).



**Figura 44.** CMLV dels animals TgLOX sintetitzen, processen i secreten la LOX correctament. Es van aïllar CML de l'aorta dels ratolins control (CT) i transgènics (TgLOX) com s'especifica a la secció *Metodologia*. Es va analitzar l'expressió de la LOX mitjançant *Western blot* (A) i immunocitoquímica (B). Es van determinar els nivells proteics de LOX en els extractes cel·lulars i en els sobrenedants de les CMLV tant dels animals CT com dels TgLOX. S'indica la posició del pro-enzim (ProLOX) així com de la forma madura (LOX). Es va analitzar la β-actina com a control de càrrega.



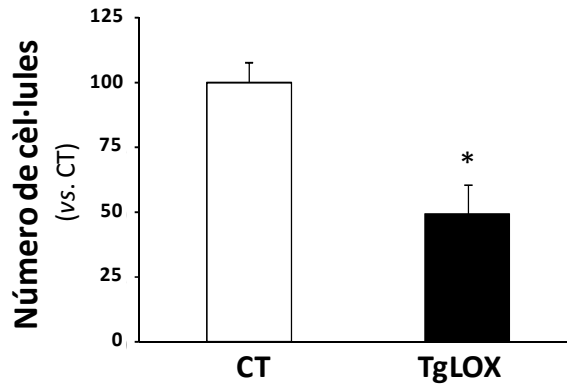
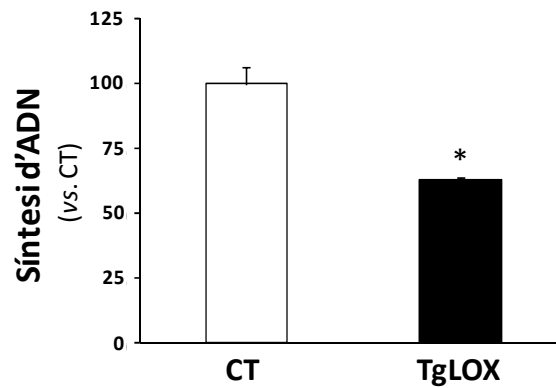
**Figura 45.** Els nivells d'expressió endògens de la LOX i els seus isoenzims no es veuen alterats per un possible efecte compensatori en CMLV. Es van aïllar CML de l'aorta dels ratolins control (CT) i transgènics (TgLOX) com s'especifica a la secció *Metodologia*. Nivells endògens d'ARNm de la LOX i els isoenzims LOXL en CMLV obtingudes dels ratolins control (CT; barres blanques) i dels ratolins transgènics (TgLOX; barres negres) avaluats per PCR a temps real. Les dades s'expressen com a mitjana ± SEM (n=6 ratolins per grup).

En resum, podem afirmar que en les CMLV procedents dels ratolins transgènics, la LOX se sobre-expressa, processa i secreta correctament a l'espai extracel·lular, on indueix la maduració del col·lagen de la matriu extracel·lular.

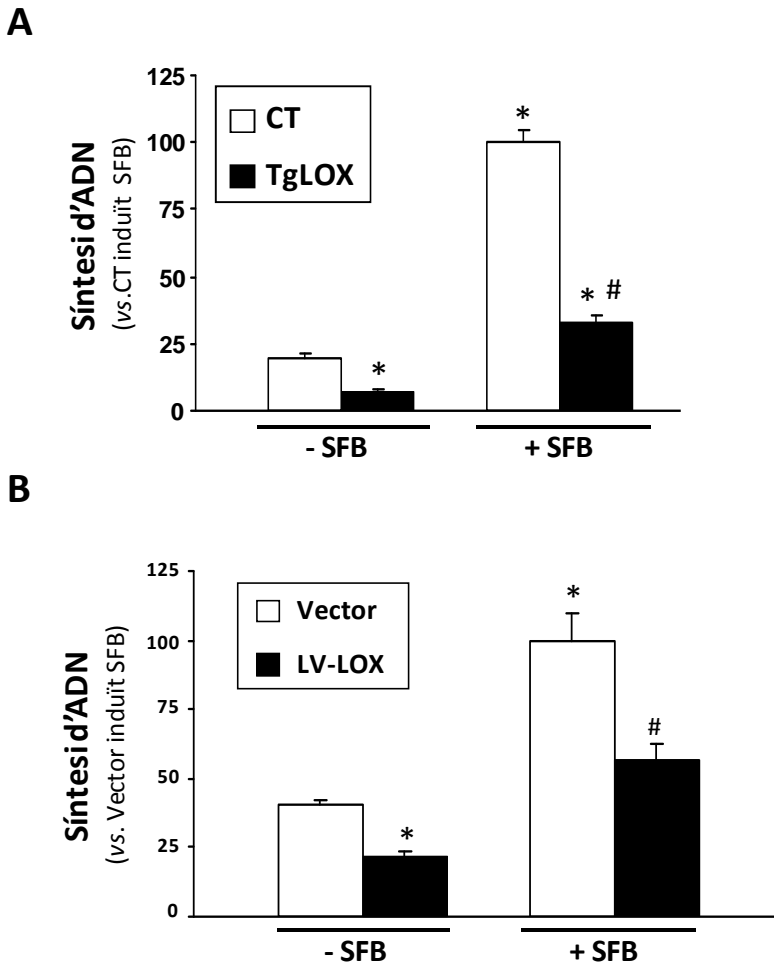
## 2. LA SOBRE-EXPRESSIÓ DE LA LOX REDUEIX LA TAXA DE PROLIFERACIÓ CEL·LULAR EN CMLV MURINES I HUMANES

Les CMLV procedents dels ratolins TgLOX mostraven una reducció de fins un 50% en el recompte cel·lular, després d'haver estat mantingudes en cultiu en condicions estàndard durant 72 h, comparat amb les cèl·lules control (Fig. 46 A). Aquest comportament suggeria una possible implicació de la LOX en el control de la proliferació de les CMLV. En aquest context, vam mesurar la síntesi d'ADN *de novo* mitjançant l'assaig d'incorporació de  $[H]^3$  timidina com a mesura indirecta de l'índex d'activitat mitogènica. Les CMLV dels ratolins transgènics en creixement en medi complert mostraven una menor taxa d'incorporació de  $[H]^3$  timidina que les cèl·lules procedents dels ratolins salvatges (Fig. 46 B).

De forma anàloga, la síntesi d'ADN estava reduïda en les cèl·lules quiescents procedents d'animals transgènics comparades amb les cèl·lules control, reducció que es mantenia després de l'estimulació amb SFB. Resultats similars es van obtenir en CMLV humanes que sobre-expressaven la LOX mitjançant un sistema lentiviral, en comparació amb CMLV transduïdes amb el vector buit (Fig. 47 A i B). Complementàriament, vam determinar l'efecte de la sobre-expressió de la LOX sobre marcadors de proliferació o de canvi fenotípic de les CML com l'antigen nuclear de proliferació cel·lular (PCNA) o la cadena pesada de la miosina de múscul llis embrionari (Myh10). Vam detectar una marcada reducció en l'expressió d'aquests marcadors en CMLV que sobre-expressaven la LOX, tant en cèl·lules procedents dels ratolins transgènics com en CMLV humanes transduïdes amb el vector lentiviral de la LOX (Fig. 48).

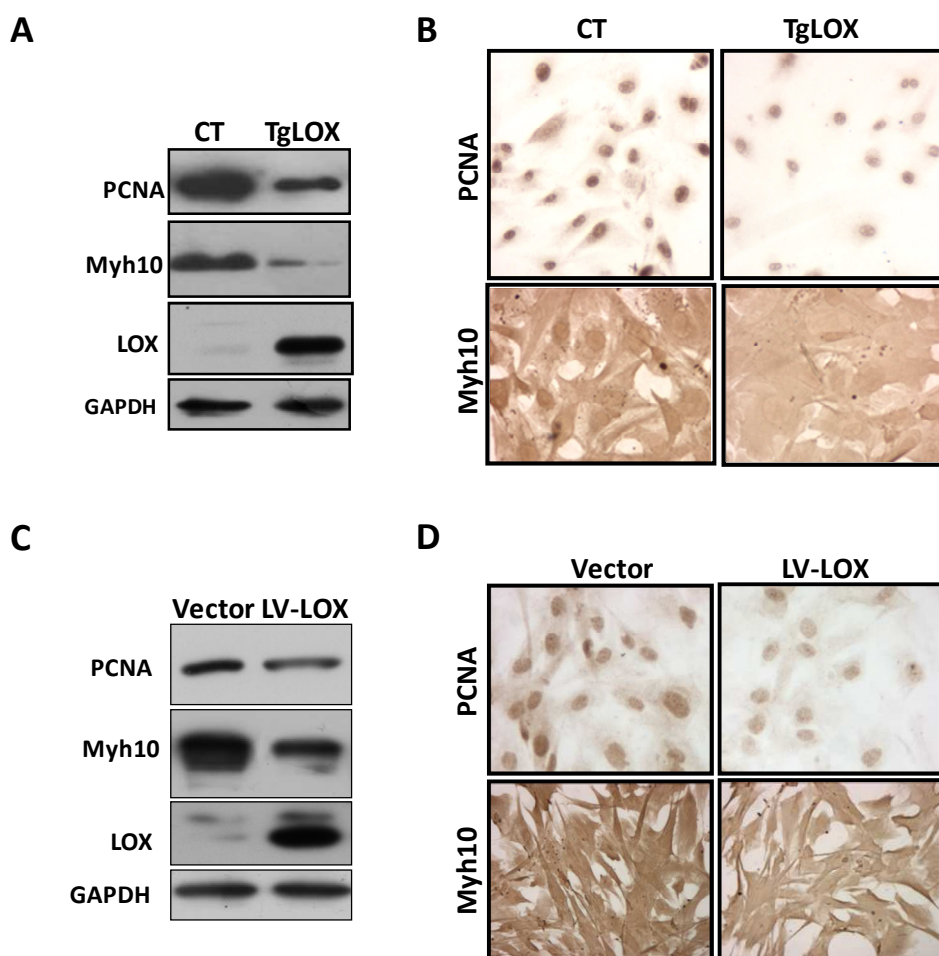
**A****B**

**Figura 46. La sobre-expressió de la LOX en CMLV redueix la taxa de proliferació cel·lular.** Les CML obtingudes a partir de l'aorta dels ratolins control (CT; barres blanques) i transgènics (TgLOX; barres negres) es van cultivar en medi complert i es va analitzar la seva proliferació mitjançant un recompte cel·lular (A) o mitjançant la mesura de la incorporació de  $[H]^3$ timidina (B). Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM de tres experiments realitzats en quintuplicat. \* $p < 0,02$  vs. CT.



**Figura 47. La sobre-expressió de la LOX en CMLV redueix la taxa de proliferació cel·lular.**

A) La taxa d'incorporació de  $[H]^3$ timidina es va avaluar en CMLV obtingudes a partir de l'aorta dels ratolins control (CT; barres blanques) i transgènics (TgLOX; barres negres) mantingudes 24 h en medi sense complementar amb sèrum, estimulades (+SFB) o no (-SFB) amb un 20 % de SFB. B) L'índex mitogènic es va determinar en CMLV humanes transduïdes amb un vector lentiviral que codifica la LOX (LV-LOX; barres negres) o amb el corresponent vector buit (Vector; barres blanques) en les mateixes condicions descrites en A). Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM de tres experiments realitzats en quintuplicat. \* $p < 0,001$  vs. cèl·lules CT quiescents; # $p < 0,001$  vs. cèl·lules CT induïdes amb SFB.



**Figura 48.** La sobre-expressió de la LOX en CMLV redueix l'expressió de marcadors de proliferació cel·lular o de canvi fenotípic. A i C) *Western blot* representatiu corresponent a l'expressió de PCNA, Myh10 i LOX en cèl·lules control (CT) i transgèniques (TgLOX) o en CMLV humanes transduïdes amb un vector lentiviral que codifica la LOX (LV-LOX) o amb el corresponent vector buit (Vector). Es va avaluar la GAPDH com a control de càrrega. B i D) Imatge representativa corresponent a l'anàlisi de PCNA i Myh10 per immunocitoquímica en aquestes cèl·lules.

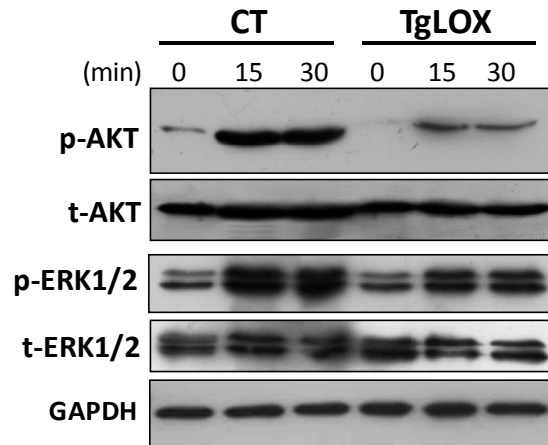


Posteriorment, vam determinar si la reducció en la taxa de proliferació en les cèl·lules que sobre-expressen la LOX s'acompanyava per canvis en l'activació de les vies AKT i ERK-1/2, dues vies de transducció de senyals involucrades en la proliferació de les CMLV i la restenosi [266], [313], [314], [488]. Així, la sobre-expressió de la LOX tant en CMLV murines (Fig. 49 A i B) com humanes (Fig. 50 A i B), provocà una atenuació de l'activació per SFB de les vies de senyalització AKT i ERK-1/2. Tanmateix, no vam observar diferències en l'activació de la via de p38 per SFB entre les cèl·lules que sobre-expressaven la LOX i les cèl·lules control (Fig. 51 A i B), suggerint que aquesta via no participava en l'activitat antiproliferativa de la LOX en CMLV.

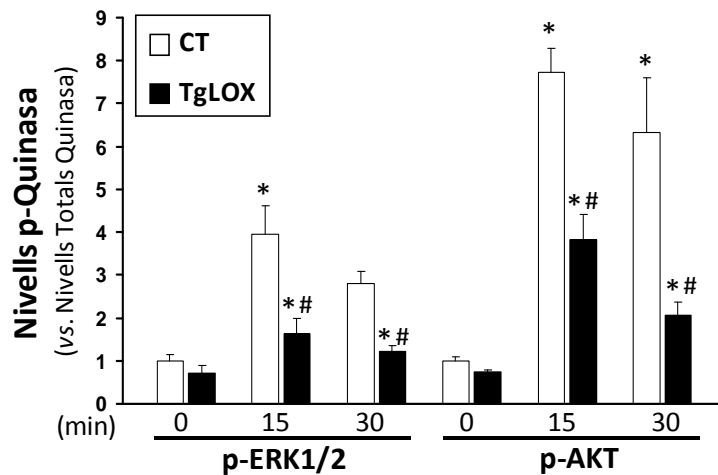
A continuació, vam estudiar quin paper juga la LOX en el control de la migració de les CMLV. Vam avaluar la resposta quimiotàctica de les cèl·lules control i transgèniques en resposta al PDGF-BB, un potent agent mitogen, mitjançant cambres de Boyden modificades. Com s'observa a la Figura 52 A, les cèl·lules transgèniques mostraven un augment en la resposta quimiotàctica al PDGF-BB comparat amb les cèl·lules control provinents dels ratolins salvatges, tot i que aquest efecte era molt discret.

Vam complementar aquests resultats amb un estudi de reparació de ferida, tècnica que al temps d'anàlisi (16 h) reflecteix l'efecte combinat de proliferació i migració de les cèl·lules. Els resultats obtinguts mostren que l'àrea envaïda per les CMLV dels ratolins transgènics era menor que la de les cèl·lules control (Fig. 52 B i C).

**A**

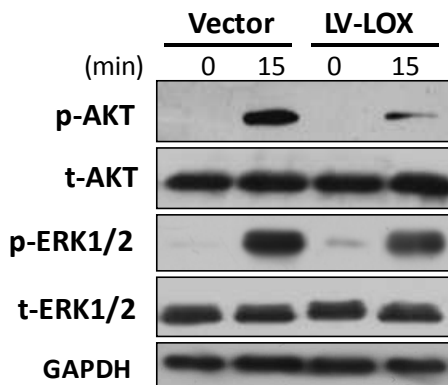


**B**

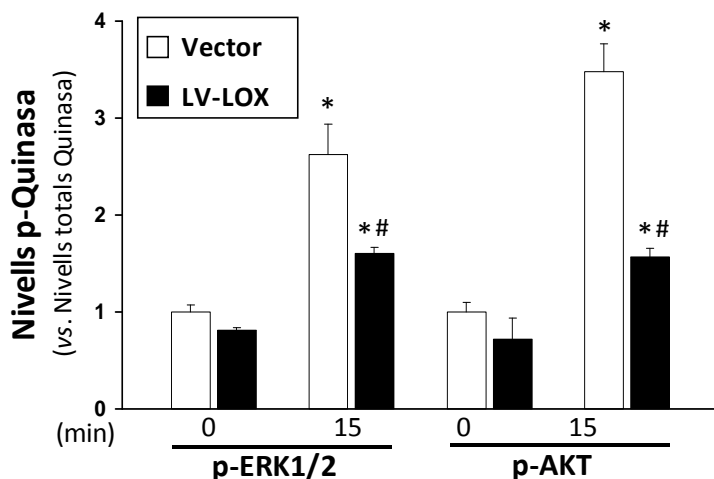


**Figura 49. La LOX inhibeix l'activació d'Akt i Erk1/2 en CMLV murines.** Efecte de la sobre-expressió de la LOX sobre l'activació per SFB d'AKT (p-AKT) i ERK1/2 (p-ERK1/2) en CMLV dels ratolins transgènics (TgLOX) o dels ratolins control (CT) analitzat per *Western blot* (A). Es mostren també els nivells proteics d'AKT (t-AKT) i ERK1/2 (t-ERK1/2) total. La GAPDH es va analitzar com a control de càrrega. B) El gràfic de barres mostra el patró temporal de la fosforilació d'AKT i ERK1/2 en aquestes cèl·lules. Els valors es van obtenir mitjançant l'anàlisi densitomètrica dels *Western blots* i s'expressen com l'augment dels nivells de pAKT, pERK1/2 en referència a les cèl·lules control (CT) a temps 0. Els resultats es van normalitzar pel valor corresponent de la quinasa total i s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM (n=4; p<0,05: \* vs. cèl·lules a temps 0; # vs. cèl·lules CT en el mateix temps d'anàlisi).

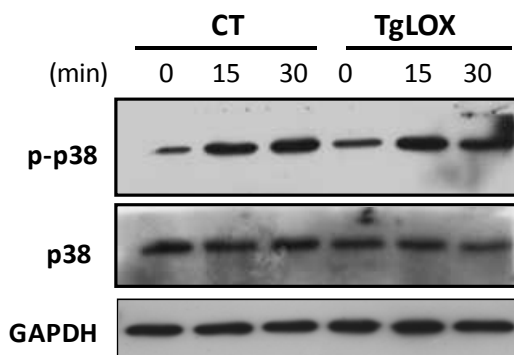
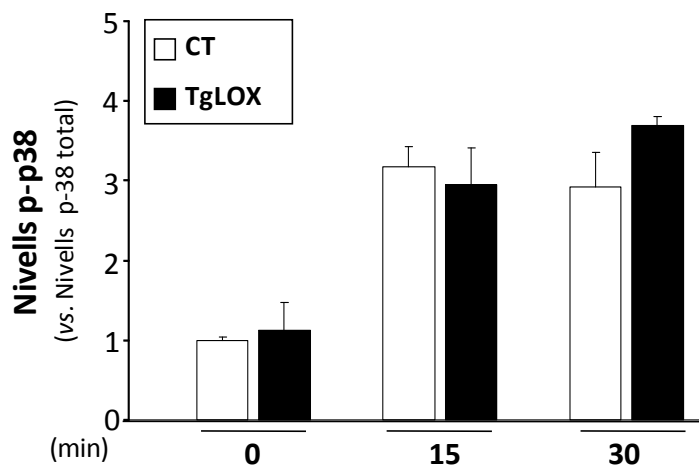
**A**



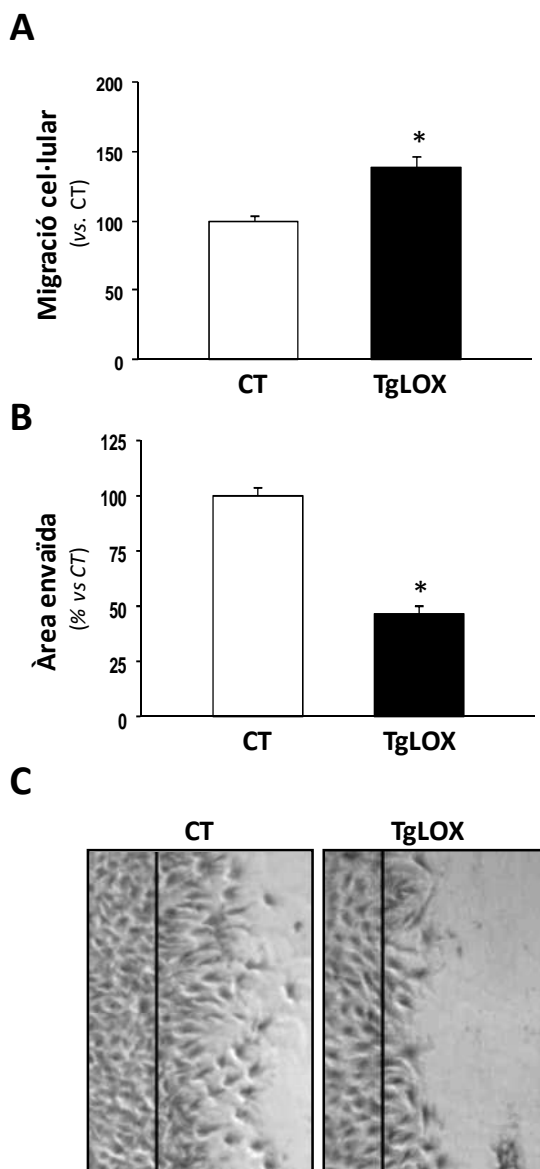
**B**



**Figura 50. La LOX inhibeix l'activació d'Akt i Erk1/2 en CMLV humanes.** Efecte de la sobre-expressió de la LOX sobre l'activació per SFB d'AKT (p-AKT) i ERK1/2 (p-ERK1/2) en CMLV humanes transduïdes amb el vector lentiviral que codifica la LOX (LV-LOX) o amb el corresponent vector buit (Vector) analitzat per *Western blot* (A). Es mostren també els nivells proteics d'AKT (t-AKT) i ERK1/2 (t-ERK1/2) total. La GAPDH es va analitzar com a control de càrrega. El gràfic de barres mostra el patró temporal de la fosforilació d'AKT i ERK1/2 en aquestes cèl·lules. Els valors es van obtenir mitjançant l'anàlisi densitomètrica dels *Western blots* i s'expressen com l'augment dels nivells de pAKT, pERK1/2 en referència a les cèl·lules control (Vector) a temps 0. Els resultats es van normalitzar pel valor corresponent de la quinasa total i s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM (n=4; p<0,05; \* vs. cèl·lules a temps 0; # vs. cèl·lules Vector en el mateix temps d'anàlisi).

**A****B**

**Figura 51. La sobre-expressió de LOX no afecta l'activació de p38 per sèrum.** Efecte de la sobre-expressió de la LOX sobre l'activació per SFB de p38 en CMLV dels ratolins transgènics (TgLOX) o dels ratolins control (CT) analitzat per *Western blot*. Es mostren també els nivells proteics de p38 total. La GAPDH es va analitzar com a control de càrrega. El gràfic de barres mostra el patró temporal de la fosforilació de p38 en aquestes cèl·lules. Els valors es van obtenir mitjançant l'anàlisi densitomètrica dels *Westerns blots* i s'expressen com l'augment dels nivells de p-p38 en referència a les cèl·lules control (CT) a temps 0. Els resultats es van normalitzar pel valor corresponent de la quinasa total i s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM (n=4).

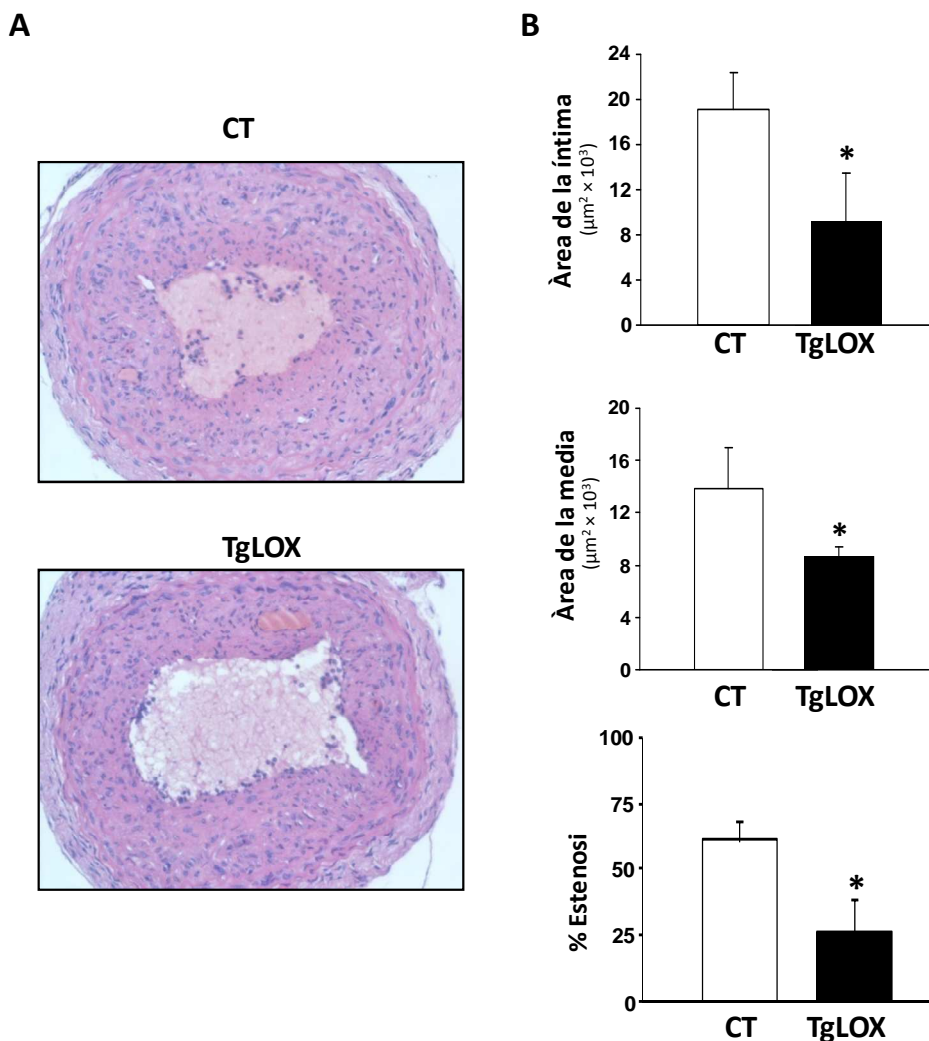


**Figura 52. La sobre-expressió de la LOX afecta les propietats quimiotàctiques de les CMLV.** A) Migració de les CMLV dels ratolins control (CT) i transgènics (TgLOX) avaluada mitjançant cambres de Boyden modificades. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$ SEM i provenen de quatre experiments realitzats per quadruplicat. B) Imatges representatives de l'assaig de reparació de ferida en CMLV procedents dels ratolins transgènics (TgLOX) i control (CT). Les línies marquen la posició original de l'àrea denudada. Després de 16 h, les cèl·lules es van fixar, tenyir i quantificar (4 cops per punt experimental). C) Quantificació de l'àrea envaïda. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM i provenen de tres experiments realitzats per quadruplicat. (\* $p < 0,05$  vs. CT).

### 3. AVALUACIÓ DEL PAPER DE LA LOX EN EL REMODELAT VASCULAR INDUÏT PER LIGADURA DE L'ARTÈRIA CARÒTIDA

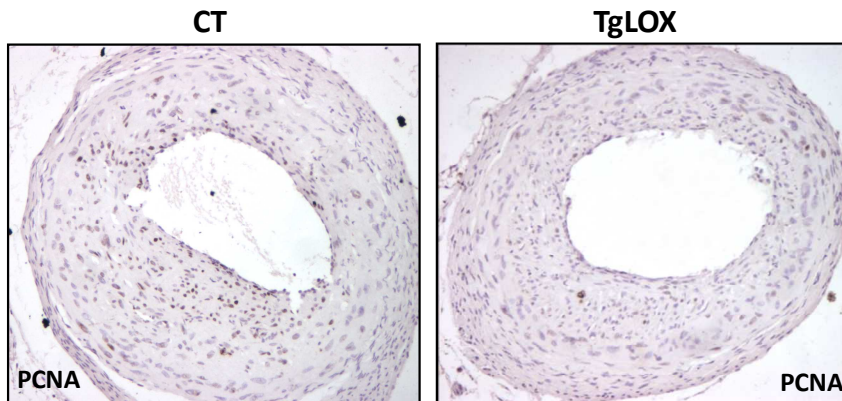
#### 3.1. La sobre-expressió de la LOX atenua la formació de neoíntima induïda per la lligadura de l'artèria caròtida.

Els resultats mostrats anteriorment indicaven que la LOX participava en el control de la proliferació de les CMLV. Per establir el seu sentit fisiològic, es va analitzar quin efecte tenia la sobre-expressió de la LOX en CMLV en l'engruiximent de la neoíntima mitjançant el model de lesió per lligadura de caròtida. Com s'indica a la secció de *Metodologia*, la caròtida esquerra es lligà just en el punt anterior de la bifurcació en caròtida interna i externa. D'aquesta manera s'aconsegueix un tram sencer d'artèria d'uns 9 mm de llarg on s'hi generarà lesió per estrès hemodinàmic. Seguint els resultats publicats per altres grups d'investigació [489]–[495] i en funció de les nostres observacions durant la posada a punt de la tècnica hem utilitzat ratolins de 4 mesos d'edat, els quals s'han sacrificat 3 setmanes després de la lligadura. Es van incloure 10 ratolins transgènics i 12 germans no transgènics. A més a més, es van realitzar dues operacions control amb un animal de cada grup, als que se'ls va realitzar tot el procediment quirúrgic, incloent-hi la dissecció de l'artèria caròtida, però sense lligar-la. Les caròtides s'analitzaren histològicament 21 dies després de la lligadura. En primer lloc, es va localitzar la zona del nus, per tal de comprovar que aquest havia obstruït totalment el vas. A partir d'aquest punt, es van realitzar talls successius de 5  $\mu\text{m}$  de gruix, els quals es disposaren en portaobjectes a intervals de 100  $\mu\text{m}$ . Les anàlisis histològiques mitjançant la tinció d'hematoxilina-eosina mostraven un remodelat vascular substancial en els animals control, que es va veure significativament atenuat en els animals que sobre-expressen la LOX (Fig. 53 A). Les dades obtingudes mitjançant l'anàlisi morfomètrica constataren que els animals TgLOX presentaven una reducció del percentatge d'estenosi i una reducció, tant de l'àrea de la íntima com de la mèdia, de la paret de l'artèria caròtida (Fig 53. B).



**Figura 53.** La sobre-expressió de la LOX limita el remodelat vascular en el model de lligadura de caròtida en ratolí. Es van obtenir les artèries caròtides esquerreres dels ratolins transgènics (TgLOX) (n=10) i control (CT) (n=12) 21 dies després de la seva lligadura permanent i es va realitzar una anàlisi morfològica d'aquestes, tal com s'especifica a la secció de *Metodologia*. A) Imatges corresponents a la tinció amb hematoxilina i eosina de les caròtides lligades d'animals CT i TgLOX. B) Anàlisi morfològica de l'àrea de l'íntima i de la mitja així com del percentatge d'estenosi de les seccions que comprenen la regió entre 1,4 mm fins a 1,6 mm des del punt de lligadura. Les dades s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM. (\* $p < 0,05$  vs. animals CT).

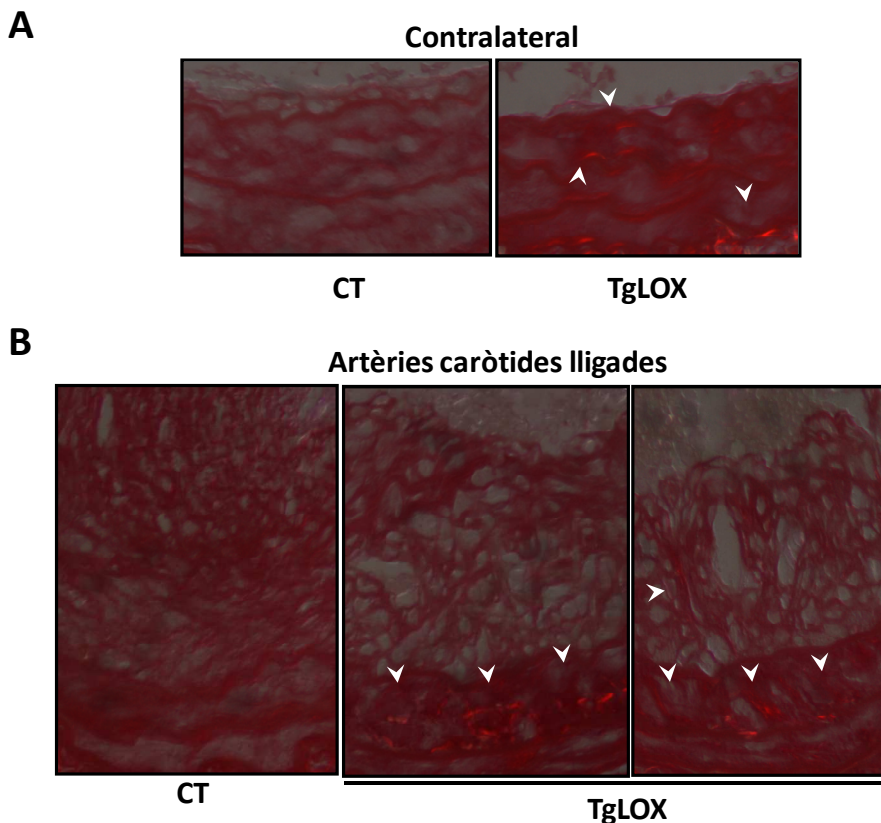
Com mostra la Figura 54, aquest efecte va anar acompanyat per una reducció en l'expressió del marcador de proliferació PCNA en les artèries lligades dels animals transgènics, suggerint que la sobre-expressió de la LOX atenua la formació de lesió per dany vascular mitjançant la inhibició de la proliferació de les CMLV.



**Figura 54. Les caròtides lligades dels ratolins TgLOX que sobre-expressen la LOX mostren una reducció en el marcador de l'estat proliferatiu PCNA.** Es van obtenir les artèries caròtides esquerres dels ratolins transgènics (TgLOX) (n=10) i control. L'expressió del PCNA es va avaluar per immunohistoquímica.



Paral·lelament, vam realitzar un estudi del contingut i composició de col·lagen de les artèries caròtides lligades i les corresponents contralaterals mitjançant la tinció amb vermell siri analitzada amb llum polaritzada. En concordança amb els resultats obtinguts a l'aorta, la mèdia de les artèries caròtides lligades i les corresponents contralaterals dels ratolins TgLOX mostren un augment de la refringència indicatiu d'un major contingut de col·lagen madur, comparat amb els ratolins control (Fig. 55). Tanmateix, a la neoíntima de les artèries lligades dels animals TgLOX tan sols s'observa la presència de col·lagen madur de forma esporàdica.

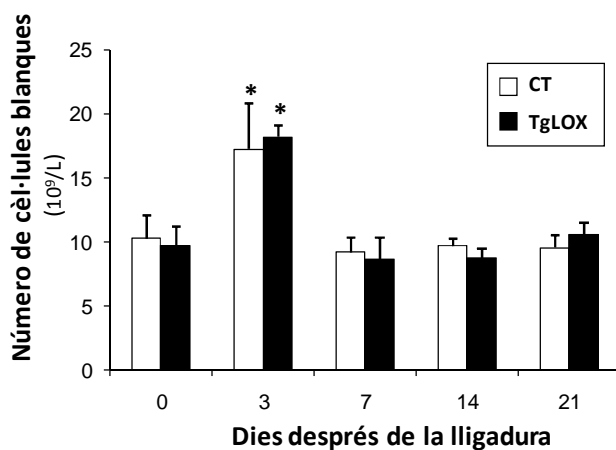


**Figura 55. La sobre-expressió de la LOX incrementa la maduració del col·lagen a la capa mèdia de la caròtida del ratolí TgLOX.** Es van obtenir les artèries caròtides esquerreres dels ratolins transgènics (TgLOX) (n=10) i control (CT) (n=12) 21 dies després de la lligació permanent d'aquestes així com les corresponents artèries caròtides dretes (contralaterals). Es va realitzar una anàlisi del grau d'entrecreuament de les fibres de col·lagen mitjançant la tinció amb vermell siri analitzada amb llum polaritzada en la capa mèdia de les caròtides del ratolins TgLOX i els CT. A) Tinció representativa de les artèries caròtides contralaterals. B) Tinció representativa de les artèries caròtides lligades. Les fletxes indiquen regions refringents corresponents a fibres de col·lagen entrecreuades.

### 3.2. Estudi del paper de la LOX en la resposta inflamatòria desencadenada per la lligadura de caròtida

Vam analitzar la resposta inflamatòria desencadenada en el model de lligadura de caròtida en els ratolins TgLOX per tal de determinar si la LOX podia tenir algun paper regulador en el seu desenvolupament. Vam realitzar un recompte de cèl·lules sanguínies durant les 3 setmanes posteriors a la lligadura, que, en concordança amb altres estudis publicats [496], [497], ens va permetre detectar un increment significatiu de monòcits 3 dies després de la lligadura de la caròtida tant en el grup control com en el transgènic, malgrat que no s'observaren diferències significatives entre els dos grups experimentals (Fig. 56). S'ha descrit que en aquest model, la resposta inflamatòria vascular és transitòria i només és evident en els primers dies (3-7 dies) després de la lligació però no a punt final (3 setmanes).

**A**



**B**

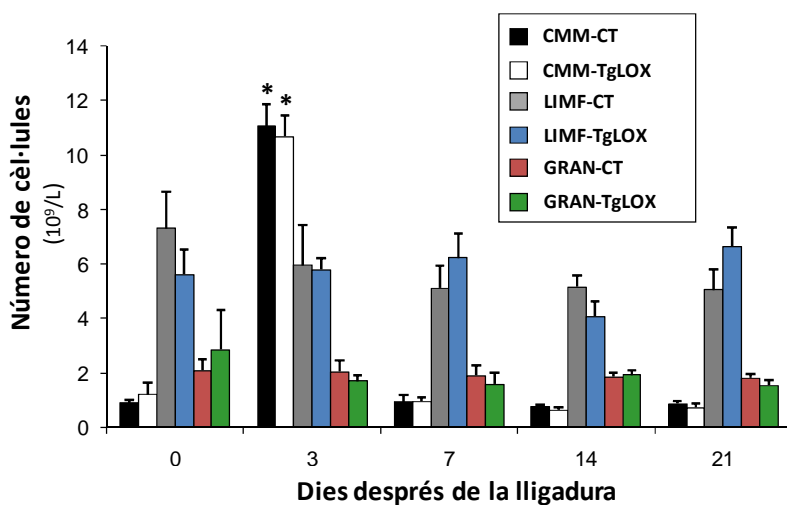
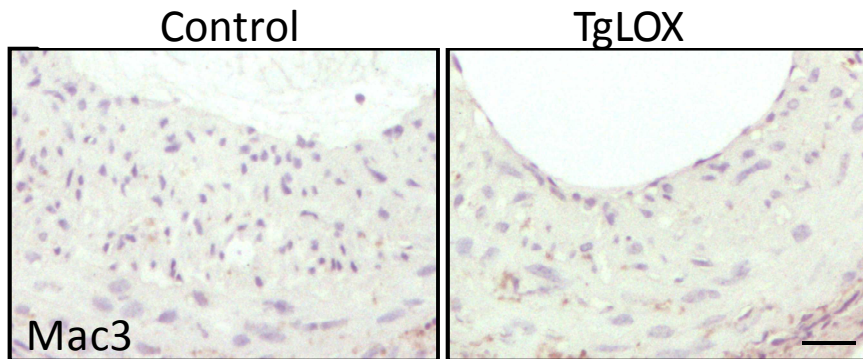


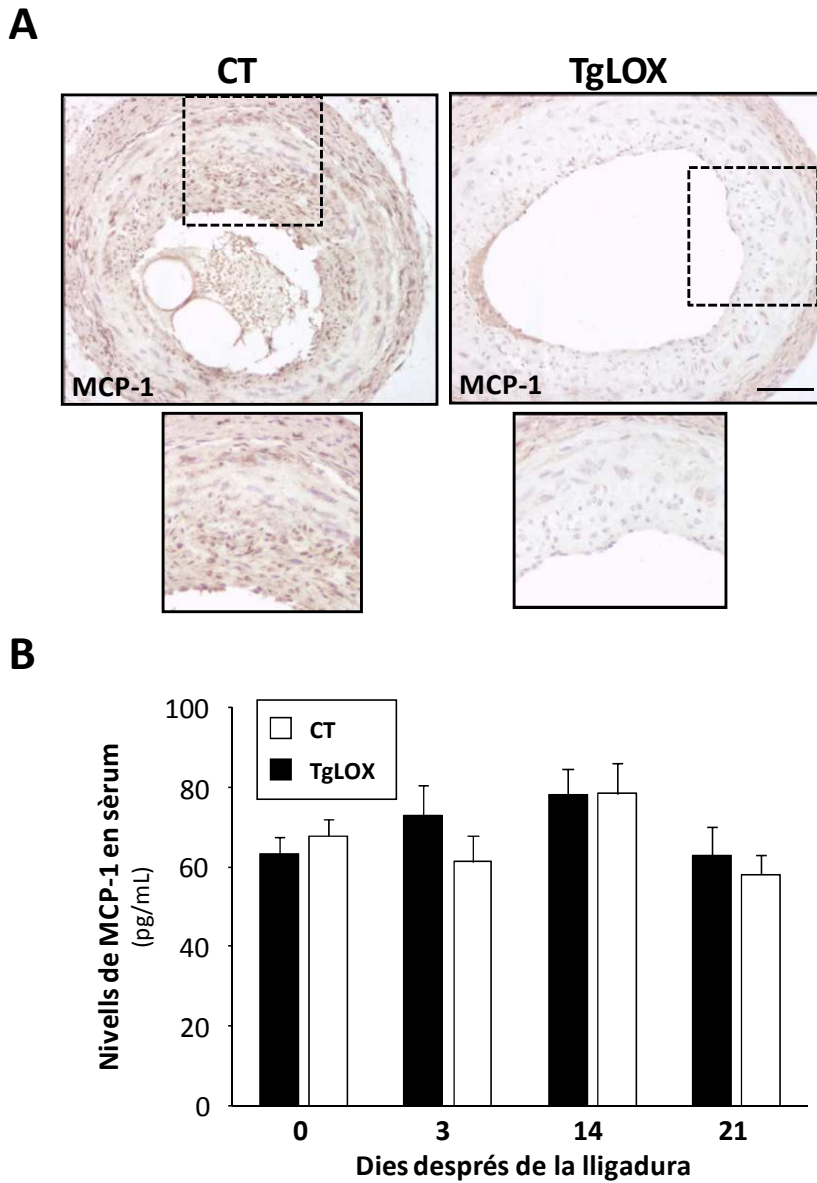
Figura 56. Recompte de cèl·lules sanguínies durant els 21 dies posteriors a la lligadura de l'artèria caròtida. A) Número de cèl·lules blanques circulants en animals control (CT) i transgènics (TgLOX) després de la lligadura de l'artèria caròtida. B) Recompte del número de monòcits circulants (CTM: cèl·lules de mida mitja; subgrup de cèl·lules sanguínies blanques que consisteix principalment en monòcits), limfòcits (LIMF) i granulòcits (GRAN) en aquests animals. Les dades s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM. (\* $p < 0,05$  vs. animals CT o TgLOX a temps inicial;  $n = 8$ )

Vam analitzar la infiltració de macròfags en les artèries caròtides lligades 3 setmanes després de la lligació mitjançant la immunodetecció de Mac3. Aquesta anàlisi va detectar una baixa infiltració de macròfags en la capa íntima sense diferències apreciables entre els animals controls i transgènics (Fig. 57).

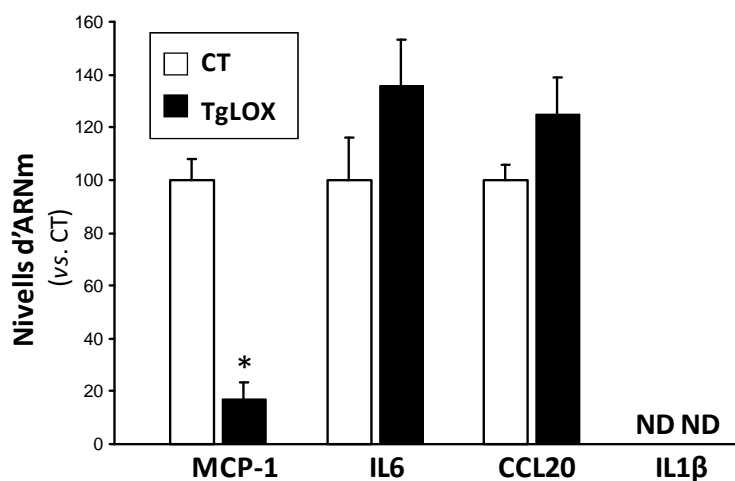
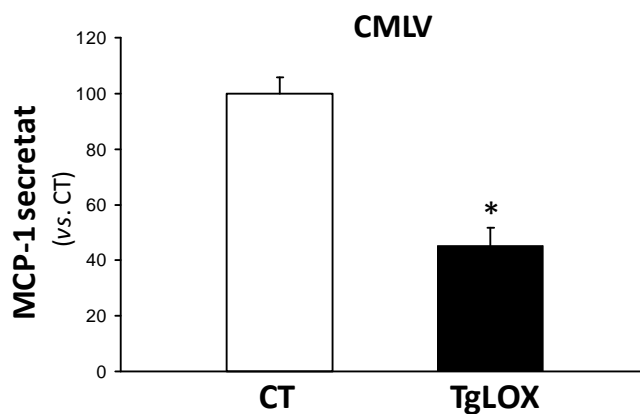


**Figura 57. Infiltració de macròfags en la neointima de les caròtides lligades.** Tinció immunohistoquímica de Mac3 contrastada amb hematoxilina en seccions de l'artèria caròtida dels ratolins control (CT) i transgènics (TgLOX) 3 setmanes després de la lligació. Barra: 30  $\mu$ m.

Seguidament, vam analitzar els nivells d'expressió de la citocina proinflamatòria MCP-1, ja que s'ha descrit que la sobre-expressió adenoviral de la LOX inhibeix l'expressió d'MCP-1 en CMLV de rata [356]. En concordança, el nostre model mostrava una disminució del marcatge per MCP-1 a la neointima de les artèries caròtides lligades dels ratolins TgLOX, en comparació amb els seus companys de camada salvatges (Fig. 58 A). Tanmateix, la sobre-expressió vascular de la LOX no va afectar els nivells circulants de MCP-1, que es van mantenir estables als 3, 14 i 21 dies després de la lligadura tant en el ratolí transgènic com en el control (Fig. 58 B). Així mateix, la sobre-expressió de LOX reduïa tant els nivells d'ARNm com els nivells de secreció de MCP-1 en CMLV en cultiu, mentre que l'expressió d'altres citocines no es veia afectada (Fig. 59 A i B).



**Figura 58.** La sobre-expressió de la LOX redueix l'expressió d'MCP-1 en la neointima de les caròtides lligades. A) Immunodetecció específica per MCP-1 en seccions de les artèries caròtides lligades de ratolins control (CT) i transgènic (TgLOX) 3 setmanes després de la lligació contratenyides amb hematoxilina. Les àrees indicades es mostren a un major augment (barra=30  $\mu$ m). B) Nivells d'MCP-1 en sèrum dels animals CT (n=12 i TgLOX (n=10) sotmesos a lligadura d'artèria caròtida. Les dades s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM.

**A****B**

**Figura 59. La sobre-expressió de la LOX redueix l'expressió d'MCP-1 en CMLV en cultiu.** A) Nivells d'ARNm de les citocines indicades avaluades mitjançant PCR a temps real en CMLV de l'aorta dels ratolins control (CT) i TgLOX. B) Nivells de MCP-1 secretat al medi de cultiu determinats per ELISA. Les dades s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM. (n=6; \*p<0,05 vs cèl·lules CT; ND, no detectat).

#### 4. INHIBICIÓ DE L'EXPRESSION DE LA FBLN5 EN L'AAA: REGULACIÓ PER ESTÍMULS INFLAMATORIS EN CMLV

L'AAA és una patologia caracteritzada per una alteració dels components de la MEC de la paret arterial. Tanmateix, es desconeix el paper que juguen les proteïnes elastogèniques, com és la FBLN5, en el desenvolupament d'aquesta malaltia.

Per tal d'estudiar els mecanismes involucrats en el desenvolupament d'aquesta patologia s'ha generat una col·lecció de mostres de paret arterial aneurismàtica, provinents de pacients sotmesos a cirurgia reparatòria i, com a controls, s'han recollit mostres d'aorta abdominal sana provinents de donants d'òrgans. Els pacients incorporats en el nostre estudi segueixen el patró prèviament descrit en aquesta patologia, essent tots homes d'edat avançada ( $70 \pm 5,7$  anys) i un 85% d'ells, fumadors o ex-fumadors. Les seves principals dades clíniques, així com les dels donants, es resumeixen a la Taula 15.

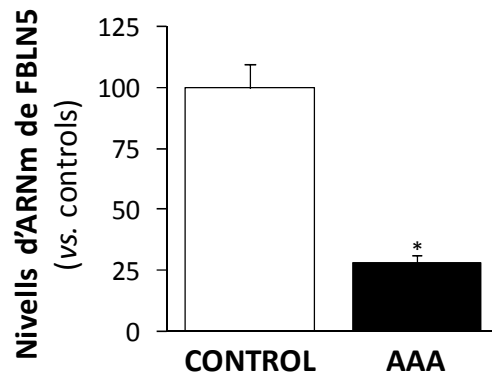
**Taula 15. Relació de dades clíniques dels pacients amb AAA i dels donants d'òrgans a partir dels quals s'han obtingut les mostres de paret arterial utilitzades en aquest estudi.**

	AAA (n=27)	DONANTS (n=8)
<b>Edat (anys, mitjana<math>\pm</math>SD)</b>	70 $\pm$ 5,77	62,38 $\pm$ 11,34
<b>Sexe (masculí, %)</b>	100	100
<b>Fumadors/ex-fumadors (%)</b>	85,19	62,5
<b>Fumadors actius (%)</b>	29,63	37,5
<b>Hipertensió arterial (%)</b>	70,37	62,5
<b>Diabetis tipus II (%)</b>	11,11	25
<b>Dislipèmia</b>	48,15	37,5
<b>Cardiopatia isquèmica</b>	18,52	0

SD, desviació estandard.

#### 4.1. L'expressió i secreció de la FBLN5 es troba reduïda en mostres d'AAA

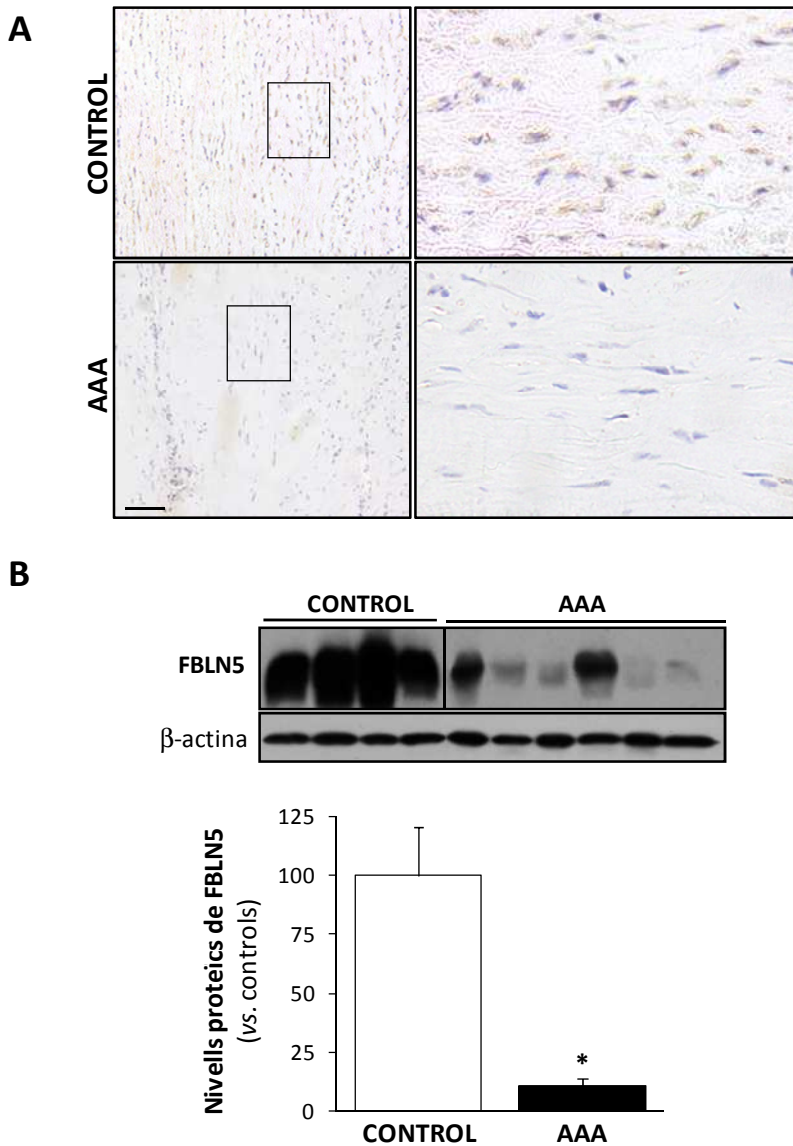
L'anàlisi de l'expressió de la FBLN5 per PCR a temps real va mostrar una inhibició significativa de la seva expressió en mostres d'AAA, comparades amb aortes sanes (Fig. 60).



**Figura 60.** Les mostres d'AAA presenten una disminució dels nivells d'ARNm de la FBLN5. Els nivells d'ARNm de FBLN5 en mostres d'AAA i d'aortes abdominals no aneurismàtiques (Control) es van determinar per PCR a temps real i es van normalitzar segons els nivells d'expressió de la  $\beta$ -actina. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM (CT: n=8, AAA, n=27; \*p<0,0001 vs. mostres control).

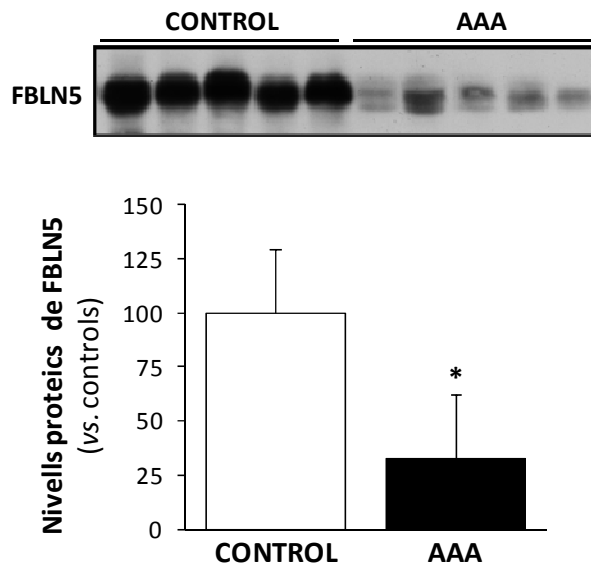
La disminució de l'expressió de la FBLN5 en mostres d'AAA es va confirmar també a nivell proteic mitjançant *Western blot* (Fig. 61 A) i immunohistoquímica (Fig. 61 B). Els resultats mostren una disminució d'un 65% en els nivells proteics de la FBLN5 a la paret arterial aneurismàtica, prenent com a control la paret arterial sana.





**Figura 61. Reducció dels nivells proteics de FBLN5 en l'AAA.** A) L'expressió de la FBLN5 en mostres CT i AAA es va visualitzar mitjançant immunohistoquímica. Les imatges mostren l'estructura de la paret arterial mitjançant tinció d'hematoxilina amb la contratinció de la immuntinció específica de la FBLN5. Totes les seccions es van tallar a 5 µm de gruix. Les àrees indicades es mostren a un major augment. Barra: 50 µm. B) Els nivells proteics de FBLN5 es van avaluar per *Western blot* en mostres d'AAA i d'aortes abdominals no aneurismàtiques (CT). Els nivells de β-actina es van utilitzar com a control de càrrega. El gràfic de barres mostra l'anàlisi densitomètrica dels *Westerns blots* i s'expressa en referència a les mostres control (CT). Els resultats s'expressen com a mitjana ± SEM (CT: n=7, AAA, n=12; \*p<0,0001 vs. mostres control).

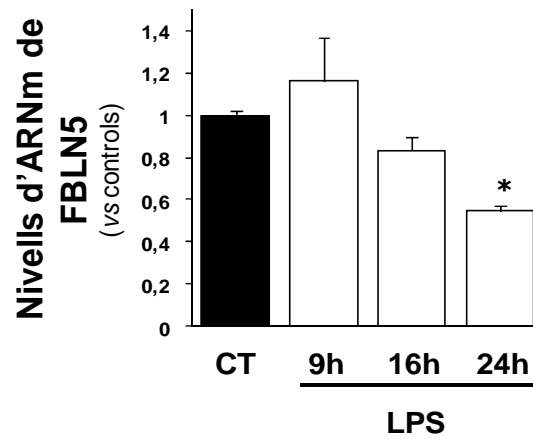
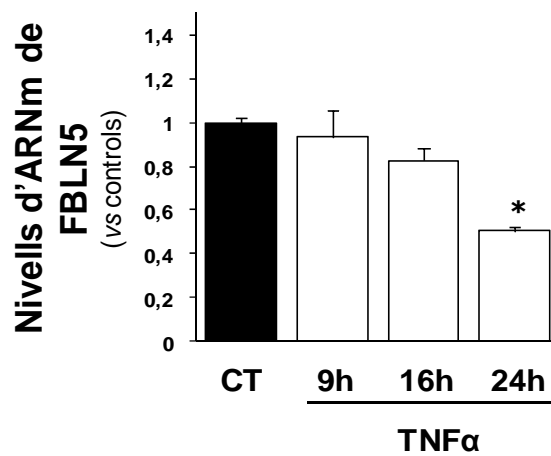
Donat que la FBLN5 és una proteïna que es secreta a l'espai extracel·lular, vam analitzar, per *Western blot*, els nivells d'aquesta proteïna alliberats al secretoma procedent de la incubació de fragments de paret arterial sana o aneurismàtica en medi de cultiu sense sèrum durant 24 h. De nou, es va detectar una disminució significativa, d'un 70%, en l'alliberament d'aquesta proteïna al medi de cultiu en les mostres aneurismàtiques, en comparació amb les mostres control (Fig. 62).



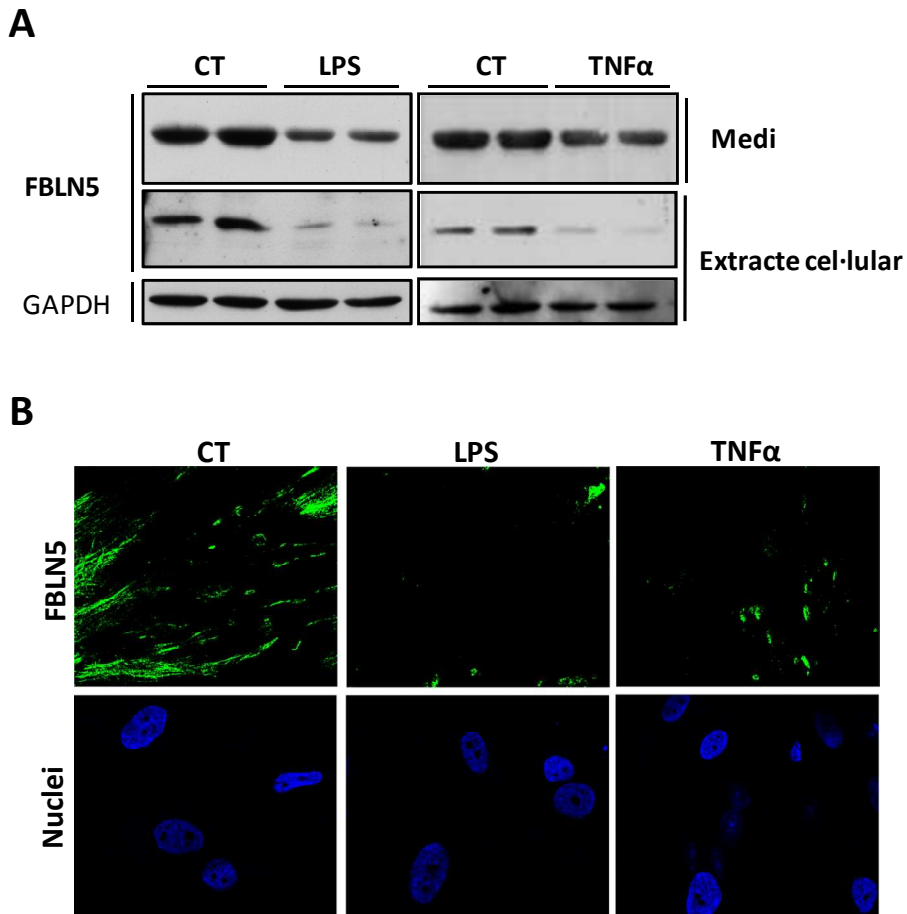
**Figura 62. Disminució de la secreció de la FBLN5 en mostres d'AAA.** Es van avaluar per *Western blot* els nivells proteics de FBLN5 en mostres de secretoma procedents de la incubació de teixit aneurismàtic (AAA) i control en medi de cultiu sense sèrum durant 24h. El gràfic de barres mostra l'anàlisi densitomètrica dels *Westerns blots* i s'expressa en referència a les mostres control. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM (n=12; \*p<0,001 vs. mostres control).

### 4.2. El tractament amb estímuls inflamatoris redueix l'expressió vascular de la FBLN5

Donada la importància del component inflamatori en l'AAA, vam analitzar la regulació de la FBLN5 per mediadors inflamatoris en cèl·lules vasculares. Amb aquest objectiu, les CMLV es van estimular amb LPS (100 ng/ml) o TNF $\alpha$  (50 ng/ml) durant diferents temps (9, 16 i 24 h). Els resultats mostren com el tractament amb aquests inductors va disminuir l'expressió de la FBLN5 de forma dependent del temps d'incubació. La màxima inhibició es va assolir a les 24 hores en què els nivells d'ARNm de la FBLN5 es reduïren en aproximadament un 50% (Fig. 63). L'anàlisi per *Western blot* va confirmar la reducció de l'expressió de la FBLN5 per estímuls inflamatoris com el LPS o el TNF $\alpha$ . Anàlogament, vam observar una reducció de la secreció de la FBLN5 a l'espai extracel·lular avaluada al medi condicionat d'aquestes cèl·lules (Fig. 64 A). L'anàlisi per microscòpia confocal també va evidenciar la disminució de l'expressió de la FBLN5 pel tractament amb estímuls inflamatoris (Fig. 64 B).

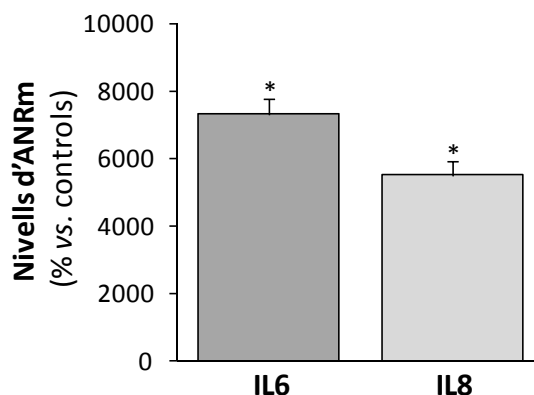
**A****B**

**Figura 63.** L'expressió de la FBLN5 s'inhibeix pel tractament amb estímuls inflamatoris en CMLV. Es van determinar els nivells d'ARNm de FBLN5 en CMLV tractades amb LPS (100 ng/ml) (A) o TNFα (50 ng/ml) (B) durant diferents temps (9, 16 i 24 h) mitjançant PCR a temps real i es van normalitzar segons els nivells d'expressió de la TBP. Els resultats s'expressen com a mitjana ± SD (n=6 ; \*p<0,0001 vs. control).



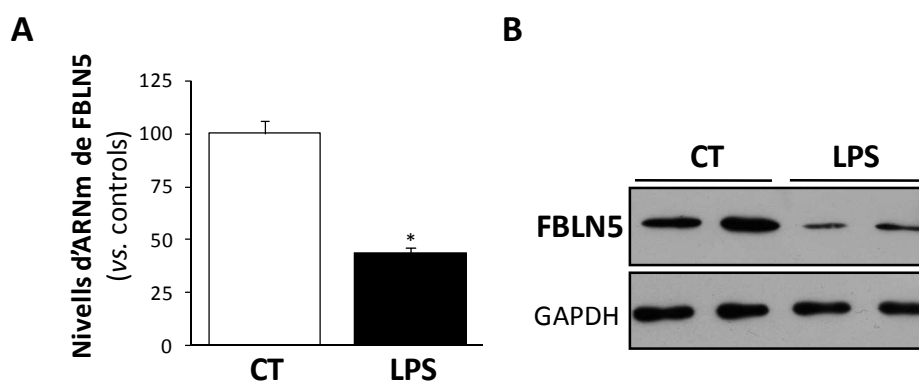
**Figura 64.** L'expressió i secreció a l'espai extracel·lular de la FBLN5 s'inhibeix pel tractament amb estímuls inflamatoris en CMLV. A) Es van avaluar els nivells proteics de FBLN5 en mostres de CMLV tractades amb LPS (100 ng/ml) o TNF $\alpha$  (50 ng/ml) durant 24 h per *Western blot*. Els nivells de GAPDH es van utilitzar com a control de càrrega. B) Immunocitoquímica realitzada en CMLV tractades amb LPS o TNF $\alpha$  durant 24 h. La proteïna va ser detectada mitjançant la incubació amb un anticòs específic per FBLN5 (verd) i els nuclis es van tenyir amb Hoechst (blau). Barres: 20  $\mu$ m.

Seguidament, vam establir l'efecte d'una resposta inflamatòria sistèmica en l'expressió vascular de la FBLN5 *in vivo*. Ratolins C57BL6/J es van tractar amb LPS a una dosi de 0,5 mg/Kg durant 24 hores. Vam comprovar que, efectivament, l'administració de LPS generava una resposta inflamatòria a la paret vascular dels ratolins tal com se'n desprèn de la forta inducció de IL6 i IL8 a l'aorta dels ratolins tractats amb LPS (Fig. 65).



**Figura 65.** L'administració de LPS genera una resposta inflamatòria a l'aorta de ratolí. Es van determinar els nivells d'ARNm de IL6 i IL8 a l'aorta de ratolins als quals se'ls havia administrat sèrum salí (CT) o LPS (0,5 mg/kg) durant 24 h mitjançant PCR a temps real i es van normalitzar segons els nivells d'expressió de la TBP. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM (n=10; \*p<0,0001 vs. control).

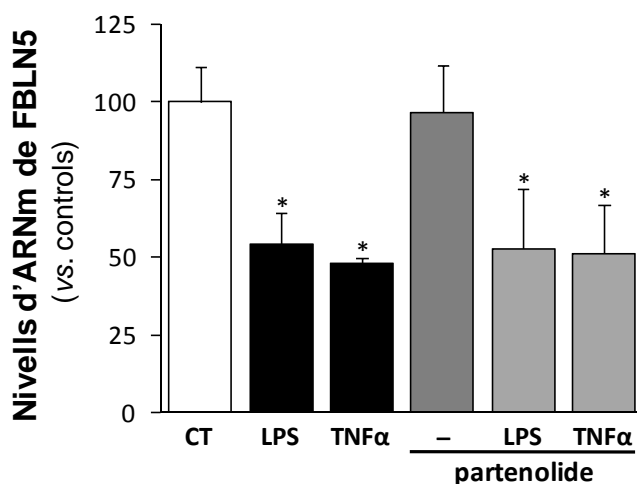
Com mostra la Figura 66., el tractament amb LPS va disminuir els nivells d'ARNm de la FBLN5 en un 65% a l'aorta dels ratolins (Fig. 66 A). Aquest efecte es va confirmar mitjançant *Western blot* (Fig. 66 B).



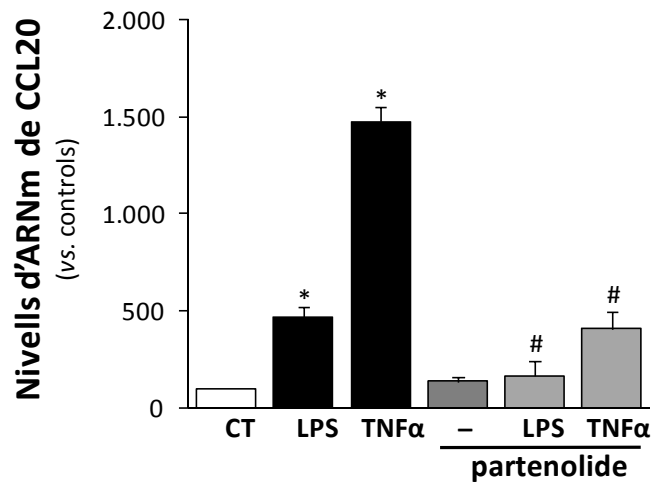
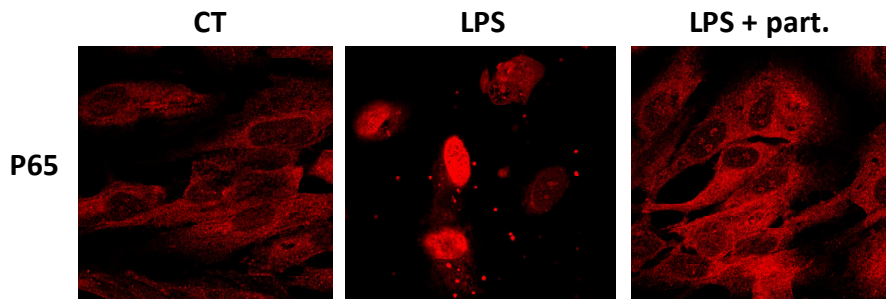
**Figura 66.** L'administració de LPS en ratolí redueix l'expressió de la FBLN5 a la paret vascular. A) Mitjançant PCR a temps real es van determinar els nivells d'ARNm de FBLN5 a l'aorta de ratolins als quals se'ls havia administrat sèrum salí (CT) o LPS (0,5 mg/kg) durant 24 h. Els resultats es van normalitzar pels nivells d'expressió de la TBP. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM (n=10; \* p<0,001 vs. control). B) Els nivells proteics de FBLN5 a la capa mèdia de l'aorta de ratolins CT i tractats amb LPS, es van avaluar per *Western blot*. Els nivells de GAPDH es van utilitzar com a control de càrrega.

### 4.3. Vies de senyalització implicades en la regulació de la FBLN5

Es va avaluar la contribució de dues de les vies de senyalització habitualment implicades en la resposta inflamatòria en CMLV, com la via del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) i de la proteïna activadora 1 (AP-1). Les CMLV es van tractar amb un inhibidor de cadascuna d'aquestes vies (partenolide per NF- $\kappa$ B i NDGA per AP-1) 30 minuts abans del tractament amb els diferents estímuls inflamatoris. El pretractament amb partenolide no va alterar l'efecte dels estímuls inflamatoris sobre l'expressió de la FBLN5 (Fig. 67). Tanmateix, aquest sí que va revertir la forta inducció de l'expressió de la citocina proinflamatòria CCL20 així com la translocació de la subunitat de NF- $\kappa$ B p65 al nucli (Fig. 18). En el mateix sentit, el tractament amb NDGA tampoc va modificar l'efecte del LPS o el TNF $\alpha$  sobre l'expressió de la FBLN5 encara que va atenuar la forta inducció de l'expressió de la citocina proinflamatòria IL8, (Fig. 69). Aquests resultats suggereixen que la regulació de la FBLN5 per estímuls inflamatoris no estaria mediada per aquestes vies.



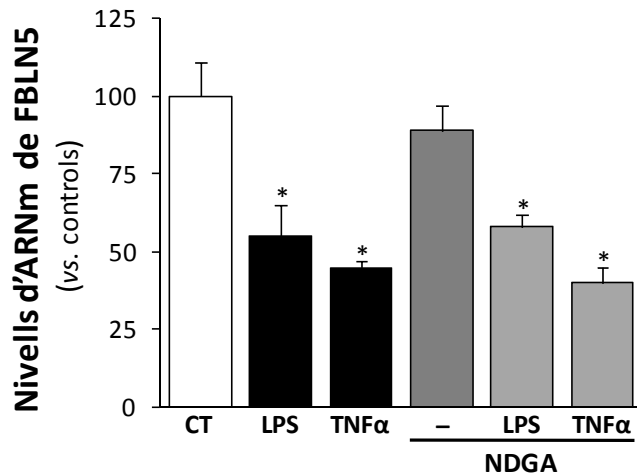
**Figura 67. La regulació de la FBLN5 per estímuls inflamatoris en CMLV no és mediada per NF $\kappa$ B.** Es van tractar CMLV amb LPS (100 ng/ml) o TNF $\alpha$  (50 ng/ml) durant 24 h en presència o absència d'un inhibidor de la via de senyalització NF- $\kappa$ B (partenolide; 1  $\mu$ M). Els nivells d'ARNm de la FBLN5 es van avaluar per PCR a temps real i es van normalitzar segons els nivells d'expressió de la GAPDH. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SD (n=6 ; \*p<0,0001; vs. control).

**A****B**

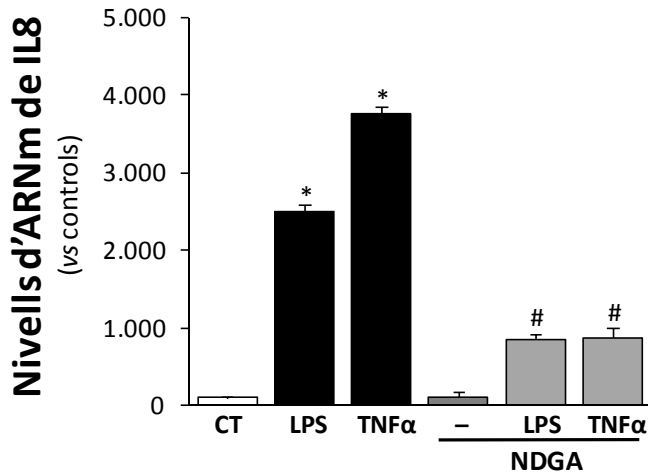
**Figura 68. El partenolide inhibeix la inducció de la via de NFκB per estímuls inflamatoris en CMLV.** Es van tractar CMLV amb LPS (100 ng/ml) o TNFα (50 ng/ml) durant 24 h en presència o absència d'un inhibidor de NF-κβ (partenolide; 1 μM). A) Els nivells d'ARNm de la CCL20 es van avaluar per PCR a temps real i es van normalitzar segons els nivells d'expressió de la GAPDH. Els resultats s'expressen com a mitjana ± SD (n=6 ; p<0,0001; \*,vs. control; #,vs. cèl·lules tractades amb LPS o TNFα). B) Immunocitoquímica realitzada en CMLV tractades amb LPS durant 60 min en presència o absència de partenolide (part; 1μM). La proteïna va ser detectada mitjançant la incubació amb un anticòs específic per p65.



**A**



**B**



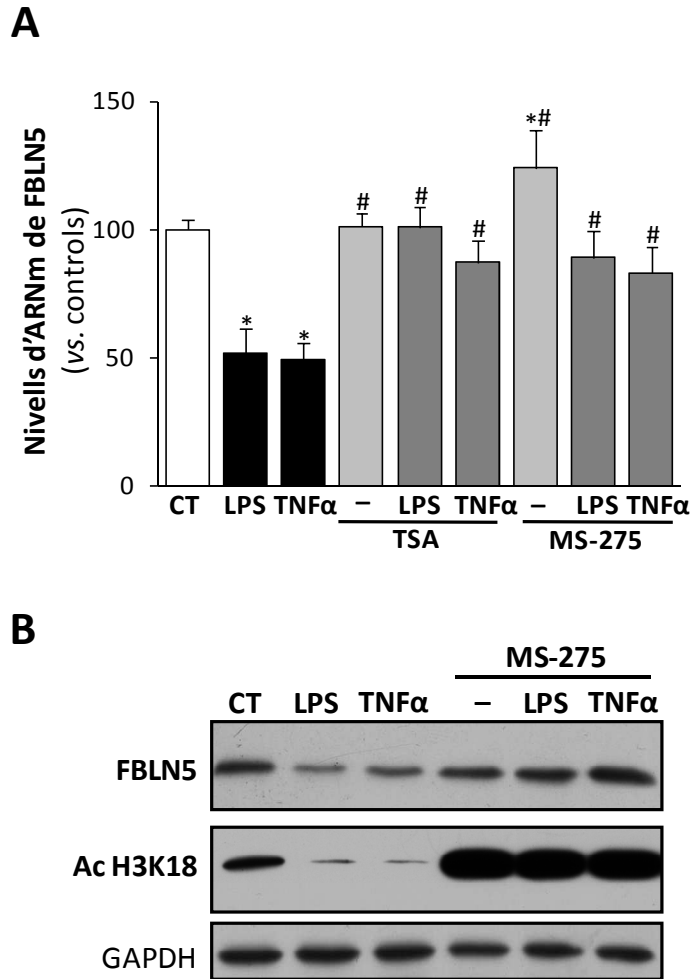
**Figura 69.** La regulació de la FBLN5 per estímuls inflamatoris en CMLV no és mediada per AP-1. Es van tractar CMLV amb LPS (100 ng/ml) o TNFα (50 ng/ml) durant 24 hores en presència o absència d'un inhibidor d'AP-1 (NDGA; 1µg/ml). A) Els nivells d'ARNm de la FBLN5 es van avaluar per PCR a temps real i es van normalitzar segons els nivells d'expressió de la TBP. B) Els nivells d'ARNm de la Interleuquina 8 (IL8) es van avaluar per PCR a temps real i es van normalitzar segons els nivells d'expressió de la GAPDH. Els resultats s'expressen com a mitjana ± SD (n=4 ; p<0,0001; \*vs. control; # vs. cèl·lules tractades amb LPS o TNFα)

#### 4.4. El tractament amb inhibidors de les HDACs normalitza l'expressió vascular de la FBLN5 alterada pels estímuls inflamatoris.

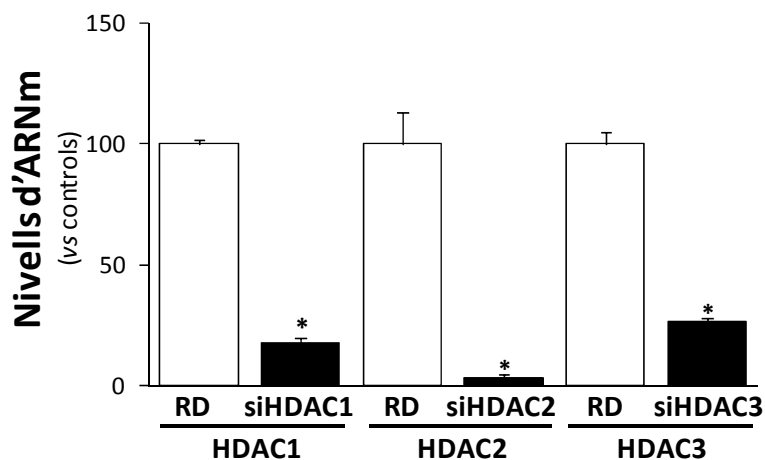
Els mecanismes epigenètics han emergit com a importants elements reguladors de l'expressió gènica. En aquest context, vam voler determinar si la inhibició de les HDACs podia afectar la regulació de la FBLN5 en condicions pro-inflamatòries. Concretament, vam utilitzar la tricostatina A (TSA), un inhibidor de les HDAC de classe I i II i el MS-275, un inhibidor selectiu de les HDACs de classe I. Les cèl·lules es van pretractar amb MS-275 o TSA 1 hora abans de l'estimulació amb LPS o TNF $\alpha$  durant 24 h. Els resultats mostren que tant el tractament amb TSA com amb MS-275 revertia la reducció dels nivells d'ARNm de la FBLN5 pels diferents estímuls inflamatoris (Fig. 70 A). Donat que el tractament amb MS-275 contrarestavat la inhibició de la FBLN5 amb una eficiència similar que el TSA aquest resultat suggeria que les HDACs de classe I eren les principals responsables d'aquest efecte. En concordança, l'anàlisi per *Western blot* corroborà que el pretractament amb MS-275 induïa l'expressió de la FBLN5 i prevenia completament la seva inhibició per estímuls inflamatoris (Fig. 70 B). Com era d'esperar, el MS-275 induïa l'acetilació d'histones, augmentant els nivells basals d'H3K18. Cal destacar que el tractament amb estímuls inflamatoris reduïa dràsticament el grau d'acetilació de la histona H3 a lisina 18 (H3K18) i que aquest efecte era contrarestat pel tractament amb MS-275 (Fig. 70 B).

Vam aprofundir en el paper que juguen les HDACs de classe I en la regulació de la FBLN5 mitjançant silenciament gènic amb siRNAs específics contra cadascuna d'elles. L'eficiència del silenciament de les HDAC 1, 2 i 3 es va corroborar mitjançant PCR a temps real (Fig. 71).

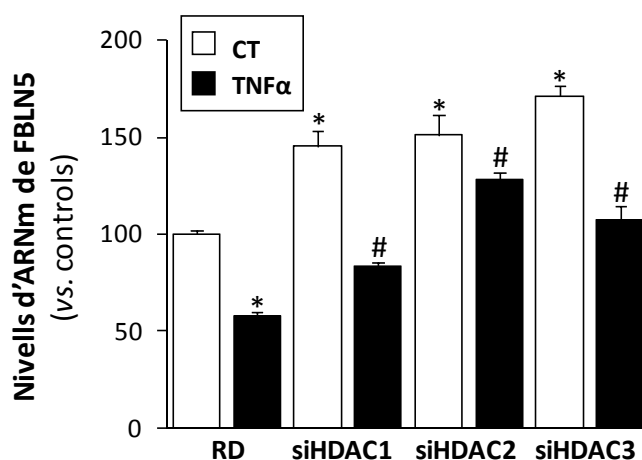
Els resultats mostren que el silenciament de les diferents HDACs induïa lleugerament l'expressió basal de la FBLN5 i revertia, totalment o parcial, la inhibició de l'expressió de la FBLN5 provocada pel tractament amb TNF $\alpha$  (Fig. 72).



**Figura 70.** El tractament amb inhibidors de HDAC normalitza l'expressió vascular de la **FBLN5 alterada pels estímuls inflamatoris**. A) Les CMLV es van incubar amb LPS (100 ng/ml) o TNFα (50 ng/ml) durant 24 h. En el cas pertinent, les cèl·lules es van pretractar amb un inhibidor de HDAC de classe I, MS-275 (2 μM) o amb un inhibidor de HDAC de classe I i II, tricostatina A (TSA; 1 μM) durant 1 h. Els nivells d'ARNm de FBLN5 es van avaluar per PCR a temps real i es normalitzaren segons els nivells d'expressió de GAPDH. Els resultats s'expressen com a mitjana ± SD (n=9; p<0,0001: \*, vs. cèl·lules control; p<0,01: #, vs. cèl·lules tractades amb LPS o TNFα en absència de MS-275 o TSA. B) Es van avaluar per *Western blot* els nivells proteics de FBLN5 i Ac H3K18 en mostres de CMLV tractades amb LPS o TNFα durant 24 h en presència o absència de l'MS-275 . Els nivells de la GAPDH es van utilitzar com a control de càrrega.

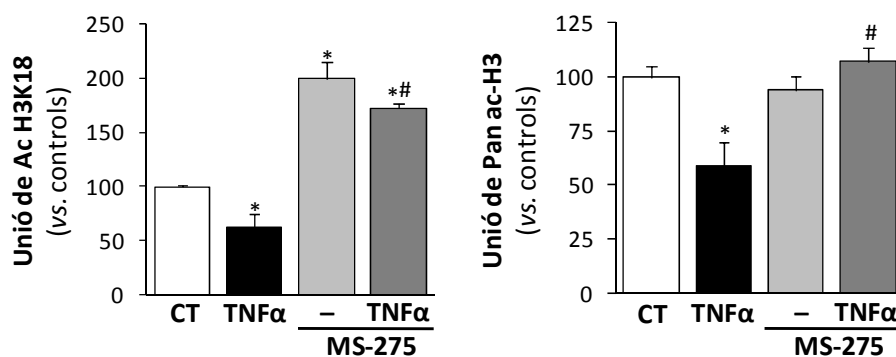


**Figura 71. Eficàcia de la inhibició específica de les HDACs de classe I amb siRNAs específics.** Es van transfectar CMLV amb un siRNA específic contra les diferents HDACs de classe I (siHDAC1, siHDAC2 i si HDAC3) o amb un siRNA control (siRAND) i se'n determinaren els nivells d'ARNm d'aquestes HDACs per PCR a temps real. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SD (n=9; \*p<0,01 vs. cèl·lules control transfectades amb siRAND).



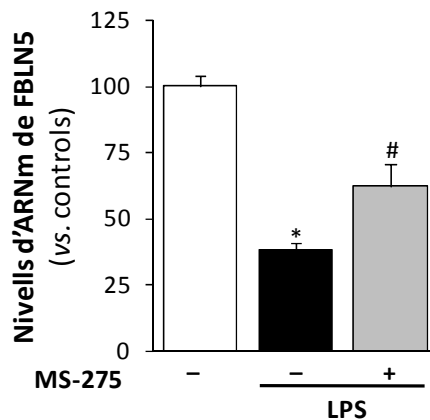
**Figura 72. La inhibició específica de les HDAC de classe I normalitza l'expressió de la FBLN5 alterada pels estímuls inflamatoris.** Les CMLV es van transfectar amb un siRNA específic contra les diferents HDACs de classe I (siHDAC1, siHDAC2 i si HDAC3) o amb un siRNA control (siRAND) i se'n determinaren els nivells d'ARNm de la FBLN5 en presència o absència de TNFα (50 ng/ml), per PCR a temps real. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM (n=9; \*p<0,0001 vs. cèl·lules control transfectades amb siRAND; # p<0,01 vs. cèl·lules tractades amb TNFα transfectades amb siRAND).

Per tal d'estudiar com el tractament amb estímuls inflamatoris podia afectar el grau d'acetilació d'histones del promotor de la FBLN5, vam realitzar un estudi d'immunoprecipitació de cromatina (ChIP) mitjançant un anticòs específic per a la Ac H3K18 i un per a la histona H3 acetilada en totes les lisines (K9 + K14 + K18 + K23 + K27). Els complexos DNA-proteïna immunoprecipitats es van analitzar per PCR a temps real mitjançant 4 parells d'oligonucleòtids que amplificaven diferents regions del promotor proximal de la FBLN5 entre la posició -721 i la -17 pb des de l'ATG. Únicament vam observar diferències en l'associació de la histona H3 acetilada a la regió de -353 pb fins a -204 pb. Els resultats obtinguts indiquen que el tractament amb TNF $\alpha$  provocava una disminució d'un 50% en l'associació de la histona H3 acetilada a aquesta regió proximal del promotor de la FBLN5, efecte observat en ambdues immunoprecipitacions. El tractament amb MS-275 prevenia completament aquesta inhibició (Fig. 73). L'absència de senyal en les mostres immunoprecipitades amb una IgG inespecífica va confirmar l'especificitat de la tècnica.



**Figura 73. El tractament amb MS-275 contrareasta la disminució en el reclutament d'histona H3 acetilada al promotor de la FBLN5.** Es va analitzar l'associació de la histona H3 acetilada al promotor de la FBLN5 *in vivo* mitjançant assajos de ChIP en CMLV estimulades amb TNF $\alpha$  (50 ng/ml) durant 24 h. En el cas pertinent, les cèl·lules es van pretractar amb un inhibidor de les HDAC de classe I, MS-275 (2  $\mu$ M) durant 1 h. La cromatina es va fragmentar per sonicació i es va immunoprecipitar amb un anticòs contra Ac H3K18, la histona H3 acetilada a totes les lisines (Pan ac-H3) o amb una IgG inespecífica de conill. L'associació de la histona H3 acetilada es va quantificar per PCR a temps real mitjançant oligonucleòtids específics per al promotor de la FBLN5. Les dades es normalitzaren respecte als valors obtinguts a l'*input* i es representa com a mitjana  $\pm$  SD de dos experiments independents realitzats en duplicat ( $p < 0,05$ ; \*, vs. cèl·lules control; #, vs. cèl·lules tractades amb TNF $\alpha$  en absència de MS-275).

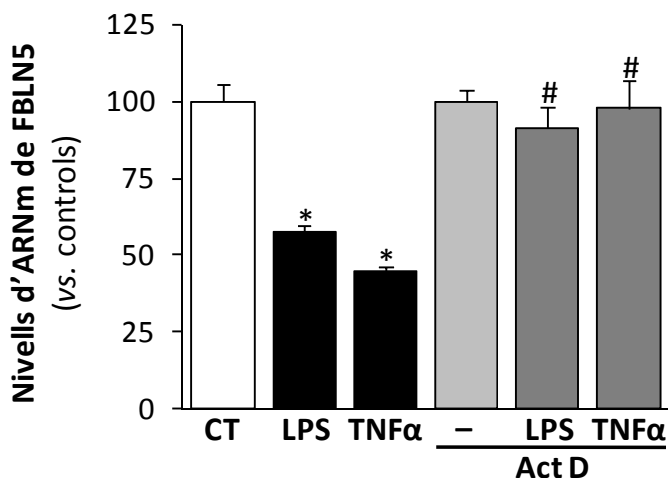
En concordança, en un estudi *in vivo* amb ratolins tractats amb LPS, el pretractament amb MS-275 (5 mg/kg) atenuava, en part, la inhibició de l'expressió de la FBLN5 induïda per LPS (Fig. 74).



**Figura 74. El pretractament amb MS-275 atenua la inhibició de l'expressió de la FBLN5 induïda per LPS en l'aorta del ratolí.** Es van determinar els nivells d'ARNm de FBLN5 a l'aorta de ratolins C57BL6/J als quals se'ls havia administrat sèrum salí (CT) o LPS (0,5 mg/kg) durant 24 h en presència o absència de MS-275 (5 mg/kg). Els resultats determinats per PCR a temps real i es normalitzaren segons els nivells d'expressió de TBP i s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM (n=6;  $p < 0,05$ :\*, vs. animals control ;#, vs. animals tractats amb LPS en absència de MS-275).

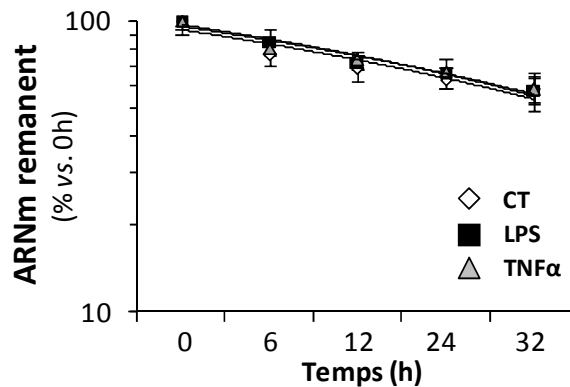
#### 4.5. Els estímuls inflamatoris disminueixen l'expressió de la FBLN5 mitjançant un mecanisme de regulació transcripcional

Per tal de caracteritzar els mecanismes moleculars implicats tant en la inhibició de la FBLN5 per estímuls inflamatoris com en la seva normalització per iHDACs, vam estudiar si aquesta regulació es duia a terme a nivell transcripcional. Vam pretractar les CMLV amb un inhibidor de la transcripció, l'actinomicina-D (ActD), durant 30 minuts abans de sotmetre-les als diferents estímuls inflamatoris durant 24 h. Els resultats mostren que l'ActD contrarestavava l'efecte dels diferents estímuls inflamatoris, suggerint que la inhibició de la FBLN5 es produïa a través d'un mecanisme transcripcional (Fig. 75).

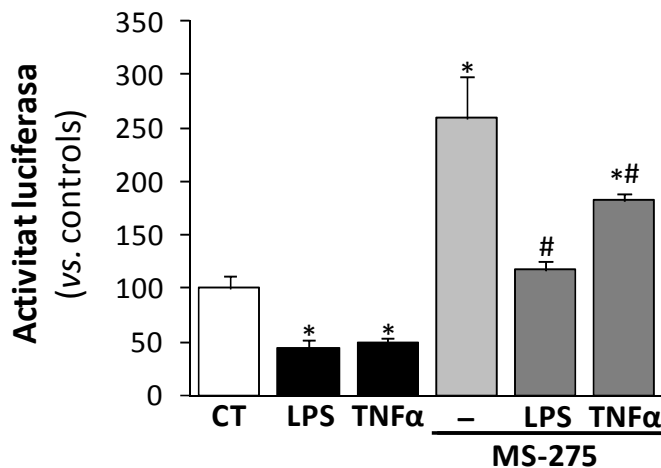


**Figura 75. Els estímuls inflamatoris redueixen l'expressió de la FBLN5 en CMLV mitjançant un mecanisme de regulació a nivell transcripcional.** Es van tractar CMLV amb LPS (100 ng/ml) o TNFα (50 ng/ml) durant 24 hores en presència o absència d'un inhibidor de la transcripció (Actinomicina-D; Act D; 1 μM). Els nivells d'ARNm de la FBLN5 es van avaluar per PCR a temps real i es van normalitzar segons els nivells d'expressió de la TBP. Els resultats s'expressen com a mitjana ± SD (n=6; p<0,0001 \*, vs. control; p<0,001 #, vs. animals tractats amb LPS o TNFα en absència d'ActD).

Paral·lelament, vam estudiar si els estímuls inflamatoris podien alterar l'estabilitat de l'ARNm. Amb aquest objectiu les CMLV es van tractar amb ActD 24 h després de l'estimulació amb LPS o TNFα. La disminució dels nivells d'ARNm un cop bloquejada la transcripció es va avaluar a diferents temps per PCR a temps real. Com s'observa a la Figura 76, el tractament amb LPS o TNFα no modificava l'estabilitat de l'ARNm de la FBLN5. La implicació d'un mecanisme transcripcional en la regulació de la FBLN5 es va confirmar en un estudi de transfecció transitòria. Les CMLV es van transfectar amb un vector reporter que conté un fragment de 1650 pb del promotor de la FBLN5 acoblat a luciferasa (pGL3/pFBLN5-1650). Com mostra la Figura 77, els diferents estímuls inflamatoris van inhibir l'activitat transcripcional del promotor de la FBLN5 fins a valors d'un 40-50%. En concordança amb els resultats obtinguts anteriorment, el tractament amb MS-275 va induir l'activitat transcripcional de la FBLN5 i va abolir l'efecte dels diferents estímuls inflamatoris.



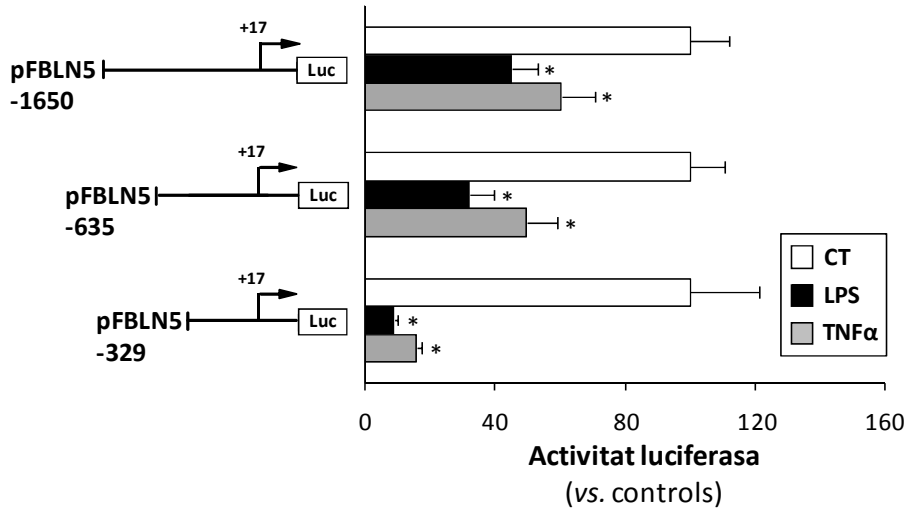
**Figura 76.** L'estabilitat del missatger de la FBLN5 no es veu alterada en condicions proinflamatòries. Efecte del tractament amb LPS i TNF $\alpha$  sobre la vida mitjana de l'ARNm de la FBLN5. Les CMLV es van tractar amb LPS durant 24 h. Passat aquest temps, les cèl·lules es van tractar amb Actinomomicina-D (t=0) i es van avaluar els nivells d'ARNm de la FBLN5 en cada condició experimental (6, 12, 24 i 32 h) per PCR a temps real. Les dades s'expressen com a % d'ARNm relatiu al t=0 per cada condició experimental i són la mitjana  $\pm$  SEM de n=3 experiments realitzats en duplicat.



**Figura 77.** El tractament amb estímuls inflamatoris inhibeix l'activitat del promotor de la FBLN5, efecte que es normalitza pel tractament amb iHDAC. Es van transfectar CMLV amb la construcció pGL3/pFBLN5-1650 i es van tractar amb LPS (100 ng/ml) o TNF $\alpha$  (50 ng/ml) durant 24 h en presència o absència d'un inhibidor de les HDAC de classe I, MS-275 (4  $\mu$ M). Es determinà l'activitat luciferasa tal i com es descriu a la secció *Metodologia*. Els valors d'activitat luciferasa s'indiquen com a unitats arbitràries referides als valors de pFBLN5-1650 sense tractament (CT). Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SD (n=5 ;p<0,05: \*, vs. control; p<0,01 #, vs. animals tractats amb LPS o TNF $\alpha$  en absència de MS-275).

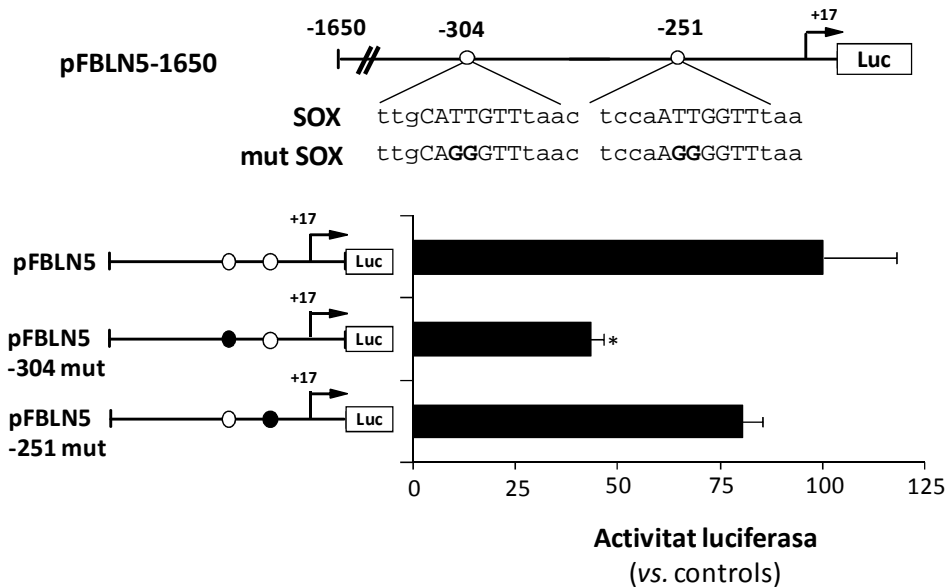


Mitjançant un estudi de delecions seriades del promotor de la FBLN5 vam acotar la regulació de la FBLN5 a la regió proximal de 329 pb des de l'ATG (Fig. 78). No vam poder establir més enllà la regió sensible als estímuls inflamatoris perquè la delecíó de les seqüències més proximals del promotor de la FBLN5 comporta la pèrdua de l'activitat transcripcional, tal i com ja havíem descrit prèviament nosaltres i altres grups [432], [498].



**Figura 78. La regió proximal de -329 pb del promotor de la FBLN5 és la responsable de la regulació de la FBLN5 per estímuls inflamatoris.** Es va analitzar l'activitat luciferasa de les construccions reporteres pGL3/pFBLN5-1650, pFBLN5-635 i pFBLN5-329 en CMLV tractades amb LPS (100 ng/ml) o TNF $\alpha$  (50 ng/ml) durant 24 h. Els valors d'activitat luciferasa s'expressen en relació als valors de pFBLN5-1650 sense tractament (CT). Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SD (n=5; \*p<0,01 vs. cèl·lules control).

Mitjançant l'anàlisi *in silico* d'aquesta regió proximal del promotor de la FBLN5 amb el programa *MatInspector*, es va identificar la presència de 2 elements putatius de resposta homòlegs a la seqüència heptamèrica consens SOX (A/T A C A A/T G) localitzats a -304 i -251 pb a partir del lloc d'inici de la transcripció (Fig. 79 panell superior) i conservada entre espècies. Per tal d'avaluar-ne la funcionalitat, vam realitzar estudis de mutagènesi dirigida. Tal i com mostra la Figura 79, la mutagènesi específica de l'element SOX situat a -304 pb inhibia significativament l'activitat transcripcional del promotor de la FBLN5, mentre que aquesta no es veia significativament afectada per la mutació de l'element més proximal situat a -251 pb.

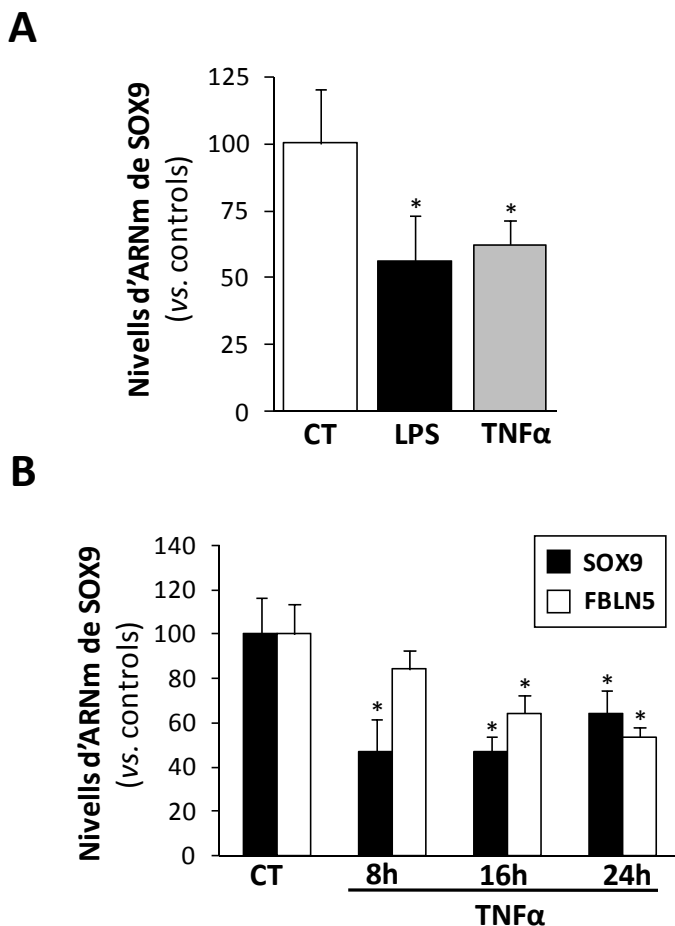


**Figura 79. Un element de resposta SOX és crític per l'activitat basal del promotor de la FBLN5.** Esquema representatiu de la regió del promotor de la FBLN5 analitzada en els estudis de transfecció transitòria on es mostra la localització de dos llocs d'unió putatius de SOX. Els canvis introduïts per mutagènesi dirigida es mostren en negreta (Panell superior). Es van transfectar CMLV amb la construcció reportera pFBLN5-1650 o amb la mateixa construcció amb un dels elements SOX mutats (pFBLN5-304 mut o pFBLN5-251 mut). Els valors d'activitat luciferasa s'indiquen com a unitats arbitràries referides als valors de pFBLN5. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SD (n=4; \*p<0,001 vs. pFBLN5).

Aquests resultats mostren que els estímuls inflamatoris inhibeixen la transcripció de la FBLN5 en cèl·lules vasculares i suggereixen que l'element consens SOX localitzat a -304 pb és crític per a l'activitat basal del promotor de la FBLN5.

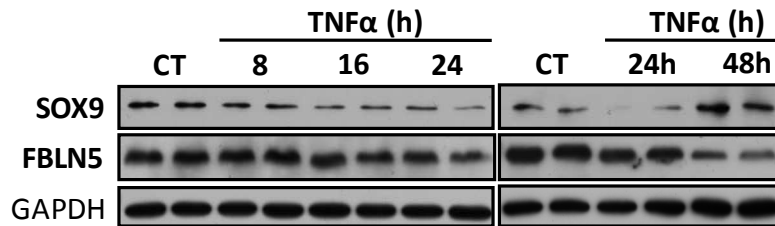
#### 4.6. L'expressió vascular de SOX9 és inhibida en l'AAA i per estímuls inflamatoris en CMLV.

Entre els membres de la família SOX, el SOX9 participa en el control de gens implicats en la síntesi/deposició de MEC. Vam observar que els nivells d'ARNm de SOX9 eren inhibits en CMLV estimulades amb LPS o TNF $\alpha$  durant 24 h (Fig. 80 A) i que aquesta inhibició precedia la reducció de l'expressió de la FBLN5 (Fig. 80 B).



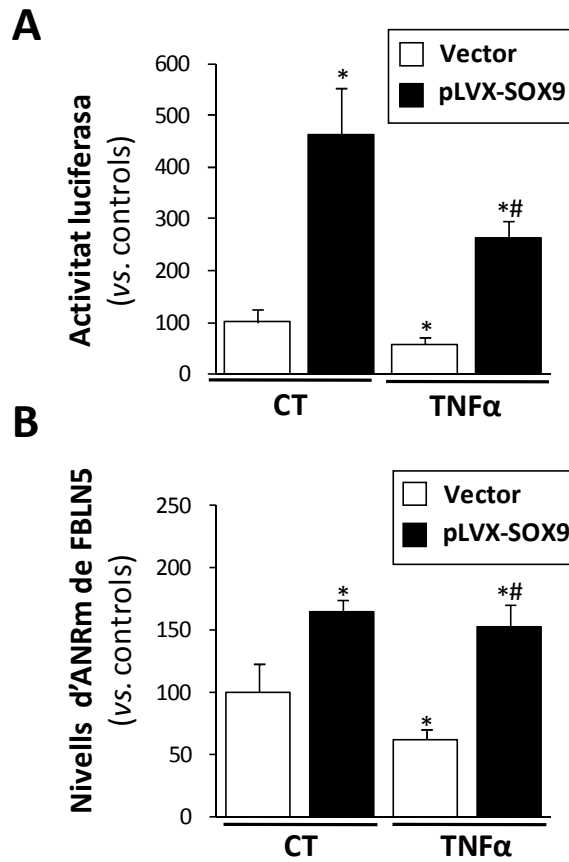
**Figura 80. L'expressió de SOX9 s'inhibeix pel tractament amb estímuls inflamatoris en CMLV.** A) Es van determinar els nivells d'ARNm de SOX9 en CMLV tractades amb LPS (100 ng/ml) o TNF $\alpha$  (50ng/ml) durant 24 h mitjançant PCR a temps real i es van normalitzar segons els nivells d'expressió de la GAPDH. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM (n=6; \*p<0,0001 vs. control). B) Es van tractar CMLV amb TNF $\alpha$  (50 ng/ml) durant diferents temps (8, 16 i 24 h). Els nivells d'ARNm de SOX9 es van avaluar per PCR a temps real i es normalitzaren segons els nivells d'expressió de la GAPDH. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SD (n=6; \*p<0,01 vs. control).

En el mateix sentit, vam observar una disminució significativa dels nivells proteics de SOX9 en CMLV estimulades amb TNF $\alpha$  a diferents temps (8, 16 i 24 h) que precedia la inhibició proteica de la FBLN5 (48 h) (Fig. 81).

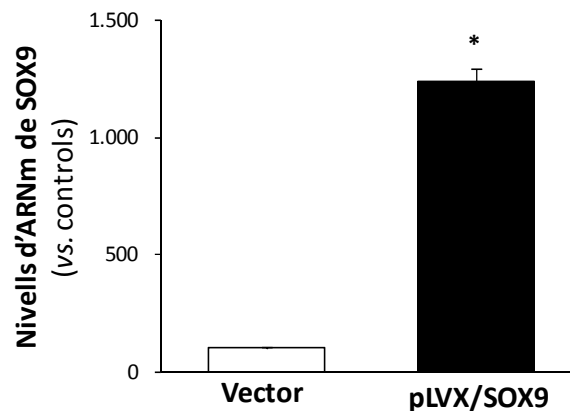


**Figura 81. Els nivells proteics de SOX9 s'inhibeix pel tractament amb estímuls inflamatoris en CMLV.** Es van tractar CMLV amb TNF $\alpha$  (50 ng/ml) durant diferents temps (8, 16 i 24 h). Els nivells proteics de SOX9 i FBLN5 es van avaluar per *Western blot* a partir d'extractes cel·lulars totals. Els nivells de GAPDH es van utilitzar com a control de càrrega.

Seguidament, vam determinar si SOX9 podria unir-se directament al promotor de la FBLN5 i explorar com els estímuls inflamatoris podien afectar aquesta interacció. Estudis de co-transfecció transitòria amb una construcció que conté el promotor de la FBLN5 acoblat a luciferasa i un vector d'expressió de SOX9 van demostrar que la sobre-expressió de SOX9 induïa significativament l'activitat basal del promotor de la FBLN5 i contrarestavava la inhibició provocada pel tractament amb TNF $\alpha$  (Fig. 82 A). En concordança, la sobre-expressió de SOX9 mitjançant la transducció lentiviral va induir molt significativament l'expressió de la FBLN5 i va prevenir completament la inhibició d'aquesta per TNF $\alpha$  (Fig. 82 B). L'eficiència de la sobre-expressió de SOX9 es va corroborar mitjançant PCR a temps real (Fig. 83).

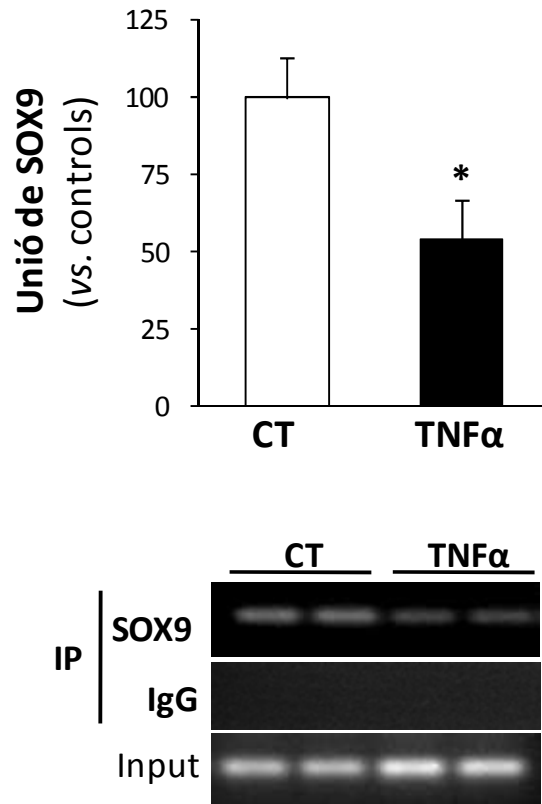


**Figura 82. La sobre-expressió de SOX9 normalitza l'activitat transcripcional i l'expressió de la FBLN5 inhibida per estímuls inflamatoris.** Es van co-transfectar CMLV amb la construcció pGL3/pFBLN5-1650 i un vector lentiviral que codificava SOX9 (LV-SOX9; barres blanques) o amb el corresponent vector buit (Vector; barres negres). Les cèl·lules es van tractar amb TNF $\alpha$  (50 ng/ml) durant 24 h. A) Els valors d'activitat luciferasa s'indiquen com a unitats arbitràries referides als valors de pFBLN5-1650/Vector sense tractament (CT). B) Els nivells d'ARNm de FBLN5 es van avaluar per PCR a temps real i es normalitzaren segons els nivells d'expressió de la GAPDH. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SD (n=6; p<0,05: \*, vs. vector; p<0,0001 #, vs. vector tractat amb TNF $\alpha$ ).



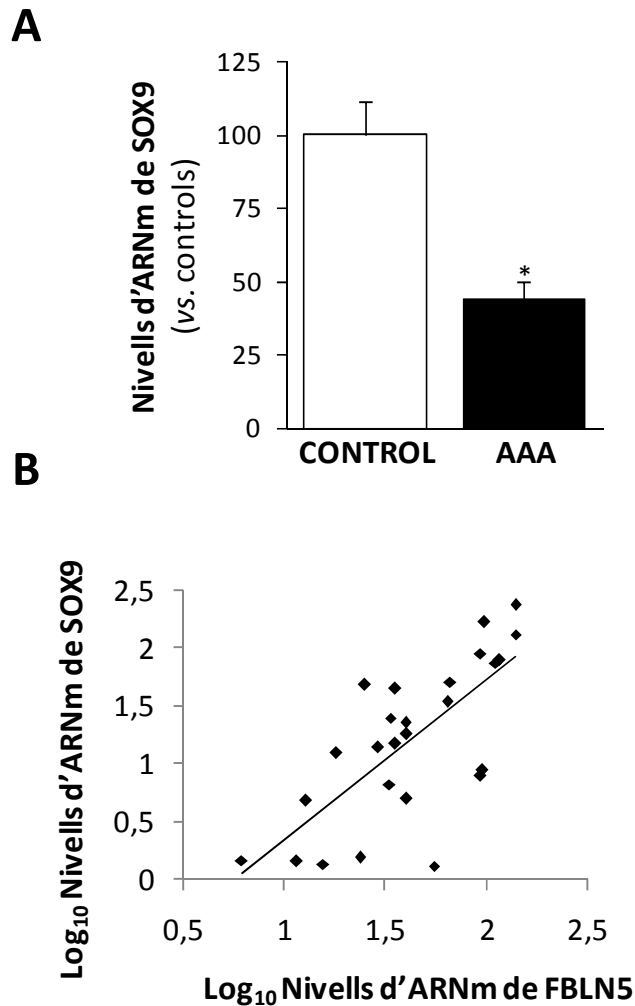
**Figura 83. Eficiència de la transducció lentiviral en CMLV.** Es van transduir CMLV amb el vector d'expressió lentiviral pLVX/SOX9 o amb el corresponent vector buit. L'expressió de SOX9 es va confirmar per PCR a temps real i es normalitzaren segons els nivells d'expressió de la GAPDH. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SD ( $n=6$ ;  $p<0,0001$  \*, vs. vector).

La possible interacció de SOX9 amb el promotor de la FBLN5 es va confirmar mitjançant ChIP amb un anticòs específic per a SOX9. Els complexos DNA-proteïna immunoprecipitats es van analitzar per PCR a temps real mitjançant un parell d'oligonucleòtids que flanquegen la regió -353 a -204 pb del promotor proximal de la FBLN5 que comprèn l'element putatiu SOX9 situat a -304 pb (descrits en l'apartat *Resultats* 4.4.). Els resultats van indicar que el tractament amb TNF $\alpha$  disminuïa, en un 50 %, la unió de SOX9 al promotor de la FBLN5 (Fig. 84). L'absència de senyal en les mostres immunoprecipitades amb una IgG inespecífica va confirmar l'especificitat de la tècnica. Aquests resultats suggereixen que en condicions inflamatòries la inhibició de l'expressió de SOX9 s'associa amb una reducció de la unió d'aquest factor de transcripció al promotor de la FBLN5, mecanisme que seria responsable de la inhibició de la FBLN5.



**Figura 84. El tractament amb TNF $\alpha$  inhibeix el reclutament de SOX9 al promotor de la FBLN5.** Es va analitzar l'associació de SOX9 al promotor de la FBLN5 *in vivo* mitjançant assajos de ChIP en CMLV tractades amb TNF $\alpha$  (50 ng/ml) durant 24h. La cromatina es va fragmentar per sonicació i es va immunoprecipitar amb un anticòs contra SOX9 o amb una IgG inespecífica de conill. L'enriquiment en seqüències unides a SOX9 es va quantificar per PCR a temps real mitjançant oligonucleòtids específics per al promotor de la FBLN5. Es mostren els resultats de l'anàlisi per PCR a temps real corresponent a l'amplificació del promotor de la FBLN5. Les dades es normalitzaren respecte els valors obtinguts a l'*input* i es representen com a mitjana  $\pm$  SD de dos experiments independents realitzats per duplicat (  $p < 0,05$ : \*, vs. cèl·lules control;  $p < 0,005$ ).

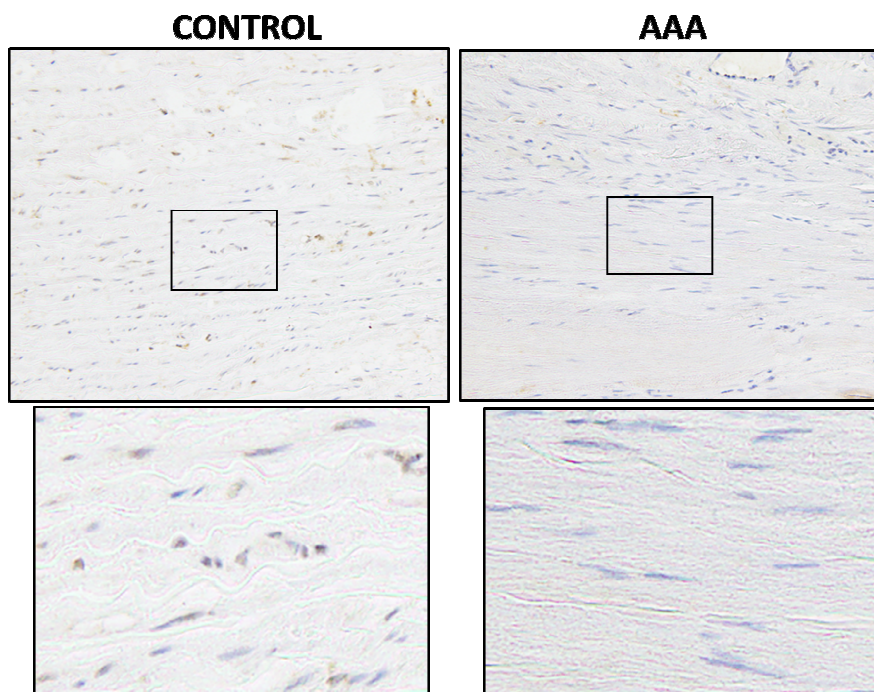
Per establir la possible significació fisiopatològica de la regulació de SOX9 per estímuls inflamatoris vam analitzar la seva expressió en l'AAA. Com mostra la Figura 85 A, els nivells d'expressió vascular de SOX9 eren significativament inferiors a l'aorta de pacients amb AAA comparat amb aortes sanes. Vam observar una forta correlació entre l'expressió vascular de SOX9 i de FBLN5 (Fig. 85 B).



**Figura 85. Les mostres d'AAA presenten una disminució dels nivells d'ARNm de SOX9.** A) Els nivells d'ARNm de SOX9 en mostres d'AAA i d'aortes abdominals no aneurismàtiques (CT) es van determinar per PCR a temps real i es van normalitzar segons els nivells d'expressió de la  $\beta$ -actina. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM (CT: n=7, AAA, n=17; \* $p < 0,03$  vs. mostres control). B) Correlació positiva entre l'expressió vascular de SOX9 i FBLN5 en mostres de pacients amb AAA i aortes sanes ( $r^2=0.58$ ;  $p=0.76$ ).



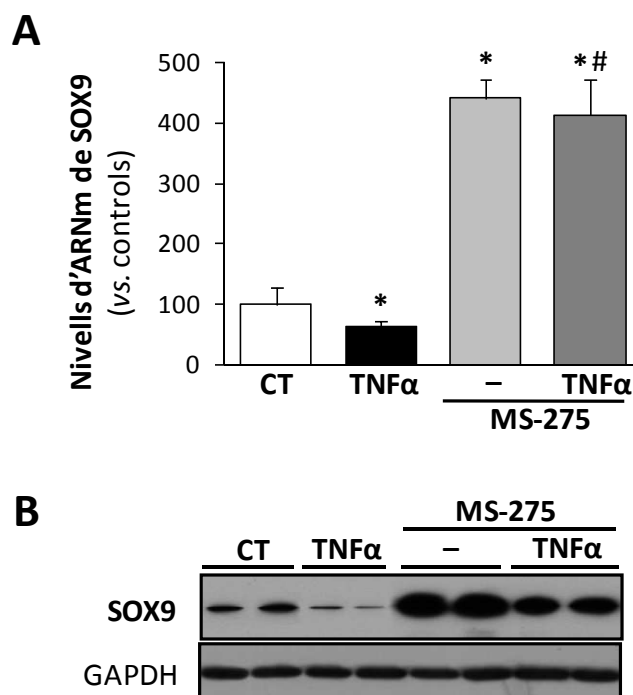
La disminució de l'expressió de SOX9 en mostres d'AAA es va confirmar també a nivell proteic mitjançant immunohistoquímica (Fig. 86).



**Figura 85. Reducció dels nivells proteics de SOX9 en l'AAA.** L'expressió de SOX9 en mostres CT i AAA es va visualitzar mitjançant immunohistoquímica. Les imatges mostren l'estructura de la paret arterial mitjançant tinció d'hematoxilina amb la contratinció de la immunotinció específica de la SOX9. Totes les seccions es van tallar a 5  $\mu$ m de gruix. Les àrees indicades es mostren a un major augment.

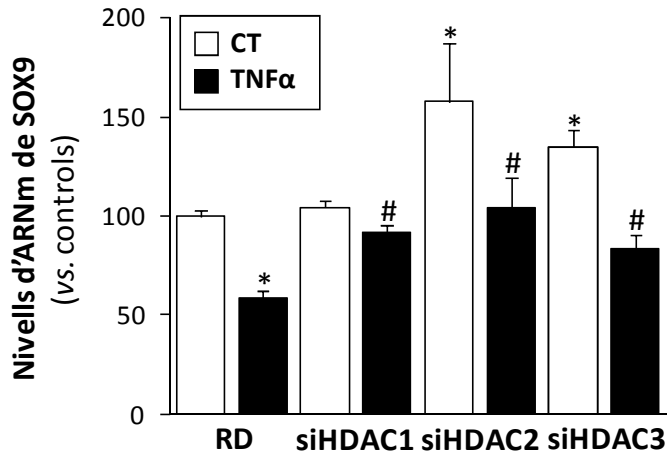
#### 4.7. L'expressió de SOX9 és induïda pel tractament amb iHDAC limitant així la inhibició de FBLN5 per estímuls inflamatoris

Finalment, vam analitzar la possible implicació de SOX9 en la regulació de l'expressió de la FBLN5 per iHDAC. El tractament de CMLV amb MS-275 induïa molt significativament l'expressió basal de SOX9 prevenint completament la inhibició d'aquest factor de transcripció per estímuls inflamatoris tant a nivell d'ARNm (Fig. 87 A) com a nivell de proteïna (Fig. 87 B).



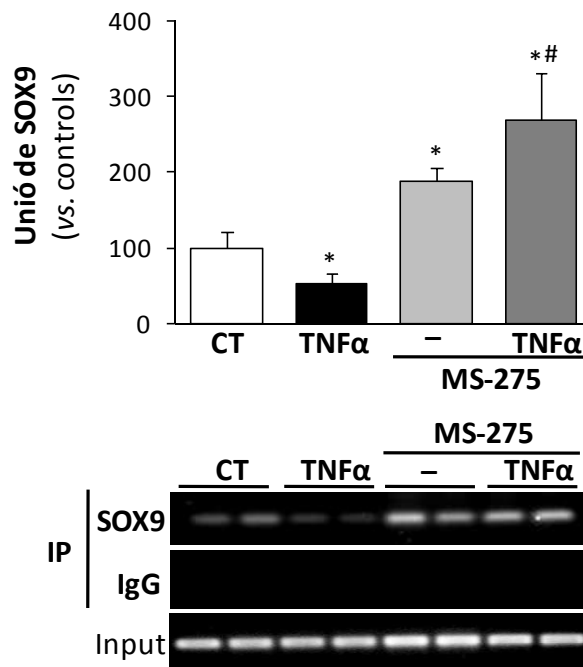
**Figura 87. El tractament amb iHDAC normalitza l'expressió vascular de SOX9 alterada pels estímuls inflamatoris.** Es van tractar CMLV amb TNF $\alpha$  (50 ng/ml) en presència o en absència de MS-275 (2  $\mu$ M) durant 24 hores. A) Els nivells d'ARNm de SOX9 es van avaluar per PCR a temps real i es normalitzaren segons els nivells d'expressió de la GAPDH. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SD (n=6; p<0,03: \*, vs. control; p<0,0001 #, vs. cèl·lules tractades amb estímuls inflamatoris en absència de MS-275. B) Els nivells proteics de SOX9 es van avaluar per *Western blot* a partir d'extractes cel·lulars totals. Els nivells de GAPDH es van utilitzar com a control de càrrega.

En el mateix sentit, el silenciament de les diferents HDACs també contrarestavava la disminució dels nivells d'ARNm de SOX9 pel tractament amb estímuls inflamatoris (Fig. 88).



**Figura 88. La inhibició específica de les HDAC de classe I normalitza l'expressió de SOX9 alterada pels estímuls inflamatoris.** Es van transfectar CMLV amb un siRNA específic contra les diferents HDACs de classe I (siHDAC1, siHDAC2 i si HDAC3) o amb un siRNA control (siRAND) i se'n determinaren els nivells d'ARNm de SOX9 en presència o absència de TNFα (50 ng/ml), per PCR a temps real. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM (n=9; \*p<0,05 vs. cèl·lules control transfectades amb siRAND; # p<0,05 vs. cèl·lules tractades amb TNFα transfectades amb siRAND).

Finalment, vam determinar com la inhibició de les HDACs podria afectar la unió de SOX9 al promotor de la FBLN5 mitjançant un estudi de CHIP. Els resultats obtinguts indiquen que el pretractament amb MS-275 induïa la unió de SOX9 al promotor de la FBLN5 i revertia completament la regulació de SOX9 pel tractament amb TNF $\alpha$  (Fig. 89). Aquests resultats recolzen la hipòtesi que la modulació de SOX9 per iHDAC prevé la inhibició de la FBLN5 per estímuls inflamatoris.



**Figura 89. El tractament amb MS-275 contraresta la disminució en el reclutament de SOX9 al promotor de la FBLN5 en condicions proinflamatòries.** Es va analitzar l'associació de SOX9 al promotor de la FBLN5 *in vivo* mitjançant assajos de CHIP en CMLV tractades amb TNF $\alpha$  (50 ng/ml) durant 24h. En el cas pertinent, es van pretractar les cèl·lules amb un inhibidor de les HDAC de classe I, MS-275 (4 $\mu$ M) durant 1 h. La cromatina es va fragmentar per sonicació i es va immunoprecipitar amb un anticòs contra SOX9 o amb una IgG inespecífica de conill. L'enriquiment en seqüències unides a SOX9 es va quantificar per PCR a temps real mitjançant oligonucleòtids específics per al promotor de la FBLN5. Es mostren els resultats de l'anàlisi per PCR a temps real corresponent a l'amplificació del promotor de la FBLN5. Les dades es normalitzaren respecte els valors obtinguts a l'*input* i es representen com a mitjana  $\pm$  SD de dos experiments independents realitzats en duplicat ( $p < 0,05$ : \*, vs. cèl·lules control;  $p < 0,005$ : #, vs. cèl·lules tractades amb TNF $\alpha$  en absència de MS-275).



# DISCUSSION



## 1- GENERACIÓ I CARACTERITZACIÓ D'UN ANIMAL TRANSGÈNIC QUE SOBRE-EXPRESSA LA LOX ESPECÍFICAMENT EN CML

Els nostres estudis previs van demostrar que la LOX juga un paper crucial en l'homeòstasi de l'endoteli vascular [251], [253], [256], [337], [499]; tanmateix, el paper d'aquest enzim en el remodelat vascular i en la funció de les CMLV, que participen activament en la formació i l'engruiximent de la neoíntima en l'ateroscleròsi i la restenosi, segueix essent controvertit [262], [341]. Dos grups d'investigació independents van demostrar que la deleció de la LOX té unes conseqüències dramàtiques en el desenvolupament del sistema respiratori i cardiovascular produint la mort gestacional tardana [221], [222]. Els embrions de ratolins  $LOX^{-/-}$  mostren anormalitats greus del sistema vascular amb una deposició de col·lagen i d'elastina aberrant i alteracions fenotípiques de les CMLV que suggereixen el paper clau d'aquest enzim en el control de la funció cardiovascular. En aquest context, les funcions biològiques que exerceix la LOX no poden ser dutes a terme pels altres membres de la família (*LOX-likes*) [281]. Degut al fet que els animals *knockout* de LOX són inviables i amb l'objectiu d'estudiar més a fons el paper de la LOX en la fisiopatologia de la paret arterial, hem desenvolupat un model animal transgènic que sobre-expressa aquesta proteïna sota el control del promotor de la SM22 $\alpha$ , el qual dirigeix l'expressió específicament a CML.

El nostre model de ratolí transgènic mostra un desenvolupament embrionari normal arribant a l'edat adulta sense cap anormalitat fenotípica evident en el pes corporal, en la pressió arterial ni en els paràmetres cardíacs. L'anàlisi de l'expressió de la LOX humana per PCR a temps real en diferents òrgans dels animals transgènics ens ha permès comprovar que, efectivament, l'animal presenta una forta expressió de la LOX humana en aquells teixits rics en CML com l'úter o la bufeta, així com l'aorta i altres vasos (artèries caròtides). Aquest patró observat coincideix amb el descrit per al promotor SM22 $\alpha$  que conté dues caixes CARG essencials per a que l'expressió sigui dirigida específicament a CML [500]–[502]. L'anàlisi dels nivells de proteïna LOX en talls histològics d'aorta i caròtida ha permès confirmar la seva sobre-expressió a nivell proteic i que aquesta es troba localitzada a la capa mèdia d'aquests vasos. En concordança amb les dades obtingudes per immunohistoquímica, l'anàlisi per immunocitoquímica en cultius primaris de CML procedents dels ratolins TgLOX



mostren una forta tinció de la LOX al citosol que s'estén des del nucli fins a la membrana cel·lular, en concordança amb el patró de tinció prèviament descrit per la LOX en diversos tipus cel·lulars inclòs CMLV[261], [268]. Les cèl·lules procedents dels animals transgènics sobre-expressen la forma immadura proLOX, la qual és processada i secretada correctament a l'espai extracel·lular produint nivells elevats de LOX madura i enzimàticament activa. En aquest sentit, hem detectat un augment en l'entrecreuament del col·lagen (col·lagen madur) a la paret vascular dels ratolins transgènics així com una major capacitat dels sobrenedants procedents del cultiu de les CMLV dels ratolins transgènics per polimeritzar el col·lagen. Així, els nostres resultats indiquen que el transgèn de la LOX s'expressa correctament i que aquesta és processada i secretada a l'espai extracel·lular on indueix la maduració del col·lagen de la MEC, esdevenint una matriu més estable i insoluble.

## 2- AVALUACIÓ DEL PAPER DE LA LOX EN EL REMODELAT VASCULAR INDUÏT PER LIGACIÓ DE L'ARTÈRIA CARÒTIDA

En els últims anys ha sorgit un interès creixent per l'estudi de la biologia de la LOX i la seva repercussió fisiopatològica degut al caràcter multifuncional que té aquest enzim, més enllà del seu paper en el manteniment de l'estructura de la MEC. El descobriment de l'activitat biològica del seu pro-pèptid i l'existència de formes intracel·lulars actives obre noves expectatives pel que fa a les funcions cel·lulars que la LOX pot desenvolupar [261].

En aquest context, hem determinat que la LOX juga un paper clau en el control de la funció de les CMLV ja que la seva sobre-expressió causa una disminució significativa de la taxa de proliferació observada tant en les CMLV procedents dels ratolins TgLOX com en les CMLV humanes que sobre-expressen la LOX mitjançant un sistema lentiviral. En el mateix sentit, les cèl·lules que sobre-expressen la LOX presenten una disminució concomitant de l'expressió de PCNA i MYH10, marcadors de proliferació i canvi fenotípic de les CML respectivament [503]. A més, aquestes mostren una disminució de la inducció per SFB de les vies senyalització Akt i ERK-1/2, dues vies involucrades en la proliferació de les CMLV i la restenosi i que alhora són inhibides per la LOX en diferents tipus cel·lulars [266], [313], [314], [488].

Els estudis de migració en cambres de Boyden mostren que les cèl·lules que sobre-expressen la LOX presenten un lleuger augment en la quimiotaxis en resposta a PDGF respecte de les cèl·lules control, en concordança amb resultats previs que relacionen la LOX amb la resposta quimiotàctica induïda per aquest factor de creixement [341]. Tanmateix, en estudis de reparació de ferida, les CMLV procedents dels ratolins TgLOX mostraven una menor capacitat invasiva que les cèl·lules control. Considerant que els experiments de reparació de ferida reflecteixen la capacitat combinada de les cèl·lules per migrar i proliferar, els nostres resultats suggereixen que ambdues capacitats són atenuades en les CMLV dels ratolins TgLOX prevalent sobre el paper que pot jugar la LOX en la quimiotaxis induïda per un estímul exogen com és el PDGF.

A nivell fisiopatològic, hem determinat que la sobre-expressió de la LOX limita la formació de neointima en un model de lligadura d'artèria caròtida. Cal assenyalar els resultats inconcloets i discordants que es reflectien en aproximacions anteriors que tenien l'objectiu d'analitzar el paper de la LOX en la regulació de la proliferació cel·lular, la migració i la senyalització [262], [341]. Mentre que el tractament amb estímuls proliferatius de CMLV adultes de rata augmentava l'expressió de la LOX, en CMLV neonatals de rata, la taxa de proliferació i els nivells d'expressió de LOX eren inversament proporcionals [504]. De la mateixa manera, s'havia observat una inducció de l'expressió de LOX en models animals després d'una lesió intravascular [344], [505]; però no quedava clar que aquesta inducció estigués associada amb el remodelat vascular. A més, mentre que en un estudi previ d'angioplàstia en conills, la inhibició de la LOX no afectava la reducció de la llum del vas per angioplàstia [351], més recentment, s'ha descrit que aquesta mateixa estratègia limita la restenosi en el mateix model animal [352]. En aquest context, els nostres resultats estan d'acord amb aquells que suggereixen un paper antiproliferatiu de la LOX i indiquen que aquest enzim redueix la formació de neointima mitjançant la inhibició de la proliferació de les CMLV. Els efectes observats en el nostre model podrien també estar relacionats amb les propietats antiproliferatives del propèptid de la LOX [262]. S'ha descrit que en CMLV neonatals d'aorta de rata, el LOX-PP inhibeix la proliferació cel·lular i l'activació de la via ERK-1/2 i que és responsable de la inhibició del creixement de fibroblasts NIH3T3 mediada per LOX. Anàlogament, en cèl·lules NIH3T3 transformades per RAS, el LOX-PP limita l'activació de la via de senyalització fosfatidilinositol 3-quinasa, Akt, Erk1/2 quinasa i NF-κB.

Els mecanismes implicats en la reducció de la taxa proliferativa de les CMLV dels ratolins TgLOX poden ser múltiples. La MCP-1 és una citosina proinflamatòria involucrada en proliferació i migració i de vital importància en la formació de neoíntima [79]–[81]. El nostre model presenta una menor expressió de MCP-1 a la neoíntima de les artèries caròtides lligades dels ratolins transgènics així com una reducció en l'expressió i secreció d'aquesta citosina en les CMLV dels ratolins transgènics en concordança amb dades prèvies en CMLV de rata que sobre-exprimen la LOX mitjançant un sistema adenoviral [356]. La reducció de l'expressió vascular de MCP1 en cultius cel·lulars de CMLV és coherent amb la menor capacitat d'invasió de les CMLV que sobre-exprimen la LOX, observada en els estudis de reparació de ferida [506], [507].

Cal destacar que la majoria de resultats discordants relacionats amb la determinació del paper de la LOX en la funció cel·lular provenen d'estudis realitzats amb construccions que inclouen seqüències Tag en els seus extrems C-terminal, o amb construccions on s'han deletat les seqüències indispensables per a la seva secreció alterant així la seva localització subcel·lular i activitat biològica. En el nostre estudi hem sobre-exprimat la Pro-LOX sencera i hem comprovat que aquesta es secreta i processa correctament donant la forma madura i catalíticament activa, fet que suporta la rellevància biològica dels nostres resultats.

En resum, els nostres resultats evidencien que la LOX juga un paper crític en la proliferació de les CMLV així com en el remodelat vascular, i hem validat un nou model animal que pot ser una eina fonamental per tal de millorar el nostre coneixement sobre la funció de la LOX en el control de la biologia vascular.

### 3- CARACTERITZACIÓ DELS MECANISMES DE REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE LA FBLN5 PER ESTÍMULS INFLAMATORIS EN CMLV EN RELACIÓ AMB EL COMPONENT INFLAMATORI DE L'AAA.

Malgrat els grans avenços en la comprensió de l'AAA, el coneixement sobre els mecanismes subjacents al seu desenvolupament és molt limitat. Cal destacar que, en aquest moment, les mesures terapèutiques disponibles es redueixen a la intervenció quirúrgica dels AAA que presenten un alt risc de ruptura, essent el diàmetre de l'aorta > 5-5,5 cm l'únic marcador de progressió de la malaltia i de risc de ruptura conegut. Així mateix, no es disposa d'eines farmacològiques que limitin la progressió o promoguin la regressió dels AAA ja establerts. La importància del remodelat de la MEC en l'expansió de l'AAA ha centrat gran part dels esforços en el desenvolupament d'estratègies terapèutiques destinades a limitar la progressió d'aquesta patologia. De fet, estratègies dirigides a preservar l'estabilitat de l'elastina han aconseguit reduir l'inici i la progressió dels AAA en models animals [508].

En l'àmbit de la recerca de noves dianes terapèutiques en l'AAA, hem centrat el nostre interès en la FBLN5 una proteïna elastogènica essencial per a la formació correcta de les fibres elàstiques i la vasculogènesi que juga un paper determinant en el desenvolupament, el remodelat i la reparació tissular [360], [361], [363], [364]. Una expressió anormal de la FBLN5 s'ha associat a processos patològics com la malaltia obstructiva pulmonar crònica [509], la cutis laxa [411], [412], la degeneració macular [413], [510], el prolapse pèlvic [386], [410] i la progressió tumoral [415], [421]. Per primera vegada, el nostre estudi descriu la inhibició de l'expressió de la FBLN5 en mostres d'aorta aneurismàtica, associa aquesta regulació amb el component inflamatori de l'AAA i determina la implicació de mecanismes epigenètics en aquesta resposta.

L'anàlisi de l'expressió de la FBLN5 en mostres procedents de pacients amb AAA ha revelat una forta disminució en l'expressió de la FBLN5 en aquests individus. Aquests resultats confirmen dades publicades recentment en les quals, mitjançant aproximacions transcriptòmiques i proteòmiques han identificat la FBLN5 com un gen diferencialment expressat en l'AAA, tot i que els resultats d'aquests estudis no han estat validats per cap altre mètode [511], [512].

En el nostre treball, hem confirmat, mitjançant *Western blot* i immunohistoquímica, la inhibició de la FBLN5 en mostres d'AAA en comparació amb l'aorta de donants sans. La FBLN5, al ser una proteïna que es secreta, podria ser un potencial biomarcador per a aquesta malaltia. Tanmateix, fins al moment no existeixen kits comercials d'ELISA amb una sensibilitat adequada per a la seva detecció. En aquest àmbit, hem descrit que els nivells proteics de la FBLN5 es veien significativament reduïts en els secretomes de les mostres aneurismàtiques, mostres que s'han utilitzat prèviament per validar potencials biomarcadors d'aquesta malaltia [513].

Una de les característiques de l'AAA és la reducció en el contingut CMLV a la mèdia que podria subjau la reducció en l'expressió de la FBLN5 observada en les mostres aneurismàtiques. Tanmateix, les nostres dades d'immunohistoquímica mostraven una expressió feble de la FBLN5 també en les zones riques en CMLV. A més, tant els estudis en CMLV en cultiu com les aproximacions *in vivo* en ratolins tractats amb LPS, sostenen que el component inflamatori juga un paper determinant en la inhibició de la FBLN5 a la paret vascular.

Anàlogament, s'ha descrit una disminució de l'expressió de la FBLN5 en mostres de dissecció aòrtica, una patologia en què també es produeix un remodelat advers de la MEC [514]. Donat el seu paper en el procés d'elastogènesi, la reducció dels nivells de FBLN5 en l'AAA pot ser una de les causes de la desorganització de les fibres elàstiques típica d'aquesta patologia. De fet, ratolins deficientes en FBLN5 mostren una greu desorganització de les fibres elàstiques que comporta la pèrdua de les propietats biomecàniques d'elasticitat i resiliència de les artèries, anàlogament al que succeeix en els AAA.

Hem determinat que l'expressió vascular de la FBLN5 es regula per mecanismes epigenètics mitjançant la modificació del grau d'acetilació de les histones, un mecanisme prèviament descrit per altres membres de la família com és la FBLN1 [515]. En CMLV humanes, la inhibició específica de les HDAC de classe I (mitjançant el tractament amb MS-275 o el silenciament gènic) abolia la inhibició de la FBLN5 per estímuls inflamatoris. L'efecte del MS-275 va ser confirmat *in vivo*, en ratolins tractats amb LPS, fet que sustentava la hipòtesi que l'acetilació de les histones pot controlar la transcripció de la FBLN5. En

CMLV, els estímuls inflamatoris reduïren els nivells globals d'acetilació de la histona H3 tal i com s'ha descrit per altres tipus cel·lulars [516], [517], i l'MS-275 va contrarestar aquest efecte. De fet, aquest inhibidor modula el grau d'acetilació d'histones en el promotor proximal de la FBLN5 regulant així l'activitat transcripcional d'aquest. Donat que la reducció en el grau d'acetilació de l'ADN s'ha relacionat amb una inhibició de la transcripció [518] aquests resultats fet que recolzen el paper dels mecanismes epigenètics en la inhibició de la FBLN5 per estímuls inflamatoris.

Estudis de transfecció transitòria han demostrat que la regulació de la FBLN5 per estímuls inflamatoris així com pels inhibidors d'HDACs es duia a terme a nivell transcripcional. Hem acotat aquesta regulació a la regió de -329 pb del promotor proximal de la FBLN5. Tal i com s'ha descrit, per nosaltres mateixos i altres grups, aquesta regió conté alguns elements crítics per a l'expressió de la FBLN5, entre els quals trobem dos elements d'unió a SMAD i un element de resposta a hipòxia [432], [498]. En aquesta regió, hem identificat dos elements putatius SOX que es troben conservats entre diferents espècies; humans, ratolí i primats. De fet, la mutació de l'element posicionat a -304 pb redueix significativament l'activitat transcripcional basal del promotor de la FBLN5 suggerint la implicació dels factors de transcripció SOX en la regulació de la seva expressió.

La família de factors de transcripció SOX comprèn un ampli grup de proteïnes involucrades en el desenvolupament embrionari així com en diferents patologies i que participen en un ampli ventall de funcions entre les quals destaquen el control de la proliferació i la diferenciació cel·lular [519]–[521]. En els últims anys, s'ha fet un gran esforç per tal d'identificar els gens diana de la família SOX. En aquest context, hem identificat la FBLN5 com un gen diana per al factor de transcripció SOX9 en CMLV humanes. SOX9 regula l'expressió de diverses proteïnes de la MEC [522], i és crític per a la condrogènesi [520]. Cal destacar que hem trobat una disminució de l'expressió de SOX9 en les mostres aneurismàtiques i que aquesta correlaciona molt significativament amb l'expressió de la FBLN5, fet que recolza la seva relació. S'ha descrit que la FBLN5 protegeix l'estructura de la paret vascular davant un dany [399] i que SOX9 és necessari per a la síntesi i deposició normal de les proteïnes de la MEC [523]. Per tant, la seva inhibició en l'AAA podria afavorir el remodelat destructiu de la MEC característic d'aquesta malaltia. A més, la inhibició de la FBLN5 en cèl·lules

vasculars s'ha relacionat amb un increment en l'apoptosi, de forma similar al que s'ha descrit per SOX9 en cèl·lules mesenquimals i de glioma [432], [520], [524]. Tanmateix, la rellevància funcional de la inhibició de l'eix SOX9-FBLN5 en l'AAA segueix sent molt desconeguda i haurà de ser analitzada en estudis futurs per tal d'aclarir les conseqüències associades a aquesta inhibició en CMLV i el seu impacte en la progressió de l'AAA.

L'expressió de SOX9 s'inhibeix per estímuls inflamatoris en CMLV, en concordança amb dades prèvies en altres tipus cel·lulars [453], [454], [525]. El patró d'expressió temporal de SOX9 en CMLV tractades amb TNF $\alpha$  precedia la inhibició de la FBLN5 i la sobre-expressió de SOX9 revertia l'efecte inhibitori d'aquesta citoquina sobre l'expressió de la FBLN5, fet que aprova el paper de SOX9 en la regulació de l'expressió gènica de la FBLN5. Finalment, aquesta hipòtesi va ser confirmada en estudis de transfecció transitòria i ChIP.

Hem observat que, els inhibidors d'HDAC induïen l'expressió de SOX9, de forma similar a la FBLN5, revertint així la inhibició de SOX9 per estímuls inflamatoris. A més, en cèl·lules tractades amb TNF $\alpha$ , el MS-275 prevenia la disminució de la unió de SOX9 al promotor de la FBLN5. En conjunt, aquests resultats indiquen que els inhibidors d'HDACs modulen l'expressió de la FBLN5 augmentant el reclutament de SOX9 al seu promotor. Els nostres resultats concorden amb resultats previs que mostren que els inhibidors de HDACs són capaços d'induir l'expressió de SOX9 en diferents tipus cel·lulars [526]–[529], i que els gens diana de SOX9 presenten un elevat grau d'acetilació d'histones als seus promotors [452], [530], [531].

En resum, els resultats obtinguts en aquest estudi proporcionen nous coneixements sobre els mecanismes subjacents al remodelat destructiu de la MEC en l'AAA. Hem descrit la inhibició de la FBLN5 en l'AAA, la seva relació amb el component inflamatori d'aquesta malaltia i l'habilitat dels inhibidors de HDAC per normalitzar l'expressió vascular de la FBLN5 a través d'un mecanisme dependent de SOX9. Aquests resultats obren noves perspectives d'estudi per tal de determinar el paper de les HDACs en el desenvolupament de l'AAA i analitzar el potencial dels seus inhibidors com a eines farmacològiques que, a través de la modulació de proteïnes modificadores de la matriu com la FBLN5, podrien limitar la progressió de la malaltia.

# CONCLUSIONS





Les conclusions d'aquest estudi per a cadascun dels objectius plantejats han estat les següents:

**Respecte a l'objectiu 1:**

- La transgènesi de la LOXh dirigida a cèl·lules musculars llises aconsegueix una sobre-expressió eficient de proteïna funcional a la paret vascular, i no produeix canvis fenotípics aparents.
- Hem desenvolupat un model animal vàlid per a l'estudi del paper de la LOX en la funció vascular.

**Respecte a l'objectiu 2:**

- La sobre-expressió de la LOXh inhibeix la proliferació cel·lular de les CMLV.
- La sobre-expressió de la LOXh en CMLV limita l'engruiximent de neoïntima induït per lligadura de caròtida.
- La sobre-expressió de la LOXh inhibeix l'expressió de MCP-1 a la neoïntima de les artèries caròtides lligades dels ratolins TgLOX així com en CMLV d'aquests animals.

**Respecte a l'objectiu 3:**

- L'expressió i secreció de la FBLN5 està disminuïda en l'AAA, fet que podria afavorir el desenvolupament i l'expansió d'aquesta patologia, així com en CMLV tractades amb estímuls inflamatoris.
- La regulació de la FBLN5 per estímuls inflamatoris no es mediada per les vies de senyalització NF-κB ni AP-1, vies clàssicament implicades en la resposta inflamatòria.
- La regulació de la FBLN5 per estímuls inflamatoris es produeix a través d'un mecanisme transcripcional sensible a la inhibició de l'activitat HDAC en el qual participa el factor de transcripció SOX9 a través d'un

element de resposta situat a la posició -304 pb de la regió proximal del promotor de la FBLN5.

- La inhibició de l'activitat HDAC normalitza l'expressió de la FBLN5 incrementant el grau d'acetilació de la histona H3 al seu promotor.
- L'expressió de SOX9 està disminuïda en l'AAA, i es correlaciona amb els nivells d'ARNm de la FBLN5, així com en CMLV tractades amb estímuls inflamatoris.
- L'expressió de SOX9 és induïda pel tractament amb inhibidors d'HDAC incrementant la seva unió al promotor de la FBLN5 limitant així la inhibició de la FBLN5 per estímuls inflamatoris en CMLV.

# BIBLIOGRAFIA



- [1] H. C. McGill, C. A. McMahan, A. W. Zieske, R. E. Tracy, G. T. Malcom, E. E. Herderick, i J. P. Strong, «Association of Coronary Heart Disease Risk Factors with microscopic qualities of coronary atherosclerosis in youth», *Circulation*, vol. 102, núm. 4, p. 374-379, jul. 2000.
- [2] J. Stamler, M. L. Daviglius, D. B. Garside, A. R. Dyer, P. Greenland, i J. D. Neaton, «Relationship of baseline serum cholesterol levels in 3 large cohorts of younger men to long-term coronary, cardiovascular, and all-cause mortality and to longevity», *JAMA*, vol. 284, núm. 3, p. 311-318, jul. 2000.
- [3] A. J. Lusis, «Atherosclerosis», *Nature*, vol. 407, núm. 6801, p. 233-241, set. 2000.
- [4] U. Goldbourt, «The ratio of HDL to total cholesterol: long-term prognosis in men with and without coronary heart disease and in different ages, ethnic origins and serum cholesterol categories», *Prog. Clin. Biol. Res.*, vol. 255, p. 37-48, 1988.
- [5] R. W. Alexander, «Hypertension and the Pathogenesis of Atherosclerosis Oxidative Stress and the Mediation of Arterial Inflammatory Response: A New Perspective», *Hypertension*, vol. 25, núm. 2, p. 155-161, gen. 1995.
- [6] G. Assmann, R. Carmena, P. Cullen, J. C. Fruchart, F. Jossa, B. Lewis, M. Mancini, i R. Paoletti, «Coronary heart disease: reducing the risk: a worldwide view. International Task Force for the Prevention of Coronary Heart Disease», *Circulation*, vol. 100, núm. 18, p. 1930-1938, nov. 1999.
- [7] H. Allayee, B. E. Aouizerat, R. M. Cantor, G. M. Dallinga-Thie, R. M. Krauss, C. D. Lanning, J. I. Rotter, A. J. Lusis, i T. W. de Bruin, «Families with familial combined hyperlipidemia and families enriched for coronary artery disease share genetic determinants for the atherogenic lipoprotein phenotype», *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 63, núm. 2, p. 577-585, ago. 1998.
- [8] A. von Eckardstein, H. Schulte, i G. Assmann, «Increased Risk of Myocardial Infarction in Men With Both Hypertriglyceridemia and Elevated HDL Cholesterol», *Circulation*, vol. 99, núm. 14, p. 1922d-1926, abr. 1999.
- [9] C. M. Fichtenberg i S. A. Glantz, «Association of the California Tobacco Control Program with declines in cigarette consumption and mortality from heart disease», *N. Engl. J. Med.*, vol. 343, núm. 24, p. 1772-1777, des. 2000.
- [10] M. Kowalski, «Helicobacter pylori (H. pylori) infection in coronary artery disease: influence of H. pylori eradication on coronary artery lumen after percutaneous transluminal coronary angioplasty. The detection of H. pylori specific DNA in human coronary atherosclerotic plaque», *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.*, vol. 52, núm. 1 Suppl 1, p. 3-31, ago. 2001.
- [11] Z. Chen, R. Peto, R. Collins, S. MacMahon, J. Lu, i W. Li, «Serum cholesterol concentration and coronary heart disease in population with low cholesterol concentrations.», *BMJ*, vol. 303, núm. 6797, p. 276-282, ago. 1991.
- [12] L. Badimón i J. Martínez-González, «[Endothelium and vascular protection: an update]», *Rev. Esp. Cardiol.*, vol. 55 Suppl 1, p. 17-26, 2002.
- [13] V. Fuster, L. Badimon, J. J. Badimon, i J. H. Chesebro, «The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes», *N. Engl. J. Med.*, vol. 326, núm. 5, p. 310-318, gen. 1992.
- [14] L. Drouet, «Atherothrombosis as a systemic disease», *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz.*, vol. 13 Suppl 1, p. 1-6, 2002.
- [15] J. Davignon i P. Ganz, «Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis», *Circulation*, vol. 109, núm. 23 Suppl 1, p. III27-32, juny 2004.
- [16] P. M. Vanhoutte, «Endothelial dysfunction and atherosclerosis», *Eur. Heart J.*, vol. 18 Suppl E, p. E19-29, nov. 1997.
- [17] Y. Jang, A. M. Lincoff, E. F. Plow, i E. J. Topol, «Cell adhesion molecules in coronary artery disease», *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 24, núm. 7, p. 1591-1601, des. 1994.
- [18] R. G. Collins, R. Velji, N. V. Guevara, M. J. Hicks, L. Chan, i A. L. Beaudet, «P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against

- atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice», *J. Exp. Med.*, vol. 191, núm. 1, p. 189-194, gen. 2000.
- [19] E. S. Wittchen, «Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration», *Front. Biosci. Landmark Ed.*, vol. 14, p. 2522-2545, 2009.
- [20] M. A. Gimbrone, «Vascular Endothelium, Hemodynamic Forces, and Atherogenesis», *Am. J. Pathol.*, vol. 155, núm. 1, p. 1-5, jul. 1999.
- [21] U. Lundstam, E. Hurt-Camejo, G. Olsson, P. Sartipy, G. Camejo, i O. Wiklund, «Proteoglycans contribution to association of Lp(a) and LDL with smooth muscle cell extracellular matrix», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 19, núm. 5, p. 1162-1167, maig 1999.
- [22] H. J. Guretzki, K. D. Gerbitz, B. Olgemöller, i E. Schleicher, «Atherogenic levels of low density lipoprotein alter the permeability and composition of the endothelial barrier», *Atherosclerosis*, vol. 107, núm. 1, p. 15-24, maig 1994.
- [23] J. A. Hamilton, J. Chan, R. J. Byrne, R. J. Bischof, A. Jaworowski, i V. Kanagasundaram, «MRL/lpr and MRL+/+ Macrophage DNA Synthesis in the Absence and the Presence of Colony-Stimulating Factor-1 and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor», *J. Immunol.*, vol. 161, núm. 12, p. 6802-6811, des. 1998.
- [24] N. R. Madamanchi, A. Vendrov, i M. S. Runge, «Oxidative Stress and Vascular Disease», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 25, núm. 1, p. 29-38, gen. 2005.
- [25] A. Picchi, X. Gao, S. Belmadani, B. J. Potter, M. Focardi, W. M. Chilian, i C. Zhang, «Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome», *Circ. Res.*, vol. 99, núm. 1, p. 69-77, jul. 2006.
- [26] W. A. Boisvert, «Modulation of atherogenesis by chemokines», *Trends Cardiovasc. Med.*, vol. 14, núm. 4, p. 161-165, maig 2004.
- [27] J. Martínez-González, V. Llorente-Cortés, i L. Badimon, «Biología celular y molecular de las lesiones ateroscleróticas», *Rev. Esp. Cardiol.*, vol. 54, núm. 02, p. 218-231, feb. 2001.
- [28] L. Peiser, S. Mukhopadhyay, i S. Gordon, «Scavenger receptors in innate immunity», *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 14, núm. 1, p. 123-128, feb. 2002.
- [29] P. Libby, P. M. Ridker, i A. Maseri, «Inflammation and Atherosclerosis», *Circulation*, vol. 105, núm. 9, p. 1135-1143, maig 2002.
- [30] R. Ross, «The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s», *Nature*, vol. 362, núm. 6423, p. 801-809, abr. 1993.
- [31] B. E. Sobel, «Increased Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Vasculopathy A Reconcilable Paradox», *Circulation*, vol. 99, núm. 19, p. 2496-2498, maig 1999.
- [32] S. Glagov, E. Weisenberg, C. K. Zarins, R. Stankunavicius, i G. J. Kolettis, «Compensatory Enlargement of Human Atherosclerotic Coronary Arteries», *N. Engl. J. Med.*, vol. 316, núm. 22, p. 1371-1375, maig 1987.
- [33] R. Ross, «Atherosclerosis--an inflammatory disease», *N. Engl. J. Med.*, vol. 340, núm. 2, p. 115-126, gen. 1999.
- [34] D. Gordon, M. A. Reidy, E. P. Benditt, i S. M. Schwartz, «Cell proliferation in human coronary arteries.», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 87, núm. 12, p. 4600-4604, juny 1990.
- [35] S. Katsuda i T. Kajii, «Atherosclerosis and extracellular matrix», *J. Atheroscler. Thromb.*, vol. 10, núm. 5, p. 267-274, 2003.
- [36] V. E. A. Stoneman i M. R. Bennett, «Role of apoptosis in atherosclerosis and its therapeutic implications», *Clin. Sci. Lond. Engl. 1979*, vol. 107, núm. 4, p. 343-354, oct. 2004.
- [37] T. Björnheden, M. Levin, M. Evaldsson, i O. Wiklund, «Evidence of hypoxic areas within the arterial wall in vivo», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 19, núm. 4, p. 870-876, abr. 1999.
- [38] J. C. Sluimer, J.-M. Gasc, J. L. van Wanroij, N. Kisters, M. Groeneweg, M. D. Sollewijn Gelpke, J. P. Cleutjens, L. H. van den Akker, P. Corvol, B. G. Wouters, M. J. Daemen, i A.-P. J. Bijnens, «Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human

- atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis», *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 51, núm. 13, p. 1258-1265, abr. 2008.
- [39] P. Fraisl, M. Mazzone, T. Schmidt, i P. Carmeliet, «Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism», *Dev. Cell*, vol. 16, núm. 2, p. 167-179, feb. 2009.
- [40] R. Virmani, F. D. Kolodgie, A. P. Burke, A. V. Finn, H. K. Gold, T. N. Tulenko, S. P. Wrenn, i J. Narula, «Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 25, núm. 10, p. 2054-2061, oct. 2005.
- [41] R. J. Guzman, «Clinical, cellular, and molecular aspects of arterial calcification», *J. Vasc. Surg.*, vol. 45 Suppl A, p. A57-63, juny 2007.
- [42] J.-S. Shao, J. Cai, i D. A. Towler, «Molecular mechanisms of vascular calcification: lessons learned from the aorta», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 26, núm. 7, p. 1423-1430, jul. 2006.
- [43] R. T. Lee i P. Libby, «The Unstable Atheroma», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 17, núm. 10, p. 1859-1867, gen. 1997.
- [44] M. Clarke i M. Bennett, «The emerging role of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis and plaque stability», *Am. J. Nephrol.*, vol. 26, núm. 6, p. 531-535, 2006.
- [45] Z. S. Galis, G. K. Sukhova, M. W. Lark, i P. Libby, «Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques», *J. Clin. Invest.*, vol. 94, núm. 6, p. 2493-2503, des. 1994.
- [46] F. D. Kolodgie, J. Narula, N. Haider, i R. Virmani, «Apoptosis in atherosclerosis. Does it contribute to plaque instability?», *Cardiol. Clin.*, vol. 19, núm. 1, p. 127-139, ix, feb. 2001.
- [47] I. Tabas, «Macrophage Apoptosis in Atherosclerosis: Consequences on Plaque Progression and the Role of Endoplasmic Reticulum Stress», *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 11, núm. 9, p. 2333-2339, set. 2009.
- [48] M. G. Davies i P.-O. Hagen, «Pathobiology of intimal hyperplasia», *Br. J. Surg.*, vol. 81, núm. 9, p. 1254-1269, 1994.
- [49] P. W. Serruys, P. de Jaegere, F. Kiemeneij, C. Macaya, W. Rutsch, G. Heyndrickx, H. Emanuelsson, J. Marco, V. Legrand, i P. Materne, «A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group», *N. Engl. J. Med.*, vol. 331, núm. 8, p. 489-495, ago. 1994.
- [50] J. H. Ip, V. Fuster, L. Badimon, J. Badimon, M. B. Taubman, i J. H. Chesebro, «Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation», *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 15, núm. 7, p. 1667-1687, juny 1990.
- [51] D. W. Losordo, K. Rosenfield, A. Pieczek, K. Baker, M. Harding, i J. M. Isner, «How does angioplasty work? Serial analysis of human iliac arteries using intravascular ultrasound», *Circulation*, vol. 86, núm. 6, p. 1845-1858, des. 1992.
- [52] J. M. Ahmed, G. S. Mintz, N. J. Weissman, A. J. Lansky, A. D. Pichard, L. F. Satler, i K. M. Kent, «Mechanism of lumen enlargement during intracoronary stent implantation: an intravascular ultrasound study», *Circulation*, vol. 102, núm. 1, p. 7-10, jul. 2000.
- [53] R. Virmani, F. D. Kolodgie, A. Farb, i A. Lafont, «Drug eluting stents: are human and animal studies comparable?», *Heart*, vol. 89, núm. 2, p. 133-138, gen. 2003.
- [54] C. Chaabane, F. Otsuka, R. Virmani, i M.-L. Bochaton-Piallat, «Biological responses in stented arteries», *Cardiovasc. Res.*, vol. 99, núm. 2, p. 353-363, jul. 2013.
- [55] B. J. Rensing, W. R. Hermans, J. W. Deckers, P. J. de Feyter, J. G. Tijssen, i P. W. Serruys, «Lumen narrowing after percutaneous transluminal coronary balloon angioplasty follows a near gaussian distribution: a quantitative angiographic study in 1,445 successfully dilated lesions», *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 19, núm. 5, p. 939-945, abr. 1992.
- [56] J. N. Wilcox, K. M. Smith, S. M. Schwartz, i D. Gordon, «Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque.», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 86, núm. 8, p. 2839-2843, abr. 1989.



- [57] E. Falk i A. Fernández-Ortiz, «Role of thrombosis in atherosclerosis and its complications», *Am. J. Cardiol.*, vol. 75, núm. 6, p. 3B-11B, feb. 1995.
- [58] C. M. Speidel, P. R. Eisenberg, W. Ruf, T. S. Edgington, i D. R. Abendschein, «Tissue factor mediates prolonged procoagulant activity on the luminal surface of balloon-injured aortas in rabbits», *Circulation*, vol. 92, núm. 11, p. 3323-3330, des. 1995.
- [59] C. Bauters, J. M. Lablanche, E. P. McFadden, M. Hamon, i M. E. Bertrand, «Relation of coronary angioscopic findings at coronary angioplasty to angiographic restenosis», *Circulation*, vol. 92, núm. 9, p. 2473-2479, nov. 1995.
- [60] A. G. Violaris, R. Melkert, J. P. Herrman, i P. W. Serruys, «Role of angiographically identifiable thrombus on long-term luminal renarrowing after coronary angioplasty: a quantitative angiographic analysis», *Circulation*, vol. 93, núm. 5, p. 889-897, març 1996.
- [61] M. D. Reikhter, E. O'Brien, N. Shah, S. M. Schwartz, J. B. Simpson, i D. Gordon, «The importance of thrombus organization and stellate cell phenotype in collagen I gene expression in human, coronary atherosclerotic and restenotic lesions», *Cardiovasc. Res.*, vol. 32, núm. 3, p. 496-502, set. 1996.
- [62] Y. Jang, L. A. Guzman, A. M. Lincoff, M. Gottsauner-Wolf, F. Forudi, C. E. Hart, D. W. Courtman, M. Ezban, S. G. Ellis, i E. J. Topol, «Influence of Blockade at Specific Levels of the Coagulation Cascade on Restenosis in a Rabbit Atherosclerotic Femoral Artery Injury Model», *Circulation*, vol. 92, núm. 10, p. 3041-3050, nov. 1995.
- [63] R. Gallo, A. Padurean, V. Toschi, J. Bichler, J. T. Fallon, J. H. Chesebro, V. Fuster, i J. J. Badimon, «Prolonged thrombin inhibition reduces restenosis after balloon angioplasty in porcine coronary arteries», *Circulation*, vol. 97, núm. 6, p. 581-588, feb. 1998.
- [64] M. Roqué, E. D. Reis, V. Fuster, A. Padurean, J. T. Fallon, M. B. Taubman, J. H. Chesebro, i J. J. Badimon, «Inhibition of tissue factor reduces thrombus formation and intimal hyperplasia after porcine coronary angioplasty», *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 36, núm. 7, p. 2303-2310, des. 2000.
- [65] P. R. Moreno, V. H. Bernardi, J. López-Cuéllar, A. M. Murcia, I. F. Palacios, H. K. Gold, R. Mehran, S. K. Sharma, Y. Nemerson, V. Fuster, i J. T. Fallon, «Macrophages, smooth muscle cells, and tissue factor in unstable angina. Implications for cell-mediated thrombogenicity in acute coronary syndromes», *Circulation*, vol. 94, núm. 12, p. 3090-3097, des. 1996.
- [66] F. G. P. Welt i C. Rogers, «Inflammation and restenosis in the stent era», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 22, núm. 11, p. 1769-1776, nov. 2002.
- [67] A. P. Burke, F. D. Kolodgie, A. Farb, D. Weber, i R. Virmani, «Morphological predictors of arterial remodeling in coronary atherosclerosis», *Circulation*, vol. 105, núm. 3, p. 297-303, gen. 2002.
- [68] C. Rogers, E. R. Edelman, i D. I. Simon, «A mAb to the beta2-leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) reduces intimal thickening after angioplasty or stent implantation in rabbits», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, núm. 17, p. 10134-10139, ago. 1998.
- [69] S. Oguchi, P. Dimayuga, J. Zhu, K. Y. Chyu, J. Yano, P. K. Shah, J. Nilsson, i B. Cercek, «Monoclonal antibody against vascular cell adhesion molecule-1 inhibits neointimal formation after periadventitial carotid artery injury in genetically hypercholesterolemic mice», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 20, núm. 7, p. 1729-1736, jul. 2000.
- [70] J. W. Phillips, K. G. Barrinhaus, J. M. Sanders, S. E. Hesselbacher, A. C. Czarnik, D. Manka, D. Vestweber, K. Ley, i I. J. Sarembock, «Single Injection of P-Selectin or P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 Monoclonal Antibody Blocks Neointima Formation After Arterial Injury in Apolipoprotein E-Deficient Mice», *Circulation*, vol. 107, núm. 17, p. 2244-2249, juny 2003.
- [71] D. I. Simon, Z. Dhen, P. Seifert, E. R. Edelman, C. M. Ballantyne, i C. Rogers, «Decreased neointimal formation in Mac-1(-/-) mice reveals a role for inflammation in vascular repair after angioplasty», *J. Clin. Invest.*, vol. 105, núm. 3, p. 293-300, feb. 2000.
- [72] M. B. Taubman, B. J. Rollins, M. Poon, J. Marmur, R. S. Green, B. C. Berk, i B. Nadal-Ginard, «JE mRNA accumulates rapidly in aortic injury and in platelet-derived growth

- factor-stimulated vascular smooth muscle cells», *Circ. Res.*, vol. 70, núm. 2, p. 314-325, feb. 1992.
- [73] F. Liao, J. A. Berliner, M. Mehrabian, M. Navab, L. L. Demer, A. J. Lusis, i A. M. Fogelman, «Minimally modified low density lipoprotein is biologically active in vivo in mice», *J. Clin. Invest.*, vol. 87, núm. 6, p. 2253-2257, juny 1991.
- [74] K. Rayner, S. Van Eersel, P. H. Groot, i T. J. Reape, «Localisation of mRNA for JE/MCP-1 and its receptor CCR2 in atherosclerotic lesions of the ApoE knockout mouse», *J. Vasc. Res.*, vol. 37, núm. 2, p. 93-102, abr. 2000.
- [75] L. Boring, J. Gosling, M. Cleary, i I. F. Charo, «Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis», *Nature*, vol. 394, núm. 6696, p. 894-897, ago. 1998.
- [76] T. C. Dawson, W. A. Kuziel, T. A. Osahar, i N. Maeda, «Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice», *Atherosclerosis*, vol. 143, núm. 1, p. 205-211, març 1999.
- [77] J. Gosling, S. Slaymaker, L. Gu, S. Tseng, C. H. Zlot, S. G. Young, B. J. Rollins, i I. F. Charo, «MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B», *J. Clin. Invest.*, vol. 103, núm. 6, p. 773-778, març 1999.
- [78] L. Gu, Y. Okada, S. K. Clinton, C. Gerard, G. K. Sukhova, P. Libby, i B. J. Rollins, «Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice», *Mol. Cell*, vol. 2, núm. 2, p. 275-281, ago. 1998.
- [79] M. Poon, J. Cohen, Z. Siddiqui, J. T. Fallon, i M. B. Taubman, «Trapidil inhibits monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage accumulation after balloon arterial injury in rabbits», *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*, vol. 79, núm. 11, p. 1369-1375, nov. 1999.
- [80] M. Usui, K. Egashira, K. Ohtani, C. Kataoka, M. Ishibashi, K. Hiasa, M. Katoh, Q. Zhao, S. Kitamoto, i A. Takeshita, «Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy inhibits restenotic changes (neointimal hyperplasia) after balloon injury in rats and monkeys», *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 16, núm. 13, p. 1838-1840, nov. 2002.
- [81] E. Mori, K. Komori, T. Yamaoka, M. Tani, C. Kataoka, A. Takeshita, M. Usui, K. Egashira, i K. Sugimachi, «Essential role of monocyte chemoattractant protein-1 in development of restenotic changes (neointimal hyperplasia and constrictive remodeling) after balloon angioplasty in hypercholesterolemic rabbits», *Circulation*, vol. 105, núm. 24, p. 2905-2910, juny 2002.
- [82] F. Cipollone, M. Marini, M. Fazio, B. Pini, A. Iezzi, M. Reale, L. Paloscia, G. Materazzo, E. D'Annunzio, P. Conti, F. Chiarelli, F. Cuccurullo, i A. Mezzetti, «Elevated circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with restenosis after coronary angioplasty», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 21, núm. 3, p. 327-334, març 2001.
- [83] O. Kocher, O. Skalli, W. S. Bloom, i G. Gabbiani, «Cytoskeleton of rat aortic smooth muscle cells. Normal conditions and experimental intimal thickening», *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*, vol. 50, núm. 6, p. 645-652, juny 1984.
- [84] C. Bauters, P. de Groote, M. Adamantidis, C. Delcayre, M. Hamon, J. M. Lablanche, M. E. Bertrand, B. Dupuis, i B. Swynghedauw, «Proto-oncogene expression in rabbit aorta after wall injury. First marker of the cellular process leading to restenosis after angioplasty?», *Eur. Heart J.*, vol. 13, núm. 4, p. 556-559, abr. 1992.
- [85] J. G. Pickering, L. Weir, J. Jekanowski, M. A. Kearney, i J. M. Isner, «Proliferative activity in peripheral and coronary atherosclerotic plaque among patients undergoing percutaneous revascularization», *J. Clin. Invest.*, vol. 91, núm. 4, p. 1469-1480, abr. 1993.
- [86] T. Kakuta, J. W. Currier, C. C. Haudenschild, T. J. Ryan, i D. P. Faxon, «Differences in compensatory vessel enlargement, not intimal formation, account for restenosis after angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit model», *Circulation*, vol. 89, núm. 6, p. 2809-2815, juny 1994.

- [87] N. A. Scott, G. D. Cipolla, C. E. Ross, B. Dunn, F. H. Martin, L. Simonet, i J. N. Wilcox, «Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries», *Circulation*, vol. 93, núm. 12, p. 2178-2187, juny 1996.
- [88] Y. Shi, J. E. O'Brien, A. Fard, J. D. Mannion, D. Wang, i A. Zalewski, «Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries», *Circulation*, vol. 94, núm. 7, p. 1655-1664, oct. 1996.
- [89] K. O. Yee i S. M. Schwartz, «Why atherosclerotic vessels narrow: the fibrin hypothesis», *Thromb. Haemost.*, vol. 82, núm. 2, p. 762-771, ago. 1999.
- [90] A. R. Brady, S. G. Thompson, F. G. R. Fowkes, R. M. Greenhalgh, J. T. Powell, i UK Small Aneurysm Trial Participants, «Abdominal aortic aneurysm expansion: risk factors and time intervals for surveillance», *Circulation*, vol. 110, núm. 1, p. 16-21, jul. 2004.
- [91] R. F. Gillum, «Epidemiology of aortic aneurysm in the United States», *J. Clin. Epidemiol.*, vol. 48, núm. 11, p. 1289-1298, nov. 1995.
- [92] I. M. Nordon, R. J. Hinchliffe, I. M. Loftus, i M. M. Thompson, «Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms», *Nat. Rev. Cardiol.*, vol. 8, núm. 2, p. 92-102, feb. 2011.
- [93] N. Sakalihasan, R. Limet, i O. D. Defawe, «Abdominal aortic aneurysm», *Lancet*, vol. 365, núm. 9470, p. 1577-1589, maig 2005.
- [94] K. W. Johnston, R. B. Rutherford, M. D. Tilson, D. M. Shah, L. Hollier, i J. C. Stanley, «Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. Subcommittee on Reporting Standards for Arterial Aneurysms, Ad Hoc Committee on Reporting Standards, Society for Vascular Surgery and North American Chapter, International Society for Cardiovascular Surgery», *J. Vasc. Surg.*, vol. 13, núm. 3, p. 452-458, març 1991.
- [95] H. G. Alcorn, S. K. Wolfson, K. Sutton-Tyrrell, L. H. Kuller, i D. O'Leary, «Risk factors for abdominal aortic aneurysms in older adults enrolled in The Cardiovascular Health Study», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 16, núm. 8, p. 963-970, ago. 1996.
- [96] F. A. Lederle, G. R. Johnson, S. E. Wilson, E. P. Chute, F. N. Littooy, D. Bandyk, W. C. Krupski, G. W. Barone, C. W. Acher, i D. J. Ballard, «Prevalence and associations of abdominal aortic aneurysm detected through screening. Aneurysm Detection and Management (ADAM) Veterans Affairs Cooperative Study Group», *Ann. Intern. Med.*, vol. 126, núm. 6, p. 441-449, març 1997.
- [97] J. Golledge, J. Muller, A. Daugherty, i P. Norman, «Abdominal aortic aneurysm: pathogenesis and implications for management», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 26, núm. 12, p. 2605-2613, des. 2006.
- [98] B. T. Baxter, M. C. Terrin, i R. L. Dalman, «Medical management of small abdominal aortic aneurysms», *Circulation*, vol. 117, núm. 14, p. 1883-1889, abr. 2008.
- [99] F. A. Lederle, D. B. Nelson, i A. M. Joseph, «Smokers' relative risk for aortic aneurysm compared with other smoking-related diseases: a systematic review», *J. Vasc. Surg.*, vol. 38, núm. 2, p. 329-334, ago. 2003.
- [100] J. S. Lindholt, B. Jørgensen, N. A. Klitgaard, i E. W. Henneberg, «Systemic levels of cotinine and elastase, but not pulmonary function, are associated with the progression of small abdominal aortic aneurysms», *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.*, vol. 26, núm. 4, p. 418-422, oct. 2003.
- [101] T. B. Wilmink, C. R. Quick, i N. E. Day, «The association between cigarette smoking and abdominal aortic aneurysms», *J. Vasc. Surg.*, vol. 30, núm. 6, p. 1099-1105, des. 1999.
- [102] A. Palazzuoli, P. Alberto, M. Gallotta, G. Maddalena, G. Guerrieri, G. Giuseppe, I. Quatrini, Q. Ilaria, B. Franci, M. S. Campagna, E. Neri, N. Eugenio, A. Benvenuti, B. Antonio, C. Sassi, S. Carlo, R. Nuti, i N. Ranuccio, «Prevalence of risk factors, coronary and systemic atherosclerosis in abdominal aortic aneurysm: comparison with high cardiovascular risk population», *Vasc. Health Risk Manag.*, vol. 4, núm. 4, p. 877-883, 2008.

- [103] M. I. Patel, D. T. Hardman, C. M. Fisher, i M. Appleberg, «Current views on the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms», *J. Am. Coll. Surg.*, vol. 181, núm. 4, p. 371-382, oct. 1995.
- [104] J. S. Lindholt, N. H. Heegaard, S. Vammen, H. Fasting, E. W. Henneberg, i L. Heickendorff, «Smoking, but not lipids, lipoprotein(a) and antibodies against oxidised LDL, is correlated to the expansion of abdominal aortic aneurysms», *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.*, vol. 21, núm. 1, p. 51-56, gen. 2001.
- [105] L. C. Brown i J. T. Powell, «Risk factors for aneurysm rupture in patients kept under ultrasound surveillance. UK Small Aneurysm Trial Participants», *Ann. Surg.*, vol. 230, núm. 3, p. 289-296; discussion 296-297, set. 1999.
- [106] J. Cornuz, C. Sidoti Pinto, H. Tevaearai, i M. Egger, «Risk factors for asymptomatic abdominal aortic aneurysm: systematic review and meta-analysis of population-based screening studies», *Eur. J. Public Health*, vol. 14, núm. 4, p. 343-349, des. 2004.
- [107] A. Wanhainen, D. Bergqvist, K. Boman, T. K. Nilsson, J. Rutegård, i M. Björck, «Risk factors associated with abdominal aortic aneurysm: a population-based study with historical and current data», *J. Vasc. Surg.*, vol. 41, núm. 3, p. 390-396, març 2005.
- [108] S. H. Forsdahl, K. Singh, S. Solberg, i B. K. Jacobsen, «Risk factors for abdominal aortic aneurysms: a 7-year prospective study: the Tromsø Study, 1994-2001», *Circulation*, vol. 119, núm. 16, p. 2202-2208, abr. 2009.
- [109] J. Golledge, P. Clancy, K. Jamrozik, i P. E. Norman, «Obesity, adipokines, and abdominal aortic aneurysm: Health in Men study», *Circulation*, vol. 116, núm. 20, p. 2275-2279, nov. 2007.
- [110] D. R. Wong, W. C. Willett, i E. B. Rimm, «Smoking, hypertension, alcohol consumption, and risk of abdominal aortic aneurysm in men», *Am. J. Epidemiol.*, vol. 165, núm. 7, p. 838-845, abr. 2007.
- [111] J. F. Blanchard, H. K. Armenian, i P. P. Friesen, «Risk factors for abdominal aortic aneurysm: results of a case-control study», *Am. J. Epidemiol.*, vol. 151, núm. 6, p. 575-583, març 2000.
- [112] H. Astrand, A. Rydén-Ahlgren, G. Sundkvist, T. Sandgren, i T. Länne, «Reduced aortic wall stress in diabetes mellitus», *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.*, vol. 33, núm. 5, p. 592-598, maig 2007.
- [113] J. Golledge, M. Karan, C. S. Moran, J. Muller, P. Clancy, A. E. Dear, i P. E. Norman, «Reduced expansion rate of abdominal aortic aneurysms in patients with diabetes may be related to aberrant monocyte-matrix interactions», *Eur. Heart J.*, vol. 29, núm. 5, p. 665-672, març 2008.
- [114] P. E. Norman, T. M. E. Davis, M. T. Q. Le, i J. Golledge, «Matrix biology of abdominal aortic aneurysms in diabetes: mechanisms underlying the negative association», *Connect. Tissue Res.*, vol. 48, núm. 3, p. 125-131, 2007.
- [115] J. A. Salo, S. Soisalon-Soininen, S. Bondestam, i P. S. Mattila, «Familial occurrence of abdominal aortic aneurysm», *Ann. Intern. Med.*, vol. 130, núm. 8, p. 637-642, abr. 1999.
- [116] A. B. Wilmink, C. R. Quick, C. S. Hubbard, i N. E. Day, «The association between connective tissue laxity and the risk of an abdominal aortic aneurysm», *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.*, vol. 20, núm. 3, p. 290-295, set. 2000.
- [117] C. M. Wahlgren, E. Larsson, P. K. E. Magnusson, R. Hultgren, i J. Swedenborg, «Genetic and environmental contributions to abdominal aortic aneurysm development in a twin population», *J. Vasc. Surg.*, vol. 51, núm. 1, p. 3-7, gen. 2010.
- [118] D. W. Hollister, M. Godfrey, L. Y. Sakai, i R. E. Pyeritz, «Immunohistologic abnormalities of the microfibrillar-fiber system in the Marfan syndrome», *N. Engl. J. Med.*, vol. 323, núm. 3, p. 152-159, jul. 1990.
- [119] H. C. Dietz, G. R. Cutting, R. E. Pyeritz, C. L. Maslen, L. Y. Sakai, G. M. Corson, E. G. Puffenberger, A. Hamosh, E. J. Nanthakumar, i S. M. Curristin, «Marfan syndrome caused

- by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene», *Nature*, vol. 352, núm. 6333, p. 337-339, jul. 1991.
- [120] M. Pepin, U. Schwarze, A. Superti-Furga, i P. H. Byers, «Clinical and genetic features of Ehlers-Danlos syndrome type IV, the vascular type», *N. Engl. J. Med.*, vol. 342, núm. 10, p. 673-680, març 2000.
- [121] J. S. Lindholt, H. Fasting, E. W. Henneberg, i L. Ostergaard, «A review of Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis», *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.*, vol. 17, núm. 4, p. 283-289, abr. 1999.
- [122] D. I. Walker, K. Bloor, G. Williams, i I. Gillie, «Inflammatory aneurysms of the abdominal aorta», *Br. J. Surg.*, vol. 59, núm. 8, p. 609-614, 1972.
- [123] A. R. Downs i C. R. Lye, «Inflammatory abdominal aortic aneurysm», *Can. J. Surg. J. Can. Chir.*, vol. 29, núm. 1, p. 50-53, gen. 1986.
- [124] U. von Fritschen, E. Malzfeld, A. Clasen, i H. Kortmann, «Inflammatory abdominal aortic aneurysm: A postoperative course of retroperitoneal fibrosis», *J. Vasc. Surg.*, vol. 30, núm. 6, p. 1090-1098, des. 1999.
- [125] W. G. Tennant, G. G. Hartnell, R. N. Baird, i M. Horrocks, «Radiologic investigation of abdominal aortic aneurysm disease: comparison of three modalities in staging and the detection of inflammatory change», *J. Vasc. Surg.*, vol. 17, núm. 4, p. 703-709, abr. 1993.
- [126] A. S. Ward, «Aortic aneurysmal disease. A generalized dilating diathesis», *Arch. Surg. Chic. Ill 1960*, vol. 127, núm. 8, p. 990-991, ago. 1992.
- [127] I. Nordon, R. Brar, J. Taylor, R. Hinchliffe, I. M. Loftus, i M. M. Thompson, «Evidence from cross-sectional imaging indicates abdominal but not thoracic aortic aneurysms are local manifestations of a systemic dilating diathesis», *J. Vasc. Surg.*, vol. 50, núm. 1, p. 171-176.e1, jul. 2009.
- [128] M. A. Zatina, C. K. Zarins, B. L. Gewertz, i S. Glagov, «Role of medial lamellar architecture in the pathogenesis of aortic aneurysms», *J. Vasc. Surg.*, vol. 1, núm. 3, p. 442-448, maig 1984.
- [129] D. A. McDonald, «Regional pulse-wave velocity in the arterial tree», *J. Appl. Physiol.*, vol. 24, núm. 1, p. 73-78, gen. 1968.
- [130] H. Wolinsky i S. Glagov, «Nature of Species Differences in the Medial Distribution of Aortic Vasa Vasorum in Mammals», *Circ. Res.*, vol. 20, núm. 4, p. 409-421, gen. 1967.
- [131] P. B. Dobrin, W. H. Baker, i W. C. Gley, «Elastolytic and collagenolytic studies of arteries. Implications for the mechanical properties of aneurysms», *Arch. Surg. Chic. Ill 1960*, vol. 119, núm. 4, p. 405-409, abr. 1984.
- [132] M. J. Davies, «Aortic Aneurysm Formation Lessons From Human Studies and Experimental Models», *Circulation*, vol. 98, núm. 3, p. 193-195, jul. 1998.
- [133] E. Allaire, D. Hasenstab, R. D. Kenagy, B. Starcher, M. M. Clowes, i A. W. Clowes, «Prevention of aneurysm development and rupture by local overexpression of plasminogen activator inhibitor-1», *Circulation*, vol. 98, núm. 3, p. 249-255, jul. 1998.
- [134] H. D. Louwrens, H. C. Kwaan, W. H. Pearce, J. S. Yao, i E. Verrusio, «Plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor expression by normal and aneurysmal human aortic smooth muscle cells in culture», *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.*, vol. 10, núm. 3, p. 289-293, oct. 1995.
- [135] J. M. Reilly, G. A. Sicard, i C. L. Lucore, «Abnormal expression of plasminogen activators in aortic aneurysmal and occlusive disease», *J. Vasc. Surg.*, vol. 19, núm. 5, p. 865-872, maig 1994.
- [136] M. Wassef, B. T. Baxter, R. L. Chisholm, R. L. Dalman, M. F. Fillinger, J. Heinecke, J. D. Humphrey, H. Kuivaniemi, W. C. Parks, W. H. Pearce, C. D. Platsoucas, G. K. Sukhova, R. W. Thompson, M. D. Tilson, i C. K. Zarins, «Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms: a multidisciplinary research program supported by the National Heart, Lung, and Blood Institute», *J. Vasc. Surg.*, vol. 34, núm. 4, p. 730-738, oct. 2001.
- [137] K. A. Hance, M. Tataria, S. J. Ziporin, J. K. Lee, i R. W. Thompson, «Monocyte chemotactic activity in human abdominal aortic aneurysms: role of elastin degradation peptides and

- the 67-kD cell surface elastin receptor», *J. Vasc. Surg.*, vol. 35, núm. 2, p. 254-261, feb. 2002.
- [138] E. F. Steinmetz, C. Buckley, i R. W. Thompson, «Prospects for the medical management of abdominal aortic aneurysms», *Vasc. Endovascular Surg.*, vol. 37, núm. 3, p. 151-163, juny 2003.
- [139] J. S. Colonnello, K. A. Hance, M. L. Shames, C. W. Wyble, S. J. Ziporin, J. E. Leidenfrost, T. L. Ennis, G. R. Upchurch, i R. W. Thompson, «Transient exposure to elastase induces mouse aortic wall smooth muscle cell production of MCP-1 and RANTES during development of experimental aortic aneurysm», *J. Vasc. Surg.*, vol. 38, núm. 1, p. 138-146, jul. 2003.
- [140] D. R. Holmes, W. Wester, R. W. Thompson, i J. M. Reilly, «Prostaglandin E2 synthesis and cyclooxygenase expression in abdominal aortic aneurysms», *J. Vasc. Surg.*, vol. 25, núm. 5, p. 810-815, maig 1997.
- [141] J. Juvonen, H. M. Surcel, J. Satta, A. M. Teppo, A. Bloigu, H. Syrjälä, J. Airaksinen, M. Leinonen, P. Saikku, i T. Juvonen, «Elevated circulating levels of inflammatory cytokines in patients with abdominal aortic aneurysm», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 17, núm. 11, p. 2843-2847, nov. 1997.
- [142] W. D. McMillan i W. H. Pearce, «Inflammation and cytokine signaling in aneurysms», *Ann. Vasc. Surg.*, vol. 11, núm. 5, p. 540-545, set. 1997.
- [143] W. H. Pearce, I. Sweis, J. S. Yao, W. J. McCarthy, i A. E. Koch, «Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha release in normal and diseased human infrarenal aortas», *J. Vasc. Surg.*, vol. 16, núm. 5, p. 784-789, nov. 1992.
- [144] A. L. V. Golledge, P. Walker, P. E. Norman, i J. Golledge, «A systematic review of studies examining inflammation associated cytokines in human abdominal aortic aneurysm samples», *Dis. Markers*, vol. 26, núm. 4, p. 181-188, 2009.
- [145] F. M. Davis, D. L. Rateri, i A. Daugherty, «Mechanisms of aortic aneurysm formation: translating preclinical studies into clinical therapies», *Heart*, vol. 100, núm. 19, p. 1498-1505, gen. 2014.
- [146] A. Lopez-Candales, D. R. Holmes, S. Liao, M. J. Scott, S. A. Wickline, i R. W. Thompson, «Decreased vascular smooth muscle cell density in medial degeneration of human abdominal aortic aneurysms.», *Am. J. Pathol.*, vol. 150, núm. 3, p. 993-1007, març 1997.
- [147] K. Satoh, P. Nigro, T. Matoba, M. R. O'Dell, Z. Cui, X. Shi, A. Mohan, C. Yan, J. Abe, K. A. Illig, i B. C. Berk, «Cyclophilin A enhances vascular oxidative stress and the development of angiotensin II-induced aortic aneurysms», *Nat. Med.*, vol. 15, núm. 6, p. 649-656, juny 2009.
- [148] G. Ailawadi, J. L. Eliason, i G. R. Upchurch, «Current concepts in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm», *J. Vasc. Surg.*, vol. 38, núm. 3, p. 584-588, set. 2003.
- [149] B. G. Halloran i B. T. Baxter, «Pathogenesis of aneurysms», *Semin. Vasc. Surg.*, vol. 8, núm. 2, p. 85-92, juny 1995.
- [150] D. J. Minion, V. A. Davis, P. A. Nejezchleb, Y. Wang, B. M. McManus, i B. T. Baxter, «Elastin is increased in abdominal aortic aneurysms», *J. Surg. Res.*, vol. 57, núm. 4, p. 443-446, oct. 1994.
- [151] M. K. Bode, Y. Soini, J. Melkko, J. Satta, L. Risteli, i J. Risteli, «Increased amount of type III pN-collagen in human abdominal aortic aneurysms: evidence for impaired type III collagen fibrillogenesis», *J. Vasc. Surg.*, vol. 32, núm. 6, p. 1201-1207, des. 2000.
- [152] S. Menashi, J. S. Campa, R. M. Greenhalgh, i J. T. Powell, «Collagen in abdominal aortic aneurysm: typing, content, and degradation», *J. Vasc. Surg.*, vol. 6, núm. 6, p. 578-582, des. 1987.
- [153] J.-B. Michel, J.-L. Martin-Ventura, J. Egido, N. Sakalihan, V. Treska, J. Lindholt, E. Allaire, U. Thorsteinsdottir, G. Cockerill, J. Swedenborg, i FAD EU consortium, «Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans», *Cardiovasc. Res.*, vol. 90, núm. 1, p. 18-27, abr. 2011.

- [154] D. R. Holmes, S. Liao, W. C. Parks, i R. W. Thompson, «Medial neovascularization in abdominal aortic aneurysms: a histopathologic marker of aneurysmal degeneration with pathophysiologic implications», *J. Vasc. Surg.*, vol. 21, núm. 5, p. 761-771; discussion 771-772, maig 1995.
- [155] M. M. Thompson, L. Jones, A. Nasim, R. D. Sayers, i P. R. Bell, «Angiogenesis in abdominal aortic aneurysms», *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.*, vol. 11, núm. 4, p. 464-469, maig 1996.
- [156] B. T. Baxter, V. A. Davis, D. J. Minion, Y. P. Wang, T. G. Lynch, i B. M. McManus, «Abdominal aortic aneurysms are associated with altered matrix proteins of the nonaneurysmal aortic segments», *J. Vasc. Surg.*, vol. 19, núm. 5, p. 797-802; discussion 803, maig 1994.
- [157] A. Wills, M. M. Thompson, M. Crowther, R. D. Sayers, i P. R. Bell, «Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms--cellular and biochemical mechanisms», *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.*, vol. 12, núm. 4, p. 391-400, nov. 1996.
- [158] J. Satta, T. Juvonen, K. Haukipuro, M. Juvonen, i M. I. Kairaluoma, «Increased turnover of collagen in abdominal aortic aneurysms, demonstrated by measuring the concentration of the aminoterminal propeptide of type III procollagen in peripheral and aortal blood samples», *J. Vasc. Surg.*, vol. 22, núm. 2, p. 155-160, ago. 1995.
- [159] M. D. Huffman, J. A. Curci, G. Moore, D. B. Kerns, B. C. Starcher, i R. W. Thompson, «Functional importance of connective tissue repair during the development of experimental abdominal aortic aneurysms», *Surgery*, vol. 128, núm. 3, p. 429-438, set. 2000.
- [160] J. R. Cohen, M. O. Perry, R. Hariri, J. Holt, i O. Alvarez, «Aortic collagenase activity as affected by laparotomy, cecal resection, aortic mobilization, and aortotomy in rats», *J. Vasc. Surg.*, vol. 1, núm. 4, p. 562-565, jul. 1984.
- [161] J. D. Cohen, P. Singer, G. Grunberg, E. Grozovski, J. Sulkes, i A. Zelikovski, «Outcome after elective infrarenal aortic aneurysm surgery», *World J. Surg.*, vol. 22, núm. 3, p. 278-282, març 1998.
- [162] E. Choke, G. W. Cockerill, J. Dawson, R. W. Wilson, A. Jones, I. M. Loftus, i M. M. Thompson, «Increased Angiogenesis at the Site of Abdominal Aortic Aneurysm Rupture», *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1085, núm. 1, p. 315-319, nov. 2006.
- [163] O. D. Defawe, A. Colige, C. A. Lambert, P. Delvenne, C. M. Lapière, R. Limet, B. V. Nusgens, i N. Sakalihan, «Gradient of proteolytic enzymes, their inhibitors and matrix proteins expression in a ruptured abdominal aortic aneurysm», *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 34, núm. 7, p. 513-514, 2004.
- [164] G. Filardo, J. T. Powell, M. A.-M. Martinez, i D. J. Ballard, «Surgery for small asymptomatic abdominal aortic aneurysms», *Cochrane Database Syst. Rev.*, vol. 3, p. CD001835, 2012.
- [165] Z.-Y. Li, «Computed wall stress may predict the growth of abdominal aortic aneurysm», *Conf. Proc. Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. Annu. Conf.*, vol. 2010, p. 2626-2629, 2010.
- [166] L. P. Harter, B. H. Gross, P. W. Callen, i R. A. Barth, «Ultrasonic evaluation of abdominal aortic thrombus», *J. Ultrasound Med. Off. J. Am. Inst. Ultrasound Med.*, vol. 1, núm. 8, p. 315-318, oct. 1982.
- [167] D. A. Vorp, P. C. Lee, D. H. Wang, M. S. Makaroun, E. M. Nemoto, S. Ogawa, i M. W. Webster, «Association of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm with local hypoxia and wall weakening», *J. Vasc. Surg.*, vol. 34, núm. 2, p. 291-299, ago. 2001.
- [168] E. Choke, G. Cockerill, W. R. W. Wilson, S. Sayed, J. Dawson, I. Loftus, i M. M. Thompson, «A review of biological factors implicated in abdominal aortic aneurysm rupture», *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.*, vol. 30, núm. 3, p. 227-244, set. 2005.
- [169] M. Kazi, J. Thyberg, P. Religa, J. Roy, P. Eriksson, U. Hedin, i J. Swedenborg, «Influence of intraluminal thrombus on structural and cellular composition of abdominal aortic aneurysm wall», *J. Vasc. Surg.*, vol. 38, núm. 6, p. 1283-1292, des. 2003.

- [170] M. F. Fraga, E. Ballestar, M. F. Paz, S. Ropero, F. Setien, M. L. Ballestar, D. Heine-Suñer, J. C. Cigudosa, M. Urioste, J. Benitez, M. Boix-Chornet, A. Sanchez-Aguilera, C. Ling, E. Carlsson, P. Poulsen, A. Vaag, Z. Stephan, T. D. Spector, Y.-Z. Wu, C. Plass, i M. Esteller, «Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, núm. 30, p. 10604-10609, jul. 2005.
- [171] A. G. Wilson, «Epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response and relevance to common diseases», *J. Periodontol.*, vol. 79, núm. 8 Suppl, p. 1514-1519, ago. 2008.
- [172] I. Behm-Ansmant, J. Rehwinkel, i E. Izaurralde, «MicroRNAs Silence Gene Expression by Repressing Protein Expression and/or by Promoting mRNA Decay», *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, vol. 71, p. 523-530, gen. 2006.
- [173] R. C. Lee, R. L. Feinbaum, i V. Ambros, «The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*», *Cell*, vol. 75, núm. 5, p. 843-854, des. 1993.
- [174] C. Zhang, «MicroRNomics: a newly emerging approach for disease biology», *Physiol. Genomics*, vol. 33, núm. 2, p. 139-147, abr. 2008.
- [175] A. P. Bird, «CpG-rich islands and the function of DNA methylation», *Nature*, vol. 321, núm. 6067, p. 209-213, maig 1986.
- [176] M. M. Suzuki i A. Bird, «DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics», *Nat. Rev. Genet.*, vol. 9, núm. 6, p. 465-476, juny 2008.
- [177] T. Nikitina, X. Shi, R. P. Ghosh, R. A. Horowitz-Scherer, J. C. Hansen, i C. L. Woodcock, «Multiple Modes of Interaction between the Methylated DNA Binding Protein MeCP2 and Chromatin», *Mol. Cell. Biol.*, vol. 27, núm. 3, p. 864-877, gen. 2007.
- [178] S. D. Fouse, R. P. Nagarajan, i J. F. Costello, «Genome-scale DNA methylation analysis», *Epigenomics*, vol. 2, núm. 1, p. 105-117, feb. 2010.
- [179] H. Bierne, M. Hamon, i P. Cossart, «Epigenetics and bacterial infections», *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 2, núm. 12, p. a010272, des. 2012.
- [180] M. N. Dang, R. Buzzetti, i P. Pozzilli, «Epigenetics in autoimmune diseases with focus on type 1 diabetes», *Diabetes Metab. Res. Rev.*, vol. 29, núm. 1, p. 8-18, gen. 2013.
- [181] M. Esteller, «Epigenetics in cancer», *N. Engl. J. Med.*, vol. 358, núm. 11, p. 1148-1159, març 2008.
- [182] Y. Natsume-Kitatani, M. Shiga, i H. Mamitsuka, «Genome-Wide Integration on Transcription Factors, Histone Acetylation and Gene Expression Reveals Genes Co-Regulated by Histone Modification Patterns», *PLoS ONE*, vol. 6, núm. 7, p. e22281, jul. 2011.
- [183] B. D. Strahl i C. D. Allis, «The language of covalent histone modifications», *Nature*, vol. 403, núm. 6765, p. 41-45, gen. 2000.
- [184] S. G. Gray i T. J. Ekström, «The Human Histone Deacetylase Family», *Exp. Cell Res.*, vol. 262, núm. 2, p. 75-83, gen. 2001.
- [185] I. V. Gregoret, Y.-M. Lee, i H. V. Goodson, «Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis», *J. Mol. Biol.*, vol. 338, núm. 1, p. 17-31, abr. 2004.
- [186] M. Buchwald, O. H. Krämer, i T. Heinzel, «HDACi--targets beyond chromatin», *Cancer Lett.*, vol. 280, núm. 2, p. 160-167, ago. 2009.
- [187] Y. Tang, W. Zhao, Y. Chen, Y. Zhao, i W. Gu, «Acetylation is indispensable for p53 activation», *Cell*, vol. 133, núm. 4, p. 612-626, maig 2008.
- [188] S. Ray, C. Lee, T. Hou, I. Boldogh, i A. R. Brasier, «Requirement of histone deacetylase1 (HDAC1) in signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) nucleocytoplasmic distribution», *Nucleic Acids Res.*, vol. 36, núm. 13, p. 4510-4520, ago. 2008.
- [189] R. Kiernan, V. Brès, R. W. M. Ng, M.-P. Coudart, S. El Messaoudi, C. Sardet, D.-Y. Jin, S. Emiliani, i M. Benkirane, «Post-activation turn-off of NF-kappa B-dependent transcription



- is regulated by acetylation of p65», *J. Biol. Chem.*, vol. 278, núm. 4, p. 2758-2766, gen. 2003.
- [190] C. Hubbert, A. Guardiola, R. Shao, Y. Kawaguchi, A. Ito, A. Nixon, M. Yoshida, X.-F. Wang, i T.-P. Yao, «HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase», *Nature*, vol. 417, núm. 6887, p. 455-458, maig 2002.
- [191] J. J. Kovacs, P. J. M. Murphy, S. Gaillard, X. Zhao, J.-T. Wu, C. V. Nicchitta, M. Yoshida, D. O. Toft, W. B. Pratt, i T.-P. Yao, «HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor», *Mol. Cell*, vol. 18, núm. 5, p. 601-607, maig 2005.
- [192] C. Choudhary, C. Kumar, F. Gnad, M. L. Nielsen, M. Rehman, T. C. Walther, J. V. Olsen, i M. Mann, «Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions», *Science*, vol. 325, núm. 5942, p. 834-840, ago. 2009.
- [193] L. Wang, E. F. de Zoeten, M. I. Greene, i W. W. Hancock, «Immunomodulatory effects of deacetylase inhibitors: therapeutic targeting of FOXP3+ regulatory T cells», *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 8, núm. 12, p. 969-981, des. 2009.
- [194] W. K. Rasheed, R. W. Johnstone, i H. M. Prince, «Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy», *Expert Opin. Investig. Drugs*, vol. 16, núm. 5, p. 659-678, maig 2007.
- [195] J. R. Somoza, R. J. Skene, B. A. Katz, C. Mol, J. D. Ho, A. J. Jennings, C. Luong, A. Arvai, J. J. Buggy, E. Chi, J. Tang, B.-C. Sang, E. Verner, R. Wynands, E. M. Leahy, D. R. Dougan, G. Snell, M. Navre, M. W. Knuth, R. V. Swanson, D. E. McRee, i L. W. Tari, «Structural Snapshots of Human HDAC8 Provide Insights into the Class I Histone Deacetylases», *Structure*, vol. 12, núm. 7, p. 1325-1334, jul. 2004.
- [196] G. H. Eom i H. Kook, «Posttranslational modifications of histone deacetylases: implications for cardiovascular diseases», *Pharmacol. Ther.*, vol. 143, núm. 2, p. 168-180, ago. 2014.
- [197] L. P. Breitling, R. Yang, B. Korn, B. Burwinkel, i H. Brenner, «Tobacco-smoking-related differential DNA methylation: 27K discovery and replication», *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 88, núm. 4, p. 450-457, abr. 2011.
- [198] L. J. Buro-Auremma, J. Salit, N. R. Hackett, M. S. Walters, Y. Strulovici-Barel, M. R. Staudt, J. Fuller, M. Mahmoud, C. S. Stevenson, H. Hilton, M. W. Y. Ho, i R. G. Crystal, «Cigarette smoking induces small airway epithelial epigenetic changes with corresponding modulation of gene expression», *Hum. Mol. Genet.*, vol. 22, núm. 23, p. 4726-4738, des. 2013.
- [199] I. Smolarek, E. Wyszko, A. M. Barciszewska, S. Nowak, I. Gawronska, A. Jablecka, i M. Z. Barciszewska, «Global DNA methylation changes in blood of patients with essential hypertension», *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.*, vol. 16, núm. 3, p. CR149-155, març 2010.
- [200] C. Fuke, M. Shimabukuro, A. Petronis, J. Sugimoto, T. Oda, K. Miura, T. Miyazaki, C. Ogura, Y. Okazaki, i Y. Jinno, «Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study», *Ann. Hum. Genet.*, vol. 68, núm. Pt 3, p. 196-204, maig 2004.
- [201] B. Zhou, A. Margariti, L. Zeng, i Q. Xu, «Role of histone deacetylases in vascular cell homeostasis and arteriosclerosis», *Cardiovasc. Res.*, vol. 90, núm. 3, p. 413-420, juny 2011.
- [202] H. M. Findeisen, F. Gizard, Y. Zhao, H. Qing, E. B. Heywood, K. L. Jones, D. Cohn, i D. Bruemmer, «Epigenetic regulation of vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation by histone deacetylase inhibition», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 31, núm. 4, p. 851-860, abr. 2011.
- [203] N. Mitro, C. Godio, E. De Fabiani, E. Scotti, A. Galmozzi, F. Gilardi, D. Caruso, A. B. Vigil Chacon, i M. Crestani, «Insights in the regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene reveal a target for modulating bile acid synthesis», *Hepatol. Baltim. Md*, vol. 46, núm. 3, p. 885-897, set. 2007.

- [204] J.-H. Choi, K.-H. Nam, J. Kim, M. W. Baek, J.-E. Park, H.-Y. Park, H. J. Kwon, O.-S. Kwon, D.-Y. Kim, i G. T. Oh, «Trichostatin A exacerbates atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 25, núm. 11, p. 2404-2409, nov. 2005.
- [205] Y. Choi, S.-K. Park, H. M. Kim, J. S. Kang, Y. D. Yoon, S. B. Han, J. W. Han, J. S. Yang, i G. Han, «Histone deacetylase inhibitor KBH-A42 inhibits cytokine production in RAW 264.7 macrophage cells and in vivo endotoxemia model», *Exp. Mol. Med.*, vol. 40, núm. 5, p. 574-581, oct. 2008.
- [206] K. Inoue, M. Kobayashi, K. Yano, M. Miura, A. Izumi, C. Mataka, T. Doi, T. Hamakubo, P. C. Reid, D. A. Hume, M. Yoshida, W. C. Aird, T. Kodama, i T. Minami, «Histone deacetylase inhibitor reduces monocyte adhesion to endothelium through the suppression of vascular cell adhesion molecule-1 expression», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 26, núm. 12, p. 2652-2659, des. 2006.
- [207] S. Dunoyer-Geindre i E. K. O. Kruihof, «Epigenetic control of tissue-type plasminogen activator synthesis in human endothelial cells», *Cardiovasc. Res.*, vol. 90, núm. 3, p. 457-463, juny 2011.
- [208] J. Wang, S. A. Mahmud, P. B. Bitterman, Y. Huo, i A. Slungaard, «Histone deacetylase inhibitors suppress TF-kappaB-dependent agonist-driven tissue factor expression in endothelial cells and monocytes», *J. Biol. Chem.*, vol. 282, núm. 39, p. 28408-28418, set. 2007.
- [209] S. M. Krishna, A. E. Dear, P. E. Norman, i J. Golledge, «Genetic and epigenetic mechanisms and their possible role in abdominal aortic aneurysm», *Atherosclerosis*, vol. 212, núm. 1, p. 16-29, set. 2010.
- [210] A. Vinh, T. A. Gaspari, H. B. Liu, L. F. Dousha, R. E. Widdop, i A. E. Dear, «A novel histone deacetylase inhibitor reduces abdominal aortic aneurysm formation in angiotensin II-infused apolipoprotein E-deficient mice», *J. Vasc. Res.*, vol. 45, núm. 2, p. 143-152, 2008.
- [211] R. C. Siegel, S. R. Pinnell, i G. R. Martin, «Cross-linking of collagen and elastin. Properties of lysyl oxidase», *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 9, núm. 23, p. 4486-4492, nov. 1970.
- [212] H. A. Lucero i H. M. Kagan, «Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function», *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, vol. 63, núm. 19-20, p. 2304-2316, oct. 2006.
- [213] K. Csiszar, «Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family», *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, vol. 70, p. 1-32, 2001.
- [214] J. Molnar, K. S. K. Fong, Q. P. He, K. Hayashi, Y. Kim, S. F. T. Fong, B. Fogelgren, K. M. Szauder, M. Mink, i K. Csiszar, «Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins», *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1647, núm. 1-2, p. 220-224, abr. 2003.
- [215] K. Hayashi, K. S. K. Fong, F. Mercier, C. D. Boyd, K. Csiszar, i M. Hayashi, «Comparative immunocytochemical localization of lysyl oxidase (LOX) and the lysyl oxidase-like (LOXL) proteins: changes in the expression of LOXL during development and growth of mouse tissues», *J. Mol. Histol.*, vol. 35, núm. 8-9, p. 845-855, nov. 2004.
- [216] H. E. Barker, T. R. Cox, i J. T. Erler, «The rationale for targeting the LOX family in cancer», *Nat. Rev. Cancer*, vol. 12, núm. 8, p. 540-552, ago. 2012.
- [217] S. Kim, S. Park, i Y. Kim, «Alternative promoter activation leads to the expression of a novel human lysyl oxidase variant that functions as an amine oxidase», *Int. J. Mol. Med.*, vol. 34, núm. 3, p. 894-899, set. 2014.
- [218] L. I. Smith-Mungo i H. M. Kagan, «Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology», *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.*, vol. 16, núm. 7, p. 387-398, feb. 1998.
- [219] M. Baccarani-Contri, D. Vincenzi, D. Quaglino, G. Mori, i I. Pasquali-Ronchetti, «Localization of human placenta lysyl oxidase on human placenta, skin and aorta by immunoelectronmicroscopy», *Matrix Stuttg. Ger.*, vol. 9, núm. 6, p. 428-436, 1989.
- [220] H. M. Kagan i W. Li, «Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell», *J. Cell. Biochem.*, vol. 88, núm. 4, p. 660-672, març 2003.

- [221] J. M. Mäki, J. Räsänen, H. Tikkanen, R. Sormunen, K. Mäkilallio, K. I. Kivirikko, i R. Soininen, «Inactivation of the lysyl oxidase gene *Lox* leads to aortic aneurysms, cardiovascular dysfunction, and perinatal death in mice», *Circulation*, vol. 106, núm. 19, p. 2503-2509, nov. 2002.
- [222] I. K. Hornstra, S. Birge, B. Starcher, A. J. Bailey, R. P. Mecham, i S. D. Shapiro, «Lysyl oxidase is required for vascular and diaphragmatic development in mice», *J. Biol. Chem.*, vol. 278, núm. 16, p. 14387-14393, abr. 2003.
- [223] K. Csiszar, I. Entersz, P. C. Trackman, D. Samid, i C. D. Boyd, «Functional analysis of the promoter and first intron of the human lysyl oxidase gene», *Mol. Biol. Rep.*, vol. 23, núm. 2, p. 97-108, 1996.
- [224] M. I. Uzel, S. D. Shih, H. Gross, E. Kessler, L. C. Gerstenfeld, i P. C. Trackman, «Molecular events that contribute to lysyl oxidase enzyme activity and insoluble collagen accumulation in osteosarcoma cell clones», *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 15, núm. 6, p. 1189-1197, juny 2000.
- [225] K. E. Gregory, M. E. Marsden, J. Anderson-MacKenzie, J. B. Bard, P. Bruckner, J. Farjanel, S. P. Robins, i D. J. Hulmes, «Abnormal collagen assembly, though normal phenotype, in alginate bead cultures of chick embryo chondrocytes», *Exp. Cell Res.*, vol. 246, núm. 1, p. 98-107, gen. 1999.
- [226] H. M. Kagan, C. A. Vaccaro, R. E. Bronson, S. S. Tang, i J. S. Brody, «Ultrastructural immunolocalization of lysyl oxidase in vascular connective tissue», *J. Cell Biol.*, vol. 103, núm. 3, p. 1121-1128, set. 1986.
- [227] M. L. Casey i P. C. MacDonald, «Lysyl oxidase (ras recision gene) expression in human amnion: ontogeny and cellular localization», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 82, núm. 1, p. 167-172, gen. 1997.
- [228] P. C. Trackman, D. Bedell-Hogan, J. Tang, i H. M. Kagan, «Post-translational glycosylation and proteolytic processing of a lysyl oxidase precursor», *J. Biol. Chem.*, vol. 267, núm. 12, p. 8666-8671, abr. 1992.
- [229] T. Kosonen, J. Y. Uriu-Hare, M. S. Clegg, C. L. Keen, i R. B. Rucker, «Incorporation of copper into lysyl oxidase», *Biochem. J.*, vol. 327 ( Pt 1), p. 283-289, oct. 1997.
- [230] S. X. Wang, M. Mure, K. F. Medzihradzky, A. L. Burlingame, D. E. Brown, D. M. Dooley, A. J. Smith, H. M. Kagan, i J. P. Klinman, «A crosslinked cofactor in lysyl oxidase: redox function for amino acid side chains», *Science*, vol. 273, núm. 5278, p. 1078-1084, ago. 1996.
- [231] D. L. Layman, A. S. Narayanan, i G. R. Martin, «The production of lysyl oxidase by human fibroblasts in culture», *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 149, núm. 1, p. 97-101, març 1972.
- [232] H. Kuivaniemi, L. Ala-Kokko, i K. I. Kivirikko, «Secretion of lysyl oxidase by cultured human skin fibroblasts and effects of monensin, nigericin, tunicamycin and colchicine», *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 883, núm. 2, p. 326-334, set. 1986.
- [233] M. I. Uzel, I. C. Scott, H. Babakhanlou-Chase, A. H. Palamakumbura, W. N. Pappano, H. H. Hong, D. S. Greenspan, i P. C. Trackman, «Multiple bone morphogenetic protein 1-related mammalian metalloproteinases process pro-lysyl oxidase at the correct physiological site and control lysyl oxidase activation in mouse embryo fibroblast cultures», *J. Biol. Chem.*, vol. 276, núm. 25, p. 22537-22543, juny 2001.
- [234] A. D. Cronshaw, L. A. Fothergill-Gilmore, i D. J. Hulmes, «The proteolytic processing site of the precursor of lysyl oxidase.», *Biochem. J.*, vol. 306, núm. Pt 1, p. 279-284, feb. 1995.
- [235] M. V. Panchenko, W. G. Stetler-Stevenson, O. V. Trubetskoy, S. N. Gacheru, i H. M. Kagan, «Metalloproteinase activity secreted by fibrogenic cells in the processing of prolysyl oxidase. Potential role of procollagen C-proteinase», *J. Biol. Chem.*, vol. 271, núm. 12, p. 7113-7119, març 1996.
- [236] Y. L. Song, J. W. Ford, D. Gordon, i C. J. Shanley, «Regulation of lysyl oxidase by interferon-gamma in rat aortic smooth muscle cells», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 20, núm. 4, p. 982-988, abr. 2000.

- [237] E. J. Feres-Filho, G. B. Menassa, i P. C. Trackman, «Regulation of lysyl oxidase by basic fibroblast growth factor in osteoblastic MC3T3-E1 cells», *J. Biol. Chem.*, vol. 271, núm. 11, p. 6411-6416, març 1996.
- [238] P. C. Trackman, R. J. Graham, H. K. Bittner, D. L. Carnes, J. A. Gilles, i D. T. Graves, «Inflammation-associated lysyl oxidase protein expression in vivo, and modulation by FGF-2 plus IGF-1», *Histochem. Cell Biol.*, vol. 110, núm. 1, p. 9-14, jul. 1998.
- [239] A. M. Boak, R. Roy, J. Berk, L. Taylor, P. Polgar, R. H. Goldstein, i H. M. Kagan, «Regulation of lysyl oxidase expression in lung fibroblasts by transforming growth factor-beta 1 and prostaglandin E2», *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 11, núm. 6, p. 751-755, des. 1994.
- [240] J. Choung, L. Taylor, K. Thomas, X. Zhou, H. Kagan, X. Yang, i P. Polgar, «Role of EP2 receptors and cAMP in prostaglandin E2 regulated expression of type I collagen alpha1, lysyl oxidase, and cyclooxygenase-1 genes in human embryo lung fibroblasts», *J. Cell. Biochem.*, vol. 71, núm. 2, p. 254-263, nov. 1998.
- [241] R. Roy, P. Polgar, Y. Wang, R. H. Goldstein, L. Taylor, i H. M. Kagan, «Regulation of lysyl oxidase and cyclooxygenase expression in human lung fibroblasts: interactions among TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , and prostaglandin E», *J. Cell. Biochem.*, vol. 62, núm. 3, p. 411-417, set. 1996.
- [242] K. K. Bose, J. Chakraborty, S. Khuder, W. H. Smith-Mensah, i J. Robinson, «Lysyl oxidase activity in the cells of flexor retinaculum of individuals with carpal tunnel syndrome», *J. Occup. Environ. Med. Am. Coll. Occup. Environ. Med.*, vol. 42, núm. 6, p. 582-587, juny 2000.
- [243] E. J. Feres-Filho, Y. J. Choi, X. Han, T. E. Takala, i P. C. Trackman, «Pre- and post-translational regulation of lysyl oxidase by transforming growth factor-beta 1 in osteoblastic MC3T3-E1 cells», *J. Biol. Chem.*, vol. 270, núm. 51, p. 30797-30803, des. 1995.
- [244] S. N. Gacheru, K. M. Thomas, S. A. Murray, K. Csiszar, L. I. Smith-Mungo, i H. M. Kagan, «Transcriptional and post-transcriptional control of lysyl oxidase expression in vascular smooth muscle cells: effects of TGF-beta 1 and serum deprivation», *J. Cell. Biochem.*, vol. 65, núm. 3, p. 395-407, juny 1997.
- [245] H. H. Hong, M. I. Uzel, C. Duan, M. C. Sheff, i P. C. Trackman, «Regulation of lysyl oxidase, collagen, and connective tissue growth factor by TGF-beta1 and detection in human gingiva», *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*, vol. 79, núm. 12, p. 1655-1667, des. 1999.
- [246] M. Shibamura, J. Mashimo, A. Mita, T. Kuroki, i K. Nose, «Cloning from a mouse osteoblastic cell line of a set of transforming-growth-factor-beta 1-regulated genes, one of which seems to encode a follistatin-related polypeptide», *Eur. J. Biochem. FEBS*, vol. 217, núm. 1, p. 13-19, oct. 1993.
- [247] R. E. Bronson, S. D. Calaman, A. M. Traish, i H. M. Kagan, «Stimulation of lysyl oxidase (EC 1.4.3.13) activity by testosterone and characterization of androgen receptors in cultured calf aorta smooth-muscle cells.», *Biochem. J.*, vol. 244, núm. 2, p. 317-323, juny 1987.
- [248] K. Ravid, L. I. Smith-Mungo, Z. Zhao, K. M. Thomas, i H. M. Kagan, «Upregulation of lysyl oxidase in vascular smooth muscle cells by cAMP: role for adenosine receptor activation», *J. Cell. Biochem.*, vol. 75, núm. 1, p. 177-185, oct. 1999.
- [249] R. S. Green, M. E. Lieb, A. S. Weintraub, S. N. Gacheru, C. L. Rosenfield, S. Shah, H. M. Kagan, i M. B. Taubman, «Identification of lysyl oxidase and other platelet-derived growth factor-inducible genes in vascular smooth muscle cells by differential screening», *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*, vol. 73, núm. 4, p. 476-482, oct. 1995.
- [250] L. Smith-Mungo i H. M. Kagan, «PKC-MEK-MAPK-dependent signal transduction pathway mediates the stimulation of lysyl oxidase expression by serum and PDGF in rat aortic smooth muscle cells», *J. Cell. Biochem.*, vol. 85, núm. 4, p. 775-784, 2002.

- [251] C. Rodríguez, B. Raposo, J. Martínez-González, L. Casaní, i L. Badimon, «Low density lipoproteins downregulate lysyl oxidase in vascular endothelial cells and the arterial wall», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 22, núm. 9, p. 1409-1414, set. 2002.
- [252] N. Pischon, L. M. Darbois, A. H. Palamakumbura, E. Kessler, i P. C. Trackman, «Regulation of collagen deposition and lysyl oxidase by tumor necrosis factor-alpha in osteoblasts», *J. Biol. Chem.*, vol. 279, núm. 29, p. 30060-30065, jul. 2004.
- [253] C. Rodríguez, J. F. Alcludia, J. Martínez-González, B. Raposo, M. A. Navarro, i L. Badimon, «Lysyl oxidase (LOX) down-regulation by TNF $\alpha$ : A new mechanism underlying TNF $\alpha$ -induced endothelial dysfunction», *Atherosclerosis*, vol. 196, núm. 2, p. 558-564, feb. 2008.
- [254] T. G. Voloshenyuk, A. D. Hart, E. Khoutorova, i J. D. Gardner, «TNF- $\alpha$  increases cardiac fibroblast lysyl oxidase expression through TGF- $\beta$  and PI3Kinase signaling pathways», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 413, núm. 2, p. 370-375, set. 2011.
- [255] J. T. Erler, K. L. Bennewith, M. Nicolau, N. Dornhöfer, C. Kong, Q.-T. Le, J.-T. A. Chi, S. S. Jeffrey, i A. J. Giaccia, «Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis», *Nature*, vol. 440, núm. 7088, p. 1222-1226, abr. 2006.
- [256] B. Raposo, C. Rodríguez, J. Martínez-González, i L. Badimon, «High levels of homocysteine inhibit lysyl oxidase (LOX) and downregulate LOX expression in vascular endothelial cells», *Atherosclerosis*, vol. 177, núm. 1, p. 1-8, nov. 2004.
- [257] B. Fogelgren, N. Polgár, K. M. Szauter, Z. Ujfaludi, R. Laczkó, K. S. K. Fong, i K. Csiszar, «Cellular fibronectin binds to lysyl oxidase with high affinity and is critical for its proteolytic activation», *J. Biol. Chem.*, vol. 280, núm. 26, p. 24690-24697, jul. 2005.
- [258] G. Huang, Y. Zhang, B. Kim, G. Ge, D. S. Annis, D. F. Mosher, i D. S. Greenspan, «Fibronectin binds and enhances the activity of bone morphogenetic protein 1», *J. Biol. Chem.*, vol. 284, núm. 38, p. 25879-25888, set. 2009.
- [259] H. Wachi, H. Sugitani, S. Tajima, i Y. Seyama, «Endothelin-1 Down-Regulates Expression of Tropoelastin and Lysyl Oxidase mRNA in Cultured Chick Aortic Smooth Muscle Cells», *J. Health Sci.*, vol. 47, núm. 6, p. 525-532, des. 2001.
- [260] J. F. Alcludia, J. Martinez-Gonzalez, A. Guadall, M. Gonzalez-Diez, L. Badimon, i C. Rodriguez, «Lysyl oxidase and endothelial dysfunction: mechanisms of lysyl oxidase down-regulation by pro-inflammatory cytokines», *Front. Biosci. J. Virtual Libr.*, vol. 13, p. 2721-2727, 2008.
- [261] W. Li, K. Nellaiappan, T. Strassmaier, L. Graham, K. M. Thomas, i H. M. Kagan, «Localization and activity of lysyl oxidase within nuclei of fibrogenic cells», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 94, núm. 24, p. 12817-12822, nov. 1997.
- [262] P. A. Hurtado, S. Vora, S. S. Sume, D. Yang, C. St Hilaire, Y. Guo, A. H. Palamakumbura, B. M. Schreiber, K. Ravid, i P. C. Trackman, «Lysyl oxidase propeptide inhibits smooth muscle cell signaling and proliferation», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 366, núm. 1, p. 156-161, feb. 2008.
- [263] P. R. Williamson i H. M. Kagan, «Reaction pathway of bovine aortic lysyl oxidase», *J. Biol. Chem.*, vol. 261, núm. 20, p. 9477-9482, jul. 1986.
- [264] M. Akagawa i K. Suyama, «Characterization of a model compound for the lysine tyrosylquinone cofactor of lysyl oxidase», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 281, núm. 1, p. 193-199, feb. 2001.
- [265] H. M. Kagan, M. A. Williams, P. R. Williamson, i J. M. Anderson, «Influence of sequence and charge on the specificity of lysyl oxidase toward protein and synthetic peptide substrates», *J. Biol. Chem.*, vol. 259, núm. 18, p. 11203-11207, set. 1984.
- [266] W. Li, M. A. Nugent, Y. Zhao, A. N. Chau, S. J. Li, I.-N. Chou, G. Liu, i H. M. Kagan, «Lysyl oxidase oxidizes basic fibroblast growth factor and inactivates its mitogenic potential», *J. Cell. Biochem.*, vol. 88, núm. 1, p. 152-164, gen. 2003.
- [267] M. K. Jansen i K. Csiszar, «Intracellular localization of the matrix enzyme lysyl oxidase in polarized epithelial cells», *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.*, vol. 26, núm. 2, p. 136-139, març 2007.

- [268] F. A. Saad, M. Torres, H. Wang, i L. Graham, «Intracellular lysyl oxidase: effect of a specific inhibitor on nuclear mass in proliferating cells», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 396, núm. 4, p. 944-949, juny 2010.
- [269] K. Nellaiappan, A. Risitano, G. Liu, G. Nicklas, i H. M. Kagan, «Fully processed lysyl oxidase catalyst translocates from the extracellular space into nuclei of aortic smooth-muscle cells», *J. Cell. Biochem.*, vol. 79, núm. 4, p. 576-582, set. 2000.
- [270] M. L. Mello, S. Contente, B. C. Vidal, W. Planding, i U. Schenck, «Modulation of ras transformation affecting chromatin supraorganization as assessed by image analysis», *Exp. Cell Res.*, vol. 220, núm. 2, p. 374-382, oct. 1995.
- [271] H. M. Kagan, M. A. Williams, S. D. Calaman, i E. M. Berkowitz, «Histone H1 is a substrate for lysyl oxidase and contains endogenous sodium borotritide-reducible residues», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 115, núm. 1, p. 186-192, ago. 1983.
- [272] M. Giampuzzi, R. Oleggini, i A. Di Donato, «Demonstration of in vitro interaction between tumor suppressor lysyl oxidase and histones H1 and H2: definition of the regions involved», *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1647, núm. 1-2, p. 245-251, abr. 2003.
- [273] R. Oleggini, N. Gastaldo, i A. Di Donato, «Regulation of elastin promoter by lysyl oxidase and growth factors: cross control of lysyl oxidase on TGF-beta1 effects», *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.*, vol. 26, núm. 6, p. 494-505, jul. 2007.
- [274] M. Giampuzzi, R. Oleggini, C. Albanese, R. Pestell, i A. Di Donato, «beta-catenin signaling and regulation of cyclin D1 promoter in NRK-49F cells transformed by down-regulation of the tumor suppressor lysyl oxidase», *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1745, núm. 3, p. 370-381, set. 2005.
- [275] A. Iturbide, A. García de Herreros, i S. Peiró, «A new role for LOX and LOXL2 proteins in transcription regulation», *FEBS J.*, ago. 2014.
- [276] Y. Guo, N. Pischon, A. H. Palamakumbura, i P. C. Trackman, «Intracellular distribution of the lysyl oxidase propeptide in osteoblastic cells», *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 292, núm. 6, p. C2095-2102, juny 2007.
- [277] J. Li, X. Gu, Y. Ma, M. L. Calicchio, D. Kong, Y. D. Teng, L. Yu, A. M. Crain, T. K. Vartanian, R. Pasqualini, W. Arap, T. A. Libermann, E. Y. Snyder, i R. L. Sidman, «Nna1 mediates Purkinje cell dendritic development via lysyl oxidase propeptide and NF-kB signaling», *Neuron*, vol. 68, núm. 1, p. 45-60, oct. 2010.
- [278] S. Futaki, I. Nakase, T. Suzuki, Z. Youjun, i Y. Sugiura, «Translocation of branched-chain arginine peptides through cell membranes: flexibility in the spatial disposition of positive charges in membrane-permeable peptides», *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 41, núm. 25, p. 7925-7930, juny 2002.
- [279] A. H. Palamakumbura, S. Jeay, Y. Guo, N. Pischon, P. Sommer, G. E. Sonenshein, i P. C. Trackman, «The propeptide domain of lysyl oxidase induces phenotypic reversion of ras-transformed cells», *J. Biol. Chem.*, vol. 279, núm. 39, p. 40593-40600, set. 2004.
- [280] K. Nakai i P. Horton, «PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization», *Trends Biochem. Sci.*, vol. 24, núm. 1, p. 34-36, gen. 1999.
- [281] J. M. Mäki, R. Sormunen, S. Lippo, R. Kaarteenaho-Wiik, R. Soininen, i J. Myllyharju, «Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissues», *Am. J. Pathol.*, vol. 167, núm. 4, p. 927-936, oct. 2005.
- [282] J. Löhler, R. Timpl, i R. Jaenisch, «Embryonic lethal mutation in mouse collagen I gene causes rupture of blood vessels and is associated with erythropoietic and mesenchymal cell death», *Cell*, vol. 38, núm. 2, p. 597-607, set. 1984.
- [283] E. Pöschl, U. Schlötzer-Schrehardt, B. Brachvogel, K. Saito, Y. Ninomiya, i U. Mayer, «Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development», *Dev. Camb. Engl.*, vol. 131, núm. 7, p. 1619-1628, abr. 2004.

- [284] J. M. Mäki, «Lysyl oxidases in mammalian development and certain pathological conditions», *Histol. Histopathol.*, vol. 24, núm. 5, p. 651-660, maig 2009.
- [285] H. M. Kagan, «Lysyl oxidase: mechanism, regulation and relationship to liver fibrosis», *Pathol. Res. Pract.*, vol. 190, núm. 9-10, p. 910-919, oct. 1994.
- [286] A. Di Donato, G. M. Ghiggeri, M. Di Duca, E. Jivotenko, R. Acinni, J. Campolo, F. Ginevri, i R. Gusmano, «Lysyl oxidase expression and collagen cross-linking during chronic adriamycin nephropathy», *Nephron*, vol. 76, núm. 2, p. 192-200, 1997.
- [287] A. Desmoulière, I. Darby, A. M. Costa, M. Raccurt, B. Tuchweber, P. Sommer, i G. Gabbiani, «Extracellular matrix deposition, lysyl oxidase expression, and myofibroblastic differentiation during the initial stages of cholestatic fibrosis in the rat», *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*, vol. 76, núm. 6, p. 765-778, juny 1997.
- [288] P. Sivakumar, S. Gupta, S. Sarkar, i S. Sen, «Upregulation of lysyl oxidase and MMPs during cardiac remodeling in human dilated cardiomyopathy», *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 307, núm. 1-2, p. 159-167, gen. 2008.
- [289] E. G. Tzortzaki, J. A. Tischfield, A. Sahota, N. M. Siafakas, M. K. Gordon, i D. R. Gerecke, «Expression of FACIT collagens XII and XIV during bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice», *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.*, vol. 275, núm. 2, p. 1073-1080, des. 2003.
- [290] Z. Vadasz, O. Kessler, G. Akiri, S. Gengrinovitch, H. M. Kagan, Y. Baruch, O. B. Izhak, i G. Neufeld, «Abnormal deposition of collagen around hepatocytes in Wilson's disease is associated with hepatocyte specific expression of lysyl oxidase and lysyl oxidase like protein-2», *J. Hepatol.*, vol. 43, núm. 3, p. 499-507, set. 2005.
- [291] B. López, R. Querejeta, A. González, J. Beaumont, M. Larman, i J. Díez, «Impact of treatment on myocardial lysyl oxidase expression and collagen cross-linking in patients with heart failure», *Hypertension*, vol. 53, núm. 2, p. 236-242, feb. 2009.
- [292] Y. Zhang, M. Ghazwani, J. Li, M. Sun, D. B. Stolz, F. He, J. Fan, W. Xie, i S. Li, «MiR-29b inhibits collagen maturation in hepatic stellate cells through down-regulating the expression of HSP47 and lysyl oxidase», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 446, núm. 4, p. 940-944, abr. 2014.
- [293] S. Lee, D. E. Solow-Cordero, E. Kessler, K. Takahara, i D. S. Greenspan, «Transforming growth factor-beta regulation of bone morphogenetic protein-1/procollagen C-proteinase and related proteins in fibrogenic cells and keratinocytes», *J. Biol. Chem.*, vol. 272, núm. 30, p. 19059-19066, jul. 1997.
- [294] C. J. Shanley, M. Gharaee-Kermani, R. Sarkar, T. H. Welling, A. Kriegel, J. W. Ford, J. C. Stanley, i S. H. Phan, «Transforming growth factor- $\beta$ 1 increases lysyl oxidase enzyme activity and mRNA in rat aortic smooth muscle cells», *J. Vasc. Surg.*, vol. 25, núm. 3, p. 446-452, març 1997.
- [295] H. Ovet i F. Oztay, «The copper chelator tetrathiomolybdate regressed bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice, by reducing lysyl oxidase expressions», *Biol. Trace Elem. Res.*, vol. 162, núm. 1-3, p. 189-199, des. 2014.
- [296] T. Cheng, Q. Liu, R. Zhang, Y. Zhang, J. Chen, R. Yu, i G. Ge, «Lysyl oxidase promotes bleomycin-induced lung fibrosis through modulating inflammation», *J. Mol. Cell Biol.*, vol. 6, núm. 6, p. 506-515, des. 2014.
- [297] G. M. Gilad, H. M. Kagan, i V. H. Gilad, «Evidence for increased lysyl oxidase, the extracellular matrix-forming enzyme, in Alzheimer's disease brain», *Neurosci. Lett.*, vol. 376, núm. 3, p. 210-214, març 2005.
- [298] P.-A. Li, Q. He, T. Cao, G. Yong, K. M. Szauter, K. S. K. Fong, J. Karlsson, M. F. Keep, i K. Csiszar, «Up-regulation and altered distribution of lysyl oxidase in the central nervous system of mutant SOD1 transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis», *Brain Res. Mol. Brain Res.*, vol. 120, núm. 2, p. 115-122, gen. 2004.
- [299] S. L. Payne, M. J. C. Hendrix, i D. A. Kirschmann, «Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer--a prospect», *J. Cell. Biochem.*, vol. 101, núm. 6, p. 1338-1354, ago. 2007.

- [300] S. Gao, K. Chen, Y. Zhao, C. B. Rich, L. Chen, S. J. Li, P. Toselli, P. Stone, i W. Li, «Transcriptional and Posttranscriptional Inhibition of Lysyl Oxidase Expression by Cigarette Smoke Condensate in Cultured Rat Fetal Lung Fibroblasts», *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.*, vol. 87, núm. 1, p. 197-203, set. 2005.
- [301] M. Osman, J. O. Cantor, S. Roffman, S. Keller, G. M. Turino, i I. Mandl, «Cigarette smoke impairs elastin resynthesis in lungs of hamsters with elastase-induced emphysema», *Am. Rev. Respir. Dis.*, vol. 132, núm. 3, p. 640-643, set. 1985.
- [302] Y. Jiang, W. Zong, H. Luan, J. Liu, A. Zhang, X. Li, S. Liu, S. Zhang, i J. Gao, «Decreased expression of elastin and lysyl oxidase family genes in urogenital tissues of aging mice», *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, vol. 40, núm. 8, p. 1998-2004, ago. 2014.
- [303] A. H. Nave, I. Mižiková, G. Niess, H. Steenbock, F. Reichenberger, M. L. Talavera, F. Veit, S. Herold, K. Mayer, I. Vadász, N. Weissmann, W. Seeger, J. Brinckmann, i R. E. Morty, «Lysyl oxidases play a causal role in vascular remodeling in clinical and experimental pulmonary arterial hypertension», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 34, núm. 7, p. 1446-1458, jul. 2014.
- [304] A. M. Zimnicka, H. Tang, Q. Guo, F. K. Kuhr, M.-J. Oh, J. Wan, J. Chen, K. A. Smith, D. R. Fraidenburg, M. S. R. Choudhury, I. Levitan, R. F. Machado, J. H. Kaplan, i J. X.-J. Yuan, «Upregulated copper transporters in hypoxia-induced pulmonary hypertension», *PLoS One*, vol. 9, núm. 3, p. e90544, 2014.
- [305] S. Contente, K. Kenyon, D. Rimoldi, i R. M. Friedman, «Expression of gene *rrg* is associated with reversion of NIH 3T3 transformed by LTR-c-H-ras», *Science*, vol. 249, núm. 4970, p. 796-798, ago. 1990.
- [306] H. Kuivaniemi, R. M. Korhonen, A. Vaheri, i K. I. Kivirikko, «Deficient production of lysyl oxidase in cultures of malignantly transformed human cells», *FEBS Lett.*, vol. 195, núm. 1-2, p. 261-264, gen. 1986.
- [307] C. Bouez, C. Reynaud, E. Noblesse, A. Thépot, C. Gleyzal, J. Kanitakis, E. Perrier, O. Damour, i P. Sommer, «The lysyl oxidase LOX is absent in basal and squamous cell carcinomas and its knockdown induces an invading phenotype in a skin equivalent model», *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 12, núm. 5, p. 1463-1469, març 2006.
- [308] K. Csiszar, S. F. T. Fong, A. Ujfalusi, S. A. Krawetz, E. P. Salvati, J. W. Mackenzie, i C. D. Boyd, «Somatic mutations of the lysyl oxidase gene on chromosome 5q23.1 in colorectal tumors», *Int. J. Cancer J. Int. Cancer*, vol. 97, núm. 5, p. 636-642, feb. 2002.
- [309] A. Kaneda, K. Wakazono, T. Tsukamoto, N. Watanabe, Y. Yagi, M. Tatematsu, M. Kaminishi, T. Sugimura, i T. Ushijima, «Lysyl oxidase is a tumor suppressor gene inactivated by methylation and loss of heterozygosity in human gastric cancers», *Cancer Res.*, vol. 64, núm. 18, p. 6410-6415, set. 2004.
- [310] C. Ren, G. Yang, T. L. Timme, T. M. Wheeler, i T. C. Thompson, «Reduced lysyl oxidase messenger RNA levels in experimental and human prostate cancer», *Cancer Res.*, vol. 58, núm. 6, p. 1285-1290, març 1998.
- [311] M. Giampuzzi, G. Botti, M. Cilli, R. Gusmano, A. Borel, P. Sommer, i A. Di Donato, «Down-regulation of lysyl oxidase-induced tumorigenic transformation in NRK-49F cells characterized by constitutive activation of ras proto-oncogene», *J. Biol. Chem.*, vol. 276, núm. 31, p. 29226-29232, ago. 2001.
- [312] F. L. Sung, Y. Cui, E. P. Hui, L. Li, T. K. Loh, Q. Tao, i A. T. Chan, «Silencing of hypoxia-inducible tumor suppressor lysyl oxidase gene by promoter methylation activates carbonic anhydrase IX in nasopharyngeal carcinoma», *Am. J. Cancer Res.*, vol. 4, núm. 6, p. 789-800, 2014.
- [313] M. Wu, C. Min, X. Wang, Z. Yu, K. H. Kirsch, P. C. Trackman, i G. E. Sonenshein, «Repression of BCL2 by the Tumor Suppressor Activity of the Lysyl Oxidase Propeptide Inhibits Transformed Phenotype of Lung and Pancreatic Cancer Cells», *Cancer Res.*, vol. 67, núm. 13, p. 6278-6285, gen. 2007.



- [314] S. Jeay, S. Pianetti, H. M. Kagan, i G. E. Sonenshein, «Lysyl Oxidase Inhibits Ras-Mediated Transformation by Preventing Activation of NF- $\kappa$ B», *Mol. Cell. Biol.*, vol. 23, núm. 7, p. 2251-2263, gen. 2003.
- [315] C. Min, K. H. Kirsch, Y. Zhao, S. Jeay, A. H. Palamakumbura, P. C. Trackman, i G. E. Sonenshein, «The tumor suppressor activity of the lysyl oxidase propeptide reverses the invasive phenotype of Her-2/neu-driven breast cancer», *Cancer Res.*, vol. 67, núm. 3, p. 1105-1112, feb. 2007.
- [316] Y. Zhao, C. Min, S. R. Vora, P. C. Trackman, G. E. Sonenshein, i K. H. Kirsch, «The lysyl oxidase pro-peptide attenuates fibronectin-mediated activation of focal adhesion kinase and p130Cas in breast cancer cells», *J. Biol. Chem.*, vol. 284, núm. 3, p. 1385-1393, gen. 2009.
- [317] Y. Zheng, X. Wang, H. Wang, W. Yan, Q. Zhang, i X. Chang, «Expression of the lysyl oxidase propeptide in hepatocellular carcinoma and its clinical relevance», *Oncol. Rep.*, vol. 31, núm. 4, p. 1669-1676, abr. 2014.
- [318] D. A. Kirschmann, E. A. Seftor, D. R. Nieva, E. A. Mariano, i M. J. Hendrix, «Differentially expressed genes associated with the metastatic phenotype in breast cancer», *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 55, núm. 2, p. 127-136, maig 1999.
- [319] M. J. J. G. Stassar, G. Devitt, M. Brosius, L. Rinnab, J. Prang, T. Schradin, J. Simon, S. Petersen, A. Kopp-Schneider, i M. Zöller, «Identification of human renal cell carcinoma associated genes by suppression subtractive hybridization», *Br. J. Cancer*, vol. 85, núm. 9, p. 1372-1382, nov. 2001.
- [320] J. Helleman, M. P. H. M. Jansen, K. Ruigrok-Ritstier, I. L. van Staveren, M. P. Look, M. E. Meijer-van Gelder, A. M. Sieuwerts, J. G. M. Klijn, S. Sleijfer, J. A. Foekens, i E. M. J. J. Berns, «Association of an extracellular matrix gene cluster with breast cancer prognosis and endocrine therapy response», *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 14, núm. 17, p. 5555-5564, set. 2008.
- [321] J. Liu, W. Ping, Y. Zu, i W. Sun, «Correlations of lysyl oxidase with MMP2/MMP9 expression and its prognostic value in non-small cell lung cancer», *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, vol. 7, núm. 9, p. 6040-6047, 2014.
- [322] M. Boufraqueh, N. Nilubol, L. Zhang, S. K. Gara, S. M. Sadowski, A. Mehta, M. He, S. Davis, J. Dreiling, J. A. Copland, R. C. Smallridge, M. M. Quezado, i E. Kebebew, «miR30a Inhibits LOX Expression and Anaplastic Thyroid Cancer Progression», *Cancer Res.*, vol. 75, núm. 2, p. 367-377, gen. 2015.
- [323] L.-M. Postovit, D. E. Abbott, S. L. Payne, W. W. Wheaton, N. V. Margaryan, R. Sullivan, M. K. Jansen, K. Csiszar, M. J. C. Hendrix, i D. A. Kirschmann, «Hypoxia/reoxygenation: a dynamic regulator of lysyl oxidase-facilitated breast cancer migration», *J. Cell. Biochem.*, vol. 103, núm. 5, p. 1369-1378, abr. 2008.
- [324] Y. Wang, J. Ma, H. Shen, C. Wang, Y. Sun, S. B. Howell, i X. Lin, «Reactive oxygen species promote ovarian cancer progression via the HIF-1 $\alpha$ /LOX/E-cadherin pathway», *Oncol. Rep.*, vol. 32, núm. 5, p. 2150-2158, nov. 2014.
- [325] R. Schietke, C. Warnecke, I. Wacker, J. Schödel, D. R. Mole, V. Campean, K. Amann, M. Goppelt-Struebe, J. Behrens, K.-U. Eckardt, i M. S. Wiesener, «The lysyl oxidases LOX and LOXL2 are necessary and sufficient to repress E-cadherin in hypoxia: insights into cellular transformation processes mediated by HIF-1», *J. Biol. Chem.*, vol. 285, núm. 9, p. 6658-6669, feb. 2010.
- [326] D. F. Higgins, K. Kimura, W. M. Bernhardt, N. Shrimanker, Y. Akai, B. Hohenstein, Y. Saito, R. S. Johnson, M. Kretzler, C. D. Cohen, K.-U. Eckardt, M. Iwano, i V. H. Haase, «Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition», *J. Clin. Invest.*, vol. 117, núm. 12, p. 3810-3820, des. 2007.
- [327] C. Sahlgren, M. V. Gustafsson, S. Jin, L. Poellinger, i U. Lendahl, «Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, núm. 17, p. 6392-6397, abr. 2008.

- [328] J. T. Erler, K. L. Bennewith, T. R. Cox, G. Lang, D. Bird, A. Koong, Q.-T. Le, i A. J. Giaccia, «Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche», *Cancer Cell*, vol. 15, núm. 1, p. 35-44, gen. 2009.
- [329] C. C.-L. Wong, D. M. Gilkes, H. Zhang, J. Chen, H. Wei, P. Chaturvedi, S. I. Fraley, C.-M. Wong, U.-S. Khoo, I. O.-L. Ng, D. Wirtz, i G. L. Semenza, «Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, núm. 39, p. 16369-16374, set. 2011.
- [330] R. N. Kaplan, R. D. Riba, S. Zacharoulis, A. H. Bramley, L. Vincent, C. Costa, D. D. MacDonald, D. K. Jin, K. Shido, S. A. Kerns, Z. Zhu, D. Hicklin, Y. Wu, J. L. Port, N. Altorki, E. R. Port, D. Ruggero, S. V. Shmelkov, K. K. Jensen, S. Rafii, i D. Lyden, «VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche», *Nature*, vol. 438, núm. 7069, p. 820-827, des. 2005.
- [331] J. Condeelis i J. W. Pollard, «Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis», *Cell*, vol. 124, núm. 2, p. 263-266, gen. 2006.
- [332] F. Pez, F. Dayan, J. Durivault, B. Kaniewski, G. Aimond, G. S. Le Provost, B. Deux, P. Clézardin, P. Sommer, J. Pouyssegur, i C. Reynaud, «The HIF-1-inducible lysyl oxidase activates HIF-1 via the Akt pathway in a positive regulation loop and synergizes with HIF-1 in promoting tumor cell growth», *Cancer Res.*, vol. 71, núm. 5, p. 1647-1657, març 2011.
- [333] C. J. Shen, A. Sharma, D.-V. Vuong, J. T. Erler, M. Pruschy, i A. Brogini-Tenzer, «Ionizing radiation induces tumor cell lysyl oxidase secretion», *BMC Cancer*, vol. 14, p. 532, 2014.
- [334] R. Oleggini i A. Di Donato, «Lysyl oxidase regulates MMTV promoter: indirect evidence of histone H1 involvement», *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.*, vol. 89, núm. 6, p. 522-532, des. 2011.
- [335] C. Rodríguez, B. Raposo, J. Martínez-González, L. Casaní, i L. Badimon, «Low density lipoproteins downregulate lysyl oxidase in vascular endothelial cells and the arterial wall», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 22, núm. 9, p. 1409-1414, set. 2002.
- [336] T. Nyström, A. Nygren, i A. Sjöholm, «Increased levels of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in patients with Type II diabetes mellitus after myocardial infarction are related to endothelial dysfunction», *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979, vol. 110, núm. 6, p. 673-681, juny 2006.
- [337] C. Rodríguez, J. F. Alcudia, J. Martínez-González, A. Guadall, B. Raposo, S. Sánchez-Gómez, i L. Badimon, «Statins normalize vascular lysyl oxidase down-regulation induced by proatherogenic risk factors», *Cardiovasc. Res.*, vol. 83, núm. 3, p. 595-603, ago. 2009.
- [338] H. M. Lazarus, W. W. Cruikshank, N. Narasimhan, H. M. Kagan, i D. M. Center, «Induction of human monocyte motility by lysyl oxidase», *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.*, vol. 14, núm. 9, p. 727-731, des. 1995.
- [339] W. Li, G. Liu, I. N. Chou, i H. M. Kagan, «Hydrogen peroxide-mediated, lysyl oxidase-dependent chemotaxis of vascular smooth muscle cells», *J. Cell. Biochem.*, vol. 78, núm. 4, p. 550-557, juny 2000.
- [340] G. A. Ferns, E. W. Raines, K. H. Sprugel, A. S. Motani, M. A. Reidy, i R. Ross, «Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF», *Science*, vol. 253, núm. 5024, p. 1129-1132, set. 1991.
- [341] H. A. Lucero, K. Ravid, J. L. Grimsby, C. B. Rich, S. J. DiCamillo, J. M. Mäki, J. Myllyharju, i H. M. Kagan, «Lysyl oxidase oxidizes cell membrane proteins and enhances the chemotactic response of vascular smooth muscle cells», *J. Biol. Chem.*, vol. 283, núm. 35, p. 24103-24117, ago. 2008.
- [342] G. Weissen-Plenz, H. Eschert, W. Volker, J. R. Sindermann, S. Beissert, H. Robenek, H. H. Scheld, i G. Breithardt, «Granulocyte macrophage colony-stimulating factor deficiency affects vascular elastin production and integrity of elastic lamellae», *J. Vasc. Res.*, vol. 45, núm. 2, p. 103-110, 2008.

- [343] H. M. Kagan, J. Raghavan, i W. Hollander, «Changes in aortic lysyl oxidase activity in diet-induced atherosclerosis in the rabbit», *Arterioscler. Dallas Tex*, vol. 1, núm. 4, p. 287-291, ago. 1981.
- [344] V. K. Nuthakki, P. S. Fleiser, L. E. Malinzak, M. L. Seymour, R. E. Callahan, P. J. Bendick, G. B. Zelenock, i C. J. Shanley, «Lysyl oxidase expression in a rat model of arterial balloon injury», *J. Vasc. Surg.*, vol. 40, núm. 1, p. 123-129, jul. 2004.
- [345] L. Casani, S. Sanchez-Gomez, G. Vilahur, i L. Badimon, «Pravastatin reduces thrombogenicity by mechanisms beyond plasma cholesterol lowering», *Thromb. Haemost.*, vol. 94, núm. 5, p. 1035-1041, nov. 2005.
- [346] P. Libby, G. Sukhova, R. T. Lee, i Z. S. Galis, «Cytokines regulate vascular functions related to stability of the atherosclerotic plaque», *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 25 Suppl 2, p. S9-12, 1995.
- [347] O. A. Ovchinnikova, L. Folkersen, J. Persson, J. H. N. Lindeman, T. Ueland, P. Aukrust, N. Gavrisheva, E. Shlyakhto, G. Paulsson-Berne, U. Hedin, P. S. Olofsson, i G. K. Hansson, «The collagen cross-linking enzyme lysyl oxidase is associated with the healing of human atherosclerotic lesions», *J. Intern. Med.*, vol. 276, núm. 5, p. 525-536, nov. 2014.
- [348] B. Schieffer, T. Selle, A. Hilfiker, D. Hilfiker-Kleiner, K. Grote, U. J. F. Tietge, C. Trautwein, M. Luchtefeld, C. Schmittkamp, S. Heeneman, M. J. A. P. Daemen, i H. Drexler, «Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis», *Circulation*, vol. 110, núm. 22, p. 3493-3500, nov. 2004.
- [349] H. Tanaka, G. Sukhova, D. Schwartz, i P. Libby, «Proliferating arterial smooth muscle cells after balloon injury express TNF-alpha but not interleukin-1 or basic fibroblast growth factor», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 16, núm. 1, p. 12-18, gen. 1996.
- [350] M. W. Majesky, M. A. Reidy, D. F. Bowen-Pope, C. E. Hart, J. N. Wilcox, i S. M. Schwartz, «PDGF ligand and receptor gene expression during repair of arterial injury», *J. Cell Biol.*, vol. 111, núm. 5 Pt 1, p. 2149-2158, nov. 1990.
- [351] J. R. Spears, H. Zhan, S. Khurana, R. L. Karvonen, i K. M. Reiser, «Modulation by beta-aminopropionitrile of vessel luminal narrowing and structural abnormalities in arterial wall collagen in a rabbit model of conventional balloon angioplasty versus laser balloon angioplasty.», *J. Clin. Invest.*, vol. 93, núm. 4, p. 1543-1553, abr. 1994.
- [352] C. Brasselet, E. Durand, F. Addad, A. Al Haj Zen, M. B. Smeets, D. Laurent-Maquin, S. Bouthors, G. Bellon, D. de Kleijn, G. Godeau, R. Garnotel, B. Gogly, i A. Lafont, «Collagen and elastin cross-linking: a mechanism of constrictive remodeling after arterial injury», *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 289, núm. 5, p. H2228-2233, nov. 2005.
- [353] A. Brüel, G. Ortoft, i H. Oxlund, «Inhibition of cross-links in collagen is associated with reduced stiffness of the aorta in young rats», *Atherosclerosis*, vol. 140, núm. 1, p. 135-145, set. 1998.
- [354] T. Aoki, H. Kataoka, R. Ishibashi, K. Nozaki, R. Morishita, i N. Hashimoto, «Reduced collagen biosynthesis is the hallmark of cerebral aneurysm: contribution of interleukin-1beta and nuclear factor-kappaB», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 29, núm. 7, p. 1080-1086, jul. 2009.
- [355] E. W. Remus, R. E. O'Donnell, K. Rafferty, D. Weiss, G. Joseph, K. Csiszar, S. F. T. Fong, i W. R. Taylor, «The role of lysyl oxidase family members in the stabilization of abdominal aortic aneurysms», *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 303, núm. 8, p. H1067-1075, oct. 2012.
- [356] M. Onoda, K. Yoshimura, H. Aoki, Y. Ikeda, N. Morikage, A. Furutani, M. Matsuzaki, i K. Hamano, «Lysyl oxidase resolves inflammation by reducing monocyte chemoattractant protein-1 in abdominal aortic aneurysm», *Atherosclerosis*, vol. 208, núm. 2, p. 366-369, feb. 2010.
- [357] Y. Seyama i H. Wachi, «Atherosclerosis and matrix dystrophy», *J. Atheroscler. Thromb.*, vol. 11, núm. 5, p. 236-245, 2004.
- [358] I. Sibon, P. Sommer, J. M. D. Lamaziere, i J. Bonnet, «Lysyl oxidase deficiency: a new cause of human arterial dissection», *Heart*, vol. 91, núm. 5, p. e33, maig 2005.

- [359] J. Choi, A. Bergdahl, Q. Zheng, B. Starcher, H. Yanagisawa, i E. C. Davis, «Analysis of dermal elastic fibers in the absence of fibulin-5 reveals potential roles for fibulin-5 in elastic fiber assembly», *Matrix Biol.*, vol. 28, núm. 4, p. 211-220, maig 2009.
- [360] R. C. Kowal, J. A. Richardson, J. M. Miano, i E. N. Olson, «EVEC, a Novel Epidermal Growth Factor-Like Repeat-Containing Protein Upregulated in Embryonic and Diseased Adult Vasculature», *Circ. Res.*, vol. 84, núm. 10, p. 1166-1176, maig 1999.
- [361] T. Nakamura, P. R. Lozano, Y. Ikeda, Y. Iwanaga, A. Hinek, S. Minamisawa, C.-F. Cheng, K. Kobuke, N. Dalton, Y. Takada, K. Tashiro, J. Ross Jr, T. Honjo, i K. R. Chien, «Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo», *Nature*, vol. 415, núm. 6868, p. 171-175, gen. 2002.
- [362] R. Nonaka, S. Onoue, H. Wachi, F. Sato, Z. Urban, B. C. Starcher, i Y. Seyama, «DANCE/fibulin-5 promotes elastic fiber formation in a tropoelastin isoform-dependent manner», *Clin. Biochem.*, vol. 42, núm. 7-8, p. 713-721, maig 2009.
- [363] H. Yanagisawa, E. C. Davis, B. C. Starcher, T. Ouchi, M. Yanagisawa, J. A. Richardson, i E. N. Olson, «Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo», *Nature*, vol. 415, núm. 6868, p. 168-171, gen. 2002.
- [364] T. Nakamura, P. Ruiz-Lozano, V. Lindner, D. Yabe, M. Taniwaki, Y. Furukawa, K. Kobuke, K. Tashiro, Z. Lu, N. L. Andon, R. Schaub, A. Matsumori, S. Sasayama, K. R. Chien, i T. Honjo, «DANCE, a Novel Secreted RGD Protein Expressed in Developing, Atherosclerotic, and Balloon-injured Arteries», *J. Biol. Chem.*, vol. 274, núm. 32, p. 22476-22483, juny 1999.
- [365] W. S. Argraves, L. M. Greene, M. A. Cooley, i W. M. Gallagher, «Fibulins: physiological and disease perspectives», *EMBO Rep.*, vol. 4, núm. 12, p. 1127-1131, des. 2003.
- [366] A. R. Albig i W. P. Schiemann, «Fibulin-5 function during tumorigenesis», *Future Oncol. Lond. Engl.*, vol. 1, núm. 1, p. 23-35, feb. 2005.
- [367] S. de Vega, T. Iwamoto, i Y. Yamada, «Fibulins: multiple roles in matrix structures and tissue functions», *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, vol. 66, núm. 11-12, p. 1890-1902, juny 2009.
- [368] A. K. Downing, V. Knott, J. M. Werner, C. M. Cardy, I. D. Campbell, i P. A. Handford, «Solution Structure of a Pair of Calcium-Binding Epidermal Growth Factor-like Domains: Implications for the Marfan Syndrome and Other Genetic Disorders», *Cell*, vol. 85, núm. 4, p. 597-605, maig 1996.
- [369] E. Ruoslahti i M. D. Pierschbacher, «New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins», *Science*, vol. 238, núm. 4826, p. 491-497, oct. 1987.
- [370] P. Booms, R. Pregla, A. Ney, F. Barthel, D. P. Reinhardt, A. Pletschacher, S. Mundlos, i P. N. Robinson, «RGD-containing fibrillin-1 fragments upregulate matrix metalloproteinase expression in cell culture: a potential factor in the pathogenesis of the Marfan syndrome», *Hum. Genet.*, vol. 116, núm. 1-2, p. 51-61, gen. 2005.
- [371] H. Yanagisawa, M. K. Schluterman, i R. A. Brekken, «Fibulin-5, an integrin-binding matricellular protein: its function in development and disease», *J. Cell Commun. Signal.*, vol. 3, núm. 3-4, p. 337-347, des. 2009.
- [372] C. L. Papke i H. Yanagisawa, «Fibulin-4 and fibulin-5 in elastogenesis and beyond: Insights from mouse and human studies», *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.*, vol. 37, p. 142-149, jul. 2014.
- [373] J. E. Wagenseil i R. P. Mecham, «New insights into elastic fiber assembly», *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.*, vol. 81, núm. 4, p. 229-240, des. 2007.
- [374] H. Yanagisawa i E. C. Davis, «Unraveling the mechanism of elastic fiber assembly: The roles of short fibulins», *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 42, núm. 7, p. 1084-1093, jul. 2010.
- [375] B. A. Cox, B. C. Starcher, i D. W. Urry, «Communication: Coacervation of tropoelastin results in fiber formation», *J. Biol. Chem.*, vol. 249, núm. 3, p. 997-998, feb. 1974.
- [376] B. Vrhovski, S. Jensen, i A. S. Weiss, «Coacervation characteristics of recombinant human tropoelastin», *Eur. J. Biochem. FEBS*, vol. 250, núm. 1, p. 92-98, nov. 1997.
- [377] J. T. Cirulis, C. M. Bellingham, E. C. Davis, D. Hubmacher, D. P. Reinhardt, R. P. Mecham, i F. W. Keeley, «Fibrillins, fibulins, and matrix-associated glycoprotein modulate the

- kinetics and morphology of in vitro self-assembly of a recombinant elastin-like polypeptide», *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 47, núm. 47, p. 12601-12613, nov. 2008.
- [378] L. J. Freeman, A. Lomas, N. Hodson, M. J. Sherratt, K. T. Mellody, A. S. Weiss, A. Shuttleworth, i C. M. Kielty, «Fibulin-5 interacts with fibrillin-1 molecules and microfibrils», *Biochem. J.*, vol. 388, núm. Pt 1, p. 1-5, maig 2005.
- [379] Q. Zheng, E. C. Davis, J. A. Richardson, B. C. Starcher, T. Li, R. D. Gerard, i H. Yanagisawa, «Molecular Analysis of Fibulin-5 Function during De Novo Synthesis of Elastic Fibers», *Mol. Cell. Biol.*, vol. 27, núm. 3, p. 1083-1095, feb. 2007.
- [380] E. El-Hallous, T. Sasaki, D. Hubmacher, M. Getie, K. Tiedemann, J. Brinckmann, B. Bätge, E. C. Davis, i D. P. Reinhardt, «Fibrillin-1 interactions with fibulins depend on the first hybrid domain and provide an adaptor function to tropoelastin», *J. Biol. Chem.*, vol. 282, núm. 12, p. 8935-8946, març 2007.
- [381] H. M. Kagan i P. C. Trackman, «Properties and function of lysyl oxidase», *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 5, núm. 3, p. 206-210, set. 1991.
- [382] A. Czirok, J. Zach, B. A. Kozel, R. P. Mecham, E. C. Davis, i B. J. Rongish, «Elastic fiber macro-assembly is a hierarchical, cell motion-mediated process», *J. Cell. Physiol.*, vol. 207, núm. 1, p. 97-106, abr. 2006.
- [383] B. A. Kozel, B. J. Rongish, A. Czirok, J. Zach, C. D. Little, E. C. Davis, R. H. Knutsen, J. E. Wagenseil, M. A. Levy, i R. P. Mecham, «Elastic fiber formation: a dynamic view of extracellular matrix assembly using timer reporters», *J. Cell. Physiol.*, vol. 207, núm. 1, p. 87-96, abr. 2006.
- [384] A. C. Lomas, K. T. Mellody, L. J. Freeman, D. V. Bax, C. A. Shuttleworth, i C. M. Kielty, «Fibulin-5 binds human smooth-muscle cells through alpha5beta1 and alpha4beta1 integrins, but does not support receptor activation», *Biochem. J.*, vol. 405, núm. 3, p. 417-428, ago. 2007.
- [385] N. Kobayashi, G. Kostka, J. H. O. Garbe, D. R. Keene, H. P. Bächinger, F.-G. Hanisch, D. Markova, T. Tsuda, R. Timpl, M.-L. Chu, i T. Sasaki, «A comparative analysis of the fibulin localisation», *J. Biol. Chem.*, vol. 282, núm. 16, p. 11805-11816, abr. 2007.
- [386] M. Budatha, S. Roshanravan, Q. Zheng, C. Weislander, S. L. Chapman, E. C. Davis, B. Starcher, R. A. Word, i H. Yanagisawa, «Extracellular matrix proteases contribute to progression of pelvic organ prolapse in mice and humans», *J. Clin. Invest.*, vol. 121, núm. 5, p. 2048-2059, maig 2011.
- [387] H. Wachi, R. Nonaka, F. Sato, K. Shibata-Sato, M. Ishida, S. Iketani, I. Maeda, K. Okamoto, Z. Urban, S. Onoue, i Y. Seyama, «Characterization of the molecular interaction between tropoelastin and DANCE/fibulin-5», *J. Biochem. (Tokyo)*, vol. 143, núm. 5, p. 633-639, maig 2008.
- [388] M. Hirai, T. Ohbayashi, M. Horiguchi, K. Okawa, A. Hagiwara, K. R. Chien, T. Kita, i T. Nakamura, «Fibulin-5/DANCE has an elastogenic organizer activity that is abrogated by proteolytic cleavage in vivo», *J. Cell Biol.*, vol. 176, núm. 7, p. 1061-1071, març 2007.
- [389] A. W. Clarke, S. G. Wise, S. A. Cain, C. M. Kielty, i A. S. Weiss, «Coacervation is promoted by molecular interactions between the PF2 segment of fibrillin-1 and the domain 4 region of tropoelastin», *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 44, núm. 30, p. 10271-10281, ago. 2005.
- [390] K. Akhtar, T. J. Broekelmann, M. Miao, F. W. Keeley, B. C. Starcher, R. A. Pierce, R. P. Mecham, i T. L. Adair-Kirk, «Oxidative and nitrosative modifications of tropoelastin prevent elastic fiber assembly in vitro», *J. Biol. Chem.*, vol. 285, núm. 48, p. 37396-37404, nov. 2010.
- [391] X. Liu, Y. Zhao, J. Gao, B. Pawlyk, B. Starcher, J. A. Spencer, H. Yanagisawa, J. Zuo, i T. Li, «Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein», *Nat. Genet.*, vol. 36, núm. 2, p. 178-182, feb. 2004.
- [392] L. Thomassin, C. C. Werneck, T. J. Broekelmann, C. Gleyzal, I. K. Hornstra, R. P. Mecham, i P. Sommer, «The Pro-regions of lysyl oxidase and lysyl oxidase-like 1 are required for

- deposition onto elastic fibers», *J. Biol. Chem.*, vol. 280, núm. 52, p. 42848-42855, des. 2005.
- [393] K. Noda, B. Dabovic, K. Takagi, T. Inoue, M. Horiguchi, M. Hirai, Y. Fujikawa, T. O. Akama, K. Kusumoto, L. Zilberberg, L. Y. Sakai, K. Koli, M. Naitoh, H. von Melchner, S. Suzuki, D. B. Rifkin, i T. Nakamura, «Latent TGF- $\beta$  binding protein 4 promotes elastic fiber assembly by interacting with fibulin-5», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, núm. 8, p. 2852-2857, feb. 2013.
- [394] M. A. Sideek, C. Menz, M. K. Parsi, i M. A. Gibson, «LTBP-2 competes with tropoelastin for binding to fibulin-5 and heparin, and is a negative modulator of elastinogenesis», *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.*, vol. 34, p. 114-123, feb. 2014.
- [395] E. Tsuruga, T. Yajima, i K. Irie, «Induction of fibulin-5 gene is regulated by tropoelastin gene, and correlated with tropoelastin accumulation in vitro», *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 36, núm. 3, p. 395-400, març 2004.
- [396] A. Kapetanopoulos, F. Fresser, G. Millonig, Y. Shaul, G. Baier, i G. Utermann, «Direct interaction of the extracellular matrix protein DANCE with apolipoprotein(a) mediated by the kringle IV-type 2 domain», *Mol. Genet. Genomics MGG*, vol. 267, núm. 4, p. 440-446, juny 2002.
- [397] M. Preis, T. Cohen, Y. Sarnatzki, Y. Ben Yosef, J. Schneiderman, Z. Gluzman, B. Koren, B. S. Lewis, Y. Shaul, i M. Y. Flugelman, «Effects of fibulin-5 on attachment, adhesion, and proliferation of primary human endothelial cells», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 348, núm. 3, p. 1024-1033, set. 2006.
- [398] J. A. Spencer, S. L. Hacker, E. C. Davis, R. P. Mecham, R. H. Knutsen, D. Y. Li, R. D. Gerard, J. A. Richardson, E. N. Olson, i H. Yanagisawa, «Altered vascular remodeling in fibulin-5-deficient mice reveals a role of fibulin-5 in smooth muscle cell proliferation and migration», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, núm. 8, p. 2946-2951, feb. 2005.
- [399] S. L. Chapman, F.-X. Sicot, E. C. Davis, J. Huang, T. Sasaki, M.-L. Chu, i H. Yanagisawa, «Fibulin-2 and fibulin-5 cooperatively function to form the internal elastic lamina and protect from vascular injury», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 30, núm. 1, p. 68-74, gen. 2010.
- [400] L. Sanz i L. Álvarez-Vallina, «The extracellular matrix: a new turn-of-the-screw for anti-angiogenic strategies», *Trends Mol. Med.*, vol. 9, núm. 6, p. 256-262, juny 2003.
- [401] J. Sottile, «Regulation of angiogenesis by extracellular matrix», *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1654, núm. 1, p. 13-22, març 2004.
- [402] Q. Zheng, J. Choi, L. Rouleau, R. L. Leask, J. A. Richardson, E. C. Davis, i H. Yanagisawa, «Normal wound healing in mice deficient for fibulin-5, an elastin binding protein essential for dermal elastic fiber assembly», *J. Invest. Dermatol.*, vol. 126, núm. 12, p. 2707-2714, des. 2006.
- [403] K. M. Sullivan, R. Bissonnette, H. Yanagisawa, S. N. Hussain, i E. C. Davis, «Fibulin-5 functions as an endogenous angiogenesis inhibitor», *Lab. Invest.*, vol. 87, núm. 8, p. 818-827, jul. 2007.
- [404] A. R. Albig i W. P. Schiemann, «Fibulin-5 antagonizes vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling and angiogenic sprouting by endothelial cells», *DNA Cell Biol.*, vol. 23, núm. 6, p. 367-379, juny 2004.
- [405] A. R. Albig, J. R. Neil, i W. P. Schiemann, «Fibulins 3 and 5 antagonize tumor angiogenesis in vivo», *Cancer Res.*, vol. 66, núm. 5, p. 2621-2629, març 2006.
- [406] W. P. Schiemann, G. C. Blobel, D. E. Kalume, A. Pandey, i H. F. Lodish, «Context-specific effects of fibulin-5 (DANCE/EVEC) on cell proliferation, motility, and invasion. Fibulin-5 is induced by transforming growth factor-beta and affects protein kinase cascades», *J. Biol. Chem.*, vol. 277, núm. 30, p. 27367-27377, jul. 2002.
- [407] J. C. Rodriguez-Manzaneque, T. F. Lane, M. A. Ortega, R. O. Hynes, J. Lawler, i M. L. Iruela-Arispe, «Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits

- activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, núm. 22, p. 12485-12490, oct. 2001.
- [408] N. Guo, H. C. Krutzsch, J. K. Inman, i D. D. Roberts, «Thrombospondin 1 and type I repeat peptides of thrombospondin 1 specifically induce apoptosis of endothelial cells», *Cancer Res.*, vol. 57, núm. 9, p. 1735-1742, maig 1997.
- [409] K. Kadoya, T. Sasaki, G. Kostka, R. Timpl, K. Matsuzaki, N. Kumagai, L. Y. Sakai, T. Nishiyama, i S. Amano, «Fibulin-5 deposition in human skin: decrease with ageing and ultraviolet B exposure and increase in solar elastosis», *Br. J. Dermatol.*, vol. 153, núm. 3, p. 607-612, set. 2005.
- [410] P. Takacs, M. Nassiri, A. Viciano, K. Candiotti, A. Fornoni, i C. A. Medina, «Fibulin-5 expression is decreased in women with anterior vaginal wall prolapse», *Int. Urogynecol. J. Pelvic Floor Dysfunct.*, vol. 20, núm. 2, p. 207-211, feb. 2009.
- [411] B. Loeys, L. Van Maldergem, G. Mortier, P. Coucke, S. Gerniers, J.-M. Naeyaert, i A. De Paepe, «Homozygosity for a missense mutation in fibulin-5 (FBLN5) results in a severe form of cutis laxa», *Hum. Mol. Genet.*, vol. 11, núm. 18, p. 2113-2118, set. 2002.
- [412] D. Markova, Y. Zou, F. Ringpfeil, T. Sasaki, G. Kostka, R. Timpl, J. Uitto, i M.-L. Chu, «Genetic heterogeneity of cutis laxa: a heterozygous tandem duplication within the fibulin-5 (FBLN5) gene», *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 72, núm. 4, p. 998-1004, abr. 2003.
- [413] E. M. Stone, T. A. Braun, S. R. Russell, M. H. Kuehn, A. J. Lotery, P. A. Moore, C. G. Eastman, T. L. Casavant, i V. C. Sheffield, «Missense variations in the fibulin 5 gene and age-related macular degeneration», *N. Engl. J. Med.*, vol. 351, núm. 4, p. 346-353, jul. 2004.
- [414] M. Nita, B. Strzałka-Mrozik, A. Grzybowski, U. Mazurek, i W. Romaniuk, «Age-related macular degeneration and changes in the extracellular matrix», *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.*, vol. 20, p. 1003-1016, 2014.
- [415] W. Yue, Q. Sun, R. Landreneau, C. Wu, J. M. Siegfried, J. Yu, i L. Zhang, «Fibulin-5 suppresses lung cancer invasion by inhibiting matrix metalloproteinase-7 expression», *Cancer Res.*, vol. 69, núm. 15, p. 6339-6346, ago. 2009.
- [416] Q. M. Guo, R. L. Malek, S. Kim, C. Chiao, M. He, M. Ruffy, K. Sanka, N. H. Lee, C. V. Dang, i E. T. Liu, «Identification of c-myc responsive genes using rat cDNA microarray», *Cancer Res.*, vol. 60, núm. 21, p. 5922-5928, nov. 2000.
- [417] J. D. Watson, S. K. Oster, M. Shago, F. Khosravi, i L. Z. Penn, «Identifying genes regulated in a Myc-dependent manner», *J. Biol. Chem.*, vol. 277, núm. 40, p. 36921-36930, oct. 2002.
- [418] L. Xie, K. Palmsten, B. MacDonald, M. W. Kieran, S. Potenta, S. Vong, i R. Kalluri, «Basement membrane derived fibulin-1 and fibulin-5 function as angiogenesis inhibitors and suppress tumor growth», *Exp. Biol. Med. Maywood NJ*, vol. 233, núm. 2, p. 155-162, feb. 2008.
- [419] K. Tu, C. Dou, X. Zheng, C. Li, W. Yang, Y. Yao, i Q. Liu, «Fibulin-5 inhibits hepatocellular carcinoma cell migration and invasion by down-regulating matrix metalloproteinase-7 expression», *BMC Cancer*, vol. 14, p. 938, 2014.
- [420] H. D. Møller, U. Ralfkjær, N. Cremers, M. Frankel, R. T. Pedersen, J. Klingelhöfer, H. Yanagisawa, M. Grigorian, P. Guldborg, J. Sleeman, E. Lukanidin, i N. Ambartsumian, «Role of Fibulin-5 in Metastatic Organ Colonization», *Mol. Cancer Res.*, vol. 9, núm. 5, p. 553-563, gen. 2011.
- [421] Y.-H. Lee, A. R. Albig, M. Regner, B. J. Schiemann, i W. P. Schiemann, «Fibulin-5 initiates epithelial-mesenchymal transition (EMT) and enhances EMT induced by TGF-beta in mammary epithelial cells via a MMP-dependent mechanism», *Carcinogenesis*, vol. 29, núm. 12, p. 2243-2251, des. 2008.
- [422] W. Xiao, S. Zhou, H. Xu, H. Li, G. He, Y. Liu, i Y. Qi, «Nogo-B promotes the epithelial-mesenchymal transition in HeLa cervical cancer cells via Fibulin-5», *Oncol. Rep.*, vol. 29, núm. 1, p. 109-116, gen. 2013.

- [423] C.-F. Hwang, L.-Y. Shiu, L.-J. Su, null Yu-Fang Yin, W.-S. Wang, S.-C. Huang, T.-J. Chiu, C.-C. Huang, Y.-Y. Zhen, H.-T. Tsai, F.-M. Fang, T.-L. Huang, i C.-H. Chen, «Oncogenic fibulin-5 promotes nasopharyngeal carcinoma cell metastasis through the FLJ10540/AKT pathway and correlates with poor prognosis», *PLoS One*, vol. 8, núm. 12, p. e84218, 2013.
- [424] X.-Y. Shi, L. Wang, C.-H. Cao, Z.-Y. Li, J. Chen, i C. Li, «Effect of Fibulin-5 on cell proliferation and invasion in human gastric cancer patients», *Asian Pac. J. Trop. Med.*, vol. 7, núm. 10, p. 787-791, oct. 2014.
- [425] M. Groessl, A. Slany, A. Bileck, K. Gloessmann, D. Kreutz, W. Jaeger, G. Pfeiler, i C. Gerner, «Proteome profiling of breast cancer biopsies reveals a wound healing signature of cancer-associated fibroblasts», *J. Proteome Res.*, vol. 13, núm. 11, p. 4773-4782, nov. 2014.
- [426] J. Ferruzzi, M. R. Bersi, S. Uman, H. Yanagisawa, i J. D. Humphrey, «Decreased elastic energy storage, not increased material stiffness, characterizes central artery dysfunction in fibulin-5 deficiency independent of sex», *J. Biomech. Eng.*, vol. 137, núm. 3, març 2015.
- [427] V. P. Le, J. K. Cheng, J. Kim, M. C. Staiculescu, S. W. Ficker, S. C. Sheth, S. A. Bhayani, R. P. Mechem, H. Yanagisawa, i J. E. Wagenseil, «Mechanical factors direct mouse aortic remodelling during early maturation», *J. R. Soc. Interface R. Soc.*, vol. 12, núm. 104, març 2015.
- [428] V. P. Le, K. V. Stoka, H. Yanagisawa, i J. E. Wagenseil, «Fibulin-5 null mice with decreased arterial compliance maintain normal systolic left ventricular function, but not diastolic function during maturation», *Physiol. Rep.*, vol. 2, núm. 3, p. e00257, 2014.
- [429] J. F. Cornhill i M. R. Roach, «A quantitative study of the localization of atherosclerotic lesions in the rabbit aorta», *Atherosclerosis*, vol. 23, núm. 3, p. 489-501, juny 1976.
- [430] D. P. Giddens, C. K. Zarins, i S. Glagov, «The role of fluid mechanics in the localization and detection of atherosclerosis», *J. Biomech. Eng.*, vol. 115, núm. 4B, p. 588-594, nov. 1993.
- [431] J.-C. Jean, I. Eruchalu, Y. X. Cao, i M. Joyce-Brady, «DANCE in developing and injured lung», *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 282, núm. 1, p. L75-82, gen. 2002.
- [432] A. Guadall, M. Orriols, R. Rodríguez-Calvo, O. Calvayrac, J. Crespo, R. Aledo, J. Martínez-González, i C. Rodríguez, «Fibulin-5 is up-regulated by hypoxia in endothelial cells through a hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1 $\alpha$ )-dependent mechanism», *J. Biol. Chem.*, vol. 286, núm. 9, p. 7093-7103, març 2011.
- [433] A. D. Nguyen, S. Itoh, V. Jeney, H. Yanagisawa, M. Fujimoto, M. Ushio-Fukai, i T. Fukai, «Fibulin-5 is a novel binding protein for extracellular superoxide dismutase», *Circ. Res.*, vol. 95, núm. 11, p. 1067-1074, nov. 2004.
- [434] T. Fukai, Z. S. Galis, X. P. Meng, S. Parthasarathy, i D. G. Harrison, «Vascular expression of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis.», *J. Clin. Invest.*, vol. 101, núm. 10, p. 2101-2111, maig 1998.
- [435] M. K. Schluterman, S. L. Chapman, G. Korpany, K. Ozumi, T. Fukai, H. Yanagisawa, i R. A. Brekken, «Loss of fibulin-5 binding to beta1 integrins inhibits tumor growth by increasing the level of ROS», *Dis. Model. Mech.*, vol. 3, núm. 5-6, p. 333-342, juny 2010.
- [436] M. Wegner, «From head to toes: the multiple facets of Sox proteins», *Nucleic Acids Res.*, vol. 27, núm. 6, p. 1409-1420, març 1999.
- [437] J. Bowles, G. Schepers, i P. Koopman, «Phylogeny of the SOX Family of Developmental Transcription Factors Based on Sequence and Structural Indicators», *Dev. Biol.*, vol. 227, núm. 2, p. 239-255, nov. 2000.
- [438] Y. Kamachi i H. Kondoh, «Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation», *Development*, vol. 140, núm. 20, p. 4129-4144, oct. 2013.
- [439] S. Mertin, S. G. McDowall, i V. R. Harley, «The DNA-binding specificity of SOX9 and other SOX proteins», *Nucleic Acids Res.*, vol. 27, núm. 5, p. 1359-1364, març 1999.
- [440] Y. Kamachi, M. Uchikawa, i H. Kondoh, «Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development», *Trends Genet.*, vol. 16, núm. 4, p. 182-187, abr. 2000.



- [441] S. McDowall, A. Argentaro, S. Ranganathan, P. Weller, S. Mertin, S. Mansour, J. Tolmie, i V. Harley, «Functional and structural studies of wild type SOX9 and mutations causing campomelic dysplasia», *J. Biol. Chem.*, vol. 274, núm. 34, p. 24023-24030, ago. 1999.
- [442] S. Ferrari, V. R. Harley, A. Pontiggia, P. N. Goodfellow, R. Lovell-Badge, i M. E. Bianchi, «SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA.», *EMBO J.*, vol. 11, núm. 12, p. 4497-4506, des. 1992.
- [443] M. A. Weiss, «Floppy SOX: Mutual Induced Fit in HMG (High-Mobility Group) Box-DNA Recognition», *Mol. Endocrinol.*, vol. 15, núm. 3, p. 353-362, març 2001.
- [444] E. Wright, M. R. Hargrave, J. Christiansen, L. Cooper, J. Kun, T. Evans, U. Gangadharan, A. Greenfield, i P. Koopman, «The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos», *Nat. Genet.*, vol. 9, núm. 1, p. 15-20, gen. 1995.
- [445] L. J. Ng, S. Wheatley, G. E. Muscat, J. Conway-Campbell, J. Bowles, E. Wright, D. M. Bell, P. P. Tam, K. S. Cheah, i P. Koopman, «SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse», *Dev. Biol.*, vol. 183, núm. 1, p. 108-121, març 1997.
- [446] S. Morais da Silva, A. Hacker, V. Harley, P. Goodfellow, A. Swain, i R. Lovell-Badge, «Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds», *Nat. Genet.*, vol. 14, núm. 1, p. 62-68, set. 1996.
- [447] J. Kent, S. C. Wheatley, J. E. Andrews, A. H. Sinclair, i P. Koopman, «A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination», *Dev. Camb. Engl.*, vol. 122, núm. 9, p. 2813-2822, set. 1996.
- [448] N. A. Hanley, D. M. Hagan, M. Clement-Jones, S. G. Ball, T. Strachan, L. Salas-Cortés, K. McElreavey, S. Lindsay, S. Robson, P. Bullen, H. Ostrer, i D. I. Wilson, «SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development», *Mech. Dev.*, vol. 91, núm. 1-2, p. 403-407, març 2000.
- [449] T. Wagner, J. Wirth, J. Meyer, B. Zabel, M. Held, J. Zimmer, J. Pasantes, F. D. Bricarelli, J. Keutel, E. Hustert, U. Wolf, N. Tommerup, W. Schempp, i G. Scherer, «Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9», *Cell*, vol. 79, núm. 6, p. 1111-1120, des. 1994.
- [450] T. Aigner, P. M. Gebhard, E. Schmid, B. Bau, V. Harley, i E. Pöschl, «SOX9 expression does not correlate with type II collagen expression in adult articular chondrocytes», *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.*, vol. 22, núm. 4, p. 363-372, juny 2003.
- [451] S. Bagheri-Fam, F. Barrionuevo, U. Dohrmann, T. Günther, R. Schüle, R. Kemler, M. Mallo, B. Kanzler, i G. Scherer, «Long-range upstream and downstream enhancers control distinct subsets of the complex spatiotemporal Sox9 expression pattern», *Dev. Biol.*, vol. 291, núm. 2, p. 382-397, març 2006.
- [452] T. Furumatsu i H. Asahara, «Histone acetylation influences the activity of Sox9-related transcriptional complex», *Acta Med. Okayama*, vol. 64, núm. 6, p. 351-357, des. 2010.
- [453] S. Murakami, V. Lefebvre, i B. de Crombrughe, «Potent inhibition of the master chondrogenic factor Sox9 gene by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha», *J. Biol. Chem.*, vol. 275, núm. 5, p. 3687-3692, feb. 2000.
- [454] F. Legendre, J. Dudhia, J.-P. Pujol, i P. Bogdanowicz, «JAK/STAT but not ERK1/ERK2 pathway mediates interleukin (IL)-6/soluble IL-6R down-regulation of Type II collagen, aggrecan core, and link protein transcription in articular chondrocytes. Association with a down-regulation of SOX9 expression», *J. Biol. Chem.*, vol. 278, núm. 5, p. 2903-2912, gen. 2003.
- [455] W. Bi, J. M. Deng, Z. Zhang, R. R. Behringer, i B. de Crombrughe, «Sox9 is required for cartilage formation», *Nat. Genet.*, vol. 22, núm. 1, p. 85-89, maig 1999.
- [456] H. Akiyama, M.-C. Chaboissier, J. F. Martin, A. Schedl, i B. de Crombrughe, «The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6», *Genes Dev.*, vol. 16, núm. 21, p. 2813-2828, nov. 2002.

- [457] M.-C. Chaboissier, A. Kobayashi, V. I. P. Vidal, S. Lützkendorf, H. J. G. van de Kant, M. Wegner, D. G. de Rooij, R. R. Behringer, i A. Schedl, «Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse», *Dev. Camb. Engl.*, vol. 131, núm. 9, p. 1891-1901, maig 2004.
- [458] F. Barrionuevo, S. Bagheri-Fam, J. Klattig, R. Kist, M. M. Taketo, C. Englert, i G. Scherer, «Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice», *Biol. Reprod.*, vol. 74, núm. 1, p. 195-201, gen. 2006.
- [459] A. Jo, S. Denduluri, B. Zhang, Z. Wang, L. Yin, Z. Yan, R. Kang, L. L. Shi, J. Mok, M. J. Lee, i R. C. Haydon, «The versatile functions of Sox9 in development, stem cells, and human diseases», *Genes Dis.*, vol. 1, núm. 2, p. 149-161, des. 2014.
- [460] A.-K. T. Perl, R. Kist, Z. Shan, G. Scherer, i J. A. Whitsett, «Normal lung development and function after Sox9 inactivation in the respiratory epithelium», *Genes. N. Y. N 2000*, vol. 41, núm. 1, p. 23-32, gen. 2005.
- [461] M. Finzsch, C. C. Stolt, P. Lommes, i M. Wegner, «Sox9 and Sox10 influence survival and migration of oligodendrocyte precursors in the spinal cord by regulating PDGF receptor alpha expression», *Dev. Camb. Engl.*, vol. 135, núm. 4, p. 637-646, feb. 2008.
- [462] D. M. Bell, K. K. Leung, S. C. Wheatley, L. J. Ng, S. Zhou, K. W. Ling, M. H. Sham, P. Koopman, P. P. Tam, i K. S. Cheah, «SOX9 directly regulates the type-II collagen gene», *Nat. Genet.*, vol. 16, núm. 2, p. 174-178, juny 1997.
- [463] V. Lefebvre, W. Huang, V. R. Harley, P. N. Goodfellow, i B. de Crombrughe, «SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene», *Mol. Cell. Biol.*, vol. 17, núm. 4, p. 2336-2346, abr. 1997.
- [464] G. Zhou, V. Lefebvre, Z. Zhang, H. Eberspaecher, i B. de Crombrughe, «Three high mobility group-like sequences within a 48-base pair enhancer of the Col2a1 gene are required for cartilage-specific expression in vivo», *J. Biol. Chem.*, vol. 273, núm. 24, p. 14989-14997, juny 1998.
- [465] L. C. Bridgewater, M. D. Walker, G. C. Miller, T. A. Ellison, L. D. Holsinger, J. L. Potter, T. L. Jackson, R. K. Chen, V. L. Winkel, Z. Zhang, S. McKinney, i B. de Crombrughe, «Adjacent DNA sequences modulate Sox9 transcriptional activation at paired Sox sites in three chondrocyte-specific enhancer elements», *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, núm. 5, p. 1541-1553, març 2003.
- [466] L. C. Bridgewater, V. Lefebvre, i B. de Crombrughe, «Chondrocyte-specific enhancer elements in the Col11a2 gene resemble the Col2a1 tissue-specific enhancer», *J. Biol. Chem.*, vol. 273, núm. 24, p. 14998-15006, juny 1998.
- [467] N. A. Arango, R. Lovell-Badge, i R. R. Behringer, «Targeted mutagenesis of the endogenous mouse Mis gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development», *Cell*, vol. 99, núm. 4, p. 409-419, nov. 1999.
- [468] P. De Santa Barbara, N. Bonneaud, B. Boizet, M. Desclozeaux, B. Moniot, P. Sudbeck, G. Scherer, F. Poulat, i P. Berta, «Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene», *Mol. Cell. Biol.*, vol. 18, núm. 11, p. 6653-6665, nov. 1998.
- [469] Y. Wang i H. S. Sul, «Pref-1 regulates mesenchymal cell commitment and differentiation through Sox9», *Cell Metab.*, vol. 9, núm. 3, p. 287-302, març 2009.
- [470] J. Pritchett, V. Athwal, N. Roberts, N. A. Hanley, i K. P. Hanley, «Understanding the role of SOX9 in acquired diseases: lessons from development», *Trends Mol. Med.*, vol. 17, núm. 3, p. 166-174, març 2011.
- [471] C. Dong, D. Wilhelm, i P. Koopman, «Sox genes and cancer», *Cytogenet. Genome Res.*, vol. 105, núm. 2-4, p. 442-447, 2004.
- [472] A. Briot, A. Jaroszewicz, C. M. Warren, J. Lu, M. Touma, C. Rudat, J. J. Hofmann, R. Airik, G. Weinmaster, K. Lyons, Y. Wang, A. Kispert, M. Pellegrini, i M. L. Iruela-Arispe, «Repression of sox9 by jag1 is continuously required to suppress the default

- chondrogenic fate of vascular smooth muscle cells», *Dev. Cell*, vol. 31, núm. 6, p. 707-721, des. 2014.
- [473] Z. Xu, G. Ji, J. Shen, X. Wang, J. Zhou, i L. Li, «SOX9 and myocardin counteract each other in regulating vascular smooth muscle cell differentiation», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 422, núm. 2, p. 285-290, juny 2012.
- [474] J. Shen, M. Yang, H. Jiang, D. Ju, J.-P. Zheng, Z. Xu, T.-D. Liao, i L. Li, «Arterial injury promotes medial chondrogenesis in Sm22 knockout mice», *Cardiovasc. Res.*, vol. 90, núm. 1, p. 28-37, abr. 2011.
- [475] J. R. Pearlstone, M. Weber, J. P. Lees-Miller, M. R. Carpenter, i L. B. Smillie, «Amino acid sequence of chicken gizzard smooth muscle SM22 alpha», *J. Biol. Chem.*, vol. 262, núm. 13, p. 5985-5991, maig 1987.
- [476] J. P. Lees-Miller, D. H. Heeley, L. B. Smillie, i C. M. Kay, «Isolation and characterization of an abundant and novel 22-kDa protein (SM22) from chicken gizzard smooth muscle.», *J. Biol. Chem.*, vol. 262, núm. 7, p. 2988-2993, maig 1987.
- [477] C. M. Moran, A. J. W. Thomson, E. Rog-Zielinska, i G. A. Gray, «High-resolution echocardiography in the assessment of cardiac physiology and disease in preclinical models», *Exp. Physiol.*, vol. 98, núm. 3, p. 629-644, gen. 2013.
- [478] S. Gao, D. Ho, D. E. Vatner, i S. F. Vatner, «Echocardiography in Mice», *Curr. Protoc. Mouse Biol.*, vol. 1, p. 71-83, març 2011.
- [479] R. Rodríguez-Calvo, A. Guadall, O. Calvayrac, M. A. Navarro, J. Alonso, B. Ferrán, A. de Diego, P. Muniesa, J. Osada, C. Rodríguez, i J. Martínez-González, «Over-expression of neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) exacerbates neointimal hyperplasia after vascular injury», *Hum. Mol. Genet.*, vol. 22, núm. 10, p. 1949-1959, maig 2013.
- [480] J. Martínez-González, M. Viñals, F. Vidal, V. Llorente-Cortés, i L. Badimon, «Mevalonate deprivation impairs IGF-I/insulin signaling in human vascular smooth muscle cells», *Atherosclerosis*, vol. 135, núm. 2, p. 213-223, des. 1997.
- [481] Hanahan D., «Techniques for transformation of *E. coli*. in DNA cloning: a practical approach.», *Press Oxf.*, núm. 1, p. 109-135, 1985.
- [482] P. Chomczynski i N. Sacchi, «Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction», *Anal. Biochem.*, vol. 162, núm. 1, p. 156-159, abr. 1987.
- [483] M. González-Díez, C. Rodríguez, L. Badimon, i J. Martínez-González, «Prostacyclin induction by high-density lipoprotein (HDL) in vascular smooth muscle cells depends on sphingosine 1-phosphate receptors: effect of simvastatin», *Thromb. Haemost.*, vol. 100, núm. 1, p. 119-126, jul. 2008.
- [484] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, i D. C. Klenk, «Measurement of protein using bicinchoninic acid», *Anal. Biochem.*, vol. 150, núm. 1, p. 76-85, oct. 1985.
- [485] R. Martínez-Pinna, J. Madrigal-Matute, C. Tarin, E. Burillo, M. Esteban-Salan, C. Pastor-Vargas, J. S. Lindholt, J. A. Lopez, E. Calvo, M. V. de Ceniga, O. Meilhac, J. Egido, L. M. Blanco-Colio, J.-B. Michel, i J. L. Martín-Ventura, «Proteomic Analysis of Intraluminal Thrombus Highlights Complement Activation in Human Abdominal Aortic Aneurysms», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 33, núm. 8, p. 2013-2020, gen. 2013.
- [486] D. J. Prockop i S. Udenfriend, «A specific method for the analysis of hydroxyproline in tissues and urine», *Anal. Biochem.*, vol. 1, p. 228-239, nov. 1960.
- [487] L. C. Junqueira, G. Bignolas, i R. R. Brentani, «Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections», *Histochem. J.*, vol. 11, núm. 4, p. 447-455, jul. 1979.
- [488] N. Agra, F. Cidre, L. García-García, J. de la Parra, i J. Alonso, «Lysyl Oxidase Is Downregulated by the EWS/FLI1 Oncoprotein and Its Propeptide Domain Displays Tumor Suppressor Activities in Ewing Sarcoma Cells», *PLoS ONE*, vol. 8, núm. 6, p. e66281, juny 2013.

- [489] A. Kumar i V. Lindner, «Remodeling With Neointima Formation in the Mouse Carotid Artery After Cessation of Blood Flow», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 17, núm. 10, p. 2238-2244, gen. 1997.
- [490] S. B. Furgeson, P. A. Simpson, I. Park, V. VanPutten, H. Horita, C. D. Kontos, R. A. Nemenoff, i M. C. M. Weiser-Evans, «Inactivation of the tumour suppressor, PTEN, in smooth muscle promotes a pro-inflammatory phenotype and enhances neointima formation», *Cardiovasc. Res.*, p. cvp425, gen. 2010.
- [491] D. Godin, E. Ivan, C. Johnson, R. Magid, i Z. S. Galis, «Remodeling of Carotid Artery Is Associated With Increased Expression of Matrix Metalloproteinases in Mouse Blood Flow Cessation Model», *Circulation*, vol. 102, núm. 23, p. 2861-2866, maig 2000.
- [492] K. J. Harmon, L. L. Couper, i V. Lindner, «Strain-dependent vascular remodeling phenotypes in inbred mice», *Am. J. Pathol.*, vol. 156, núm. 5, p. 1741-1748, maig 2000.
- [493] Y. Kojima, R. K. Kundu, C. M. Cox, N. J. Leeper, J. A. Anderson, H. J. Chun, Z. A. Ali, E. A. Ashley, P. A. Krieg, i T. Quertermous, «Upregulation of the apelin-APJ pathway promotes neointima formation in the carotid ligation model in mouse», *Cardiovasc. Res.*, vol. 87, núm. 1, p. 156-165, jul. 2010.
- [494] M. Kuzuya, S. Kanda, T. Sasaki, N. Tamaya-Mori, X. W. Cheng, T. Itoh, S. Itohara, i A. Iguchi, «Deficiency of gelatinase a suppresses smooth muscle cell invasion and development of experimental intimal hyperplasia», *Circulation*, vol. 108, núm. 11, p. 1375-1381, set. 2003.
- [495] J. R. Sindermann, J. Smith, C. Köbbert, G. Plenz, A. Skaletz-Rorowski, J. L. Solomon, L. Fan, i K. L. March, «Direct evidence for the importance of p130 in injury response and arterial remodeling following carotid artery ligation», *Cardiovasc. Res.*, vol. 54, núm. 3, p. 676-683, gen. 2002.
- [496] Y. Mukai, Y. Rikitake, I. Shiojima, S. Wolfrum, M. Satoh, K. Takeshita, Y. Hiroi, S. Salomone, H.-H. Kim, L. E. Benjamin, K. Walsh, i J. K. Liao, «Decreased vascular lesion formation in mice with inducible endothelial-specific expression of protein kinase Akt», *J. Clin. Invest.*, vol. 116, núm. 2, p. 334-343, feb. 2006.
- [497] P. C. Y. Tang, L. Qin, J. Zielonka, J. Zhou, C. Matte-Martone, S. Bergaya, N. van Rooijen, W. D. Shlomchik, W. Min, W. C. Sessa, J. S. Pober, i G. Tellides, «MyD88-dependent, superoxide-initiated inflammation is necessary for flow-mediated inward remodeling of conduit arteries», *J. Exp. Med.*, vol. 205, núm. 13, p. 3159-3171, des. 2008.
- [498] P.-P. Kuang, M. Joyce-Brady, X.-H. Zhang, J.-C. Jean, i R. H. Goldstein, «Fibulin-5 gene expression in human lung fibroblasts is regulated by TGF-beta and phosphatidylinositol 3-kinase activity», *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 291, núm. 6, p. C1412-1421, des. 2006.
- [499] A.-M. Baker, D. Bird, J. C. Welti, M. Gourlaouen, G. Lang, G. I. Murray, A. R. Reynolds, T. R. Cox, i J. T. Erler, «Lysyl oxidase plays a critical role in endothelial cell stimulation to drive tumor angiogenesis», *Cancer Res.*, vol. 73, núm. 2, p. 583-594, gen. 2013.
- [500] L. Li, J. M. Miano, B. Mercer, i E. N. Olson, «Expression of the SM22alpha promoter in transgenic mice provides evidence for distinct transcriptional regulatory programs in vascular and visceral smooth muscle cells», *J. Cell Biol.*, vol. 132, núm. 5, p. 849-859, març 1996.
- [501] M. Strobeck, S. Kim, J. C. L. Zhang, C. Clendenin, K. L. Du, i M. S. Parmacek, «Binding of Serum Response Factor to CArG Box Sequences Is Necessary but Not Sufficient to Restrict Gene Expression to Arterial Smooth Muscle Cells», *J. Biol. Chem.*, vol. 276, núm. 19, p. 16418-16424, nov. 2001.
- [502] R. Kakkar, B. Ye, D. A. Stoller, M. Smelley, N.-Q. Shi, K. Galles, M. Hadhazy, J. C. Makielski, i E. M. McNally, «Spontaneous coronary vasospasm in KATP mutant mice arises from a smooth muscle-extrinsic process», *Circ. Res.*, vol. 98, núm. 5, p. 682-689, març 2006.
- [503] G. K. Owens, M. S. Kumar, i B. R. Wamhoff, «Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease», *Physiol. Rev.*, vol. 84, núm. 3, p. 767-801, jul. 2004.

- [504] C. Rodríguez, J. Martínez-González, B. Raposo, J. F. Alcludia, A. Guadall, i L. Badimon, «Regulation of lysyl oxidase in vascular cells: lysyl oxidase as a new player in cardiovascular diseases», *Cardiovasc. Res.*, vol. 79, núm. 1, p. 7-13, jul. 2008.
- [505] D. Kothapalli, S.-L. Liu, Y. H. Bae, J. Monslow, T. Xu, E. A. Hawthorne, F. J. Byfield, P. Castagnino, S. Rao, D. J. Rader, E. Puré, M. C. Phillips, S. Lund-Katz, P. A. Janmey, i R. K. Assoian, «Cardiovascular protection by ApoE and ApoE-HDL linked to suppression of ECM gene expression and arterial stiffening», *Cell Rep.*, vol. 2, núm. 5, p. 1259-1271, nov. 2012.
- [506] G. Spinetti, M. Wang, R. Monticone, J. Zhang, D. Zhao, i E. G. Lakatta, «Rat aortic MCP-1 and its receptor CCR2 increase with age and alter vascular smooth muscle cell function», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 24, núm. 8, p. 1397-1402, ago. 2004.
- [507] C. Viedt, J. Vogel, T. Athanasiou, W. Shen, S. R. Orth, W. Kübler, i J. Kreuzer, «Monocyte chemoattractant protein-1 induces proliferation and interleukin-6 production in human smooth muscle cells by differential activation of nuclear factor-kappaB and activator protein-1», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 22, núm. 6, p. 914-920, juny 2002.
- [508] J. C. Isenburg, D. T. Simionescu, B. C. Starcher, i N. R. Vyavahare, «Elastin stabilization for treatment of abdominal aortic aneurysms», *Circulation*, vol. 115, núm. 13, p. 1729-1737, abr. 2007.
- [509] C.-A. Brandsma, M. van den Berge, D. S. Postma, M. R. Jonker, S. Brouwer, P. D. Paré, D. D. Sin, Y. Bossé, M. Laviolette, J. Karjalainen, R. S. N. Fehrmann, D. C. Nickle, K. Hao, A. I. R. Spanjer, W. Timens, i L. Franke, «A large lung gene expression study identifying fibulin-5 as a novel player in tissue repair in COPD», *Thorax*, vol. 70, núm. 1, p. 21-32, gen. 2015.
- [510] A. J. Lotery, D. Baas, C. Ridley, R. P. O. Jones, C. C. W. Klaver, E. Stone, T. Nakamura, A. Luff, H. Griffiths, T. Wang, A. A. B. Bergen, i D. Trump, «Reduced secretion of fibulin 5 in age-related macular degeneration and cutis laxa», *Hum. Mutat.*, vol. 27, núm. 6, p. 568-574, juny 2006.
- [511] G. M. Lenk, G. Tromp, S. Weinsheimer, Z. Gatalica, R. Berguer, i H. Kuivaniemi, «Whole genome expression profiling reveals a significant role for immune function in human abdominal aortic aneurysms», *BMC Genomics*, vol. 8, núm. 1, p. 237, jul. 2007.
- [512] A. Didangelos, X. Yin, K. Mandal, A. Saje, A. Smith, Q. Xu, M. Jahangiri, i M. Mayr, «Extracellular matrix composition and remodeling in human abdominal aortic aneurysms: a proteomics approach», *Mol. Cell. Proteomics MCP*, vol. 10, núm. 8, p. M111.008128, ago. 2011.
- [513] F. Vivanco, J. L. Martín-Ventura, M. C. Duran, M. G. Barderas, L. Blanco-Colio, V. M. Dardé, S. Mas, O. Meilhac, J. B. Michel, J. Tuñón, i J. Egido, «Quest for Novel Cardiovascular Biomarkers by Proteomic Analysis†», *J. Proteome Res.*, vol. 4, núm. 4, p. 1181-1191, ago. 2005.
- [514] X. Wang, S. A. LeMaire, L. Chen, S. A. Carter, Y. H. Shen, Y. Gan, H. Bartsch, J. A. Wilks, B. Utama, H. Ou, R. W. Thompson, J. S. Coselli, i X. L. Wang, «Decreased expression of fibulin-5 correlates with reduced elastin in thoracic aortic dissection», *Surgery*, vol. 138, núm. 2, p. 352-359, ago. 2005.
- [515] P.-L. Kuo, K.-H. Shen, S.-H. Hung, i Y.-L. Hsu, «CXCL1/GRO $\alpha$  increases cell migration and invasion of prostate cancer by decreasing fibulin-1 expression through NF- $\kappa$ B/HDAC1 epigenetic regulation», *Carcinogenesis*, vol. 33, núm. 12, p. 2477-2487, des. 2012.
- [516] G. S. Thangjam, C. Dimitropoulou, A. D. Joshi, N. Barabutis, M. C. Shaw, Y. Kovalenkov, C. M. Wallace, D. J. Fulton, V. Patel, i J. D. Catravas, «Novel mechanism of attenuation of LPS-induced NF- $\kappa$ B activation by the heat shock protein 90 inhibitor, 17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin, in human lung microvascular endothelial cells», *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 50, núm. 5, p. 942-952, maig 2014.
- [517] M. Stempel, M. Kedinger, L. Augenlicht, i L. Klampfer, «Essential role of the JAK/STAT1 signaling pathway in the expression of inducible nitric-oxide synthase in intestinal epithelial cells and its regulation by butyrate», *J. Biol. Chem.*, vol. 282, núm. 13, p. 9797-9804, març 2007.

- [518] B. M. Turner, «Decoding the nucleosome», *Cell*, vol. 75, núm. 1, p. 5-8, oct. 1993.
- [519] M. García-Ramírez, J. Martínez-González, J. O. Juan-Babot, C. Rodríguez, i L. Badimon, «Transcription factor SOX18 is expressed in human coronary atherosclerotic lesions and regulates DNA synthesis and vascular cell growth», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 25, núm. 11, p. 2398-2403, nov. 2005.
- [520] H. Akiyama, J.-E. Kim, K. Nakashima, G. Balmes, N. Iwai, J. M. Deng, Z. Zhang, J. F. Martin, R. R. Behringer, T. Nakamura, i B. de Crombrughe, «Osteo-chondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, núm. 41, p. 14665-14670, oct. 2005.
- [521] S. D. Castillo i M. Sanchez-Cespedes, «The SOX family of genes in cancer development: biological relevance and opportunities for therapy», *Expert Opin. Ther. Targets*, vol. 16, núm. 9, p. 903-919, set. 2012.
- [522] C. Oh, S. N. Maity, J.-F. Lu, J. Zhang, S. Liang, F. Coustry, B. de Crombrughe, i H. Yasuda, «Identification of SOX9 interaction sites in the genome of chondrocytes», *PLoS One*, vol. 5, núm. 4, p. e10113, 2010.
- [523] J. Lincoln, R. Kist, G. Scherer, i K. E. Yutzey, «Sox9 is required for precursor cell expansion and extracellular matrix organization during mouse heart valve development», *Dev. Biol.*, vol. 305, núm. 1, p. 120-132, maig 2007.
- [524] L. Wang, S. He, J. Yuan, X. Mao, Y. Cao, J. Zong, Y. Tu, i Y. Zhang, «Oncogenic role of SOX9 expression in human malignant glioma», *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.*, vol. 29, núm. 5, p. 3484-3490, des. 2012.
- [525] S. Piera-Velazquez, D. F. Hawkins, M. K. Whitecavage, D. C. Colter, D. G. Stokes, i S. A. Jimenez, «Regulation of the human SOX9 promoter by Sp1 and CREB», *Exp. Cell Res.*, vol. 313, núm. 6, p. 1069-1079, abr. 2007.
- [526] K. P. Hanley, F. Oakley, S. Sugden, D. I. Wilson, D. A. Mann, i N. A. Hanley, «Ectopic SOX9 mediates extracellular matrix deposition characteristic of organ fibrosis», *J. Biol. Chem.*, vol. 283, núm. 20, p. 14063-14071, maig 2008.
- [527] S. Liu, H. Cheng, W. Kwan, J. M. Lubieniecka, i T. O. Nielsen, «Histone deacetylase inhibitors induce growth arrest, apoptosis, and differentiation in clear cell sarcoma models», *Mol. Cancer Ther.*, vol. 7, núm. 6, p. 1751-1761, juny 2008.
- [528] G. Castelo-Branco, T. Lilja, K. Wallenborg, A. M. Falcão, S. C. Marques, A. Gracias, D. Solum, R. Paap, J. Walfridsson, A. I. Teixeira, M. G. Rosenfeld, K. Jepsen, i O. Hermanson, «Neural stem cell differentiation is dictated by distinct actions of nuclear receptor corepressors and histone deacetylases», *Stem Cell Rep.*, vol. 3, núm. 3, p. 502-515, set. 2014.
- [529] J.-P. Wang, M.-H. Wen, Y.-T. Chen, H.-H. Lee, E.-R. Chiang, Y.-T. Lee, C.-L. Liu, T.-H. Chen, i S.-C. Hung, «Trichostatin A inhibits TGF- $\beta$ 1 induced in vitro chondrogenesis of hMSCs through Sp1 suppression», *Differ. Res. Biol. Divers.*, vol. 81, núm. 2, p. 119-126, feb. 2011.
- [530] K. Amano, K. Hata, S. Muramatsu, M. Wakabayashi, Y. Takigawa, K. Ono, M. Nakanishi, R. Takashima, M. Kogo, A. Matsuda, R. Nishimura, i T. Yoneda, «Arid5a cooperates with Sox9 to stimulate chondrocyte-specific transcription», *Mol. Biol. Cell*, vol. 22, núm. 8, p. 1300-1311, abr. 2011.
- [531] T. Furumatsu, M. Tsuda, K. Yoshida, N. Taniguchi, T. Ito, M. Hashimoto, T. Ito, i H. Asahara, «Sox9 and p300 cooperatively regulate chromatin-mediated transcription», *J. Biol. Chem.*, vol. 280, núm. 42, p. 35203-35208, oct. 2005.



# APÈNDIX 1

Medis, solucions i reactius





## Medis de cultiu

**CMLVm****DMEM-F12** (Gibco BRL)**FBS** (Biological Industries) 10%**Penicil·lina** (Gibco BRL) 100 U/ml**Estreptomicina** (Gibco BRL) 0,1 mg/ml**CMLV humanes****M199** (Gibco BRL)**FBS** (Biological Industries) 20%**Sèrum humà** 2%**L-Glutamina** (Gibco BRL) 2 mM**Penicil·lina** (Gibco BRL) 100 U/ml**Estreptomicina** (Gibco BRL) 0,1 mg/ml**HeLa i HEK 293T****DMEM** (Gibco BRL)**FBS** (Biological Industries) 10%**L-Glutamina** (Gibco BRL) 2 mM**Penicil·lina** (Gibco BRL) 100 U/ml**Estreptomicina** (Gibco BRL) 0,1 mg/ml

## Inhibidors

agent	efecte	concentració
<b>Actinomicina-D</b>	Inhibidor de la transcripció	2 $\mu$ M
<b>Parthenolide</b>	Inhibidor de la via de senyalització del NF- $\kappa$ B	1 $\mu$ M
<b>NDGA</b>	Inhibidor de la via de senyalització d'AP-1	1 $\mu$ g/ml
<b>Trisostatina-A</b>	Inhibidor de les HDACs de classe I i II	1 $\mu$ M
<b>MS-275</b>	Inhibidor de les HDACs de classe I	2 $\mu$ M

## Preparació de bacteris competents

<b>Solució RF1 (pH 5,8)</b>		<b>Solució RF2</b>	
<b>KCl</b>	100 mM	<b>MOPS</b>	10 mM
<b>MnCl<sub>2</sub></b>	50 mM	<b>KCl</b>	10 mM
<b>KA</b>	30 mM	<b>CaCl<sub>2</sub></b>	75 mM
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	10 mM	<b>Glicerol</b>	15%
<b>Glicerol</b>	15%		

## Tampons de lisi

<b>TAMPÓ DE LISI PER A EXTRACTES PROTEICS CEL·LULARS</b>	
<b>Tris-HCl (pH 7,4)</b>	10 mM
<b>SDS</b>	1%
<b>Ortovanadat</b>	1 mM

<b>TAMPÓ DE LISI PER A EXTRACTES PROTEICS DE TEIXITS</b>	
<b>EGTA</b>	0,5 mM
<b>NaCl</b>	100 mM
<b>Glicerol-2-fosfat</b>	100 mM
<b>HEPES</b>	50 mM
<b>Glicerol</b>	10%
<b>TWEEN 20</b>	0,1%
<b>Inhibidor de proteases (Roche)</b>	1x
<b>DTT</b>	1 mM

ChIP

LB1 (lisi de membrana cel·lular):		LB2 (eliminació de detergents):		LB3 (ruptura de nuclis):	
Hepes-KOH pH 7,5	50 mM	Tris-HCl pH 8,0	10 mM	Tris-HCl pH 8,0	10 mM
NaCl	140 mM	NaCl	200 mM	NaCl	100 mM
EDTA	1 mM	EDTA	1 mM	EDTA	1 mM
Glicerol	10%	EGTA	0,5 mM	ETA	0,5 mM
NP40	1%	CIP	1%	Na-Deoxcholate	0.1%
Tritó X-100	0.3%			N-lauroylsarcosine	0.5%
CIP	1%			CIP	1%

Tampó de dilució	
Tris-HCl	16.7 mM
NaCl	167 mM
EDTA	1.2 mM
Tritó X-100	1%
SDS	0.01%
CIP	1%

1- Tampó de rentat baix en sals		2- Tampó de rentat concentrat en sals	
SDS	0.1%	SDS	0.1%
Tritó X-100	1%	Tritó X-100	1%
EDTA	2 mM	EDTA	2 mM
Tris-HCl pH 8,0	20 mM	Tris-HCl pH 8,0	20 mM
NaCl	150 mM	NaCl	500 mM

3- Tampó de rentat LiCl		4- Tampó TE	
LiCl	0.5 M	Tris-HCl pH 8,0	10 mM
NP40	1%	EDTA	1 mM
Deoxycholate	1%		
EDTA	1 mM		
Tris-HCl pH 8,0	20 mM		

## Immunohistoquímica

Solució de Vermell siri	
Vermell Siri F3B	0,5 g
Solució aquosa saturada en àcid pícrid	500 ml

Aigua d'àcid acètic	
Àcid acètic glacial	5 ml
Aigua destilada	11 ml

## Anticossos

ANTICOSSOS dirigits contra	referència	casa	usos
<b>Akt</b>	9272	Cell Signaling	WB
<b>Akt fosforilada</b>	9271	Cell Signaling	WB
<b>ERK1/2</b>	9102	Cell Signaling	WB
<b>ERK1/2 fosforilat</b>	9106	Cell Signaling	WB
<b>P38</b>	sc7149	Santa Cruz	WB
<b>P38 fosforilada</b>	9216	Cell Signaling	WB
<b>LOX</b>	ab31238	Abcam	WB, IC
<b>LOX</b>	2527	Novus	CF
<b>MCP1</b>	sc-1785	Santa Cruz	IHC
<b>FBLN5</b>	ab66339	Abcam	WB, IHC
<b>FBLN5</b>	ab36611	Abcam	IC
<b>PCNA</b>	FL-261	Santa Cruz	WB, IC, IHC
<b>MYH10</b>	ab684	Abcam	WB, IC
<b>SOX9</b>	ab3697	Abcam	WB, ChIP
<b>SOX9</b>	sc-20095	Santa Cruz	IHC
<b>Histona H3 K18ac</b>	ab1191	Abcam	WB, ChIP
<b>β-actina</b>	Ab8226	Abcam	WB
<b>GAPDH</b>	MAB374	EMD-Millipore	WB

WB, *Western blot*; IC, immunocitoquímica; IHC, immunohistoquímica; CF, *Citometria de flux*.

## siRNA

**siRNAs utilitzats per al silenciament gènic:**

siRANDOM	ID#AM4611; Ambion
siHDAC1	ID#573; Ambion
siHDAC2	ID#s6493; Ambion
siHDAC3	ID#s16878; Ambion

## Anàlisi per PCR en temps real

**Sondes Taqman<sup>TM</sup> específiques Assay-on-Demand<sup>TM</sup> (Applied Biosystems)**

ARNr 18S		4319413E
BMP-1	humà	Hs00241807_m1
$\beta$ -actina	humà	Hs99999903_m1
CCL20	humà	Hs00171125_m1
COL-1 $\alpha$	humà	Hs00164004_m1
FBLN5	humà	Hs00197064_m1
FBLN5	ratolí	Mm004488601_m1
GAPDH	humà	4326317E
HDAC1	humà	Hs2621185_m1
HDAC2	humà	Hs00231032_m1
HDAC3	humà	Hs00187320_m1
IL1 $\beta$	ratolí	Mm00434328_m1
IL6	ratolí	Mm00446191_m1
IL8	ratolí	Mm00436450_m1
LOX	humà	Hs00184700_m1
LOX	rata	Rn01491829_m1
LOX	ratolí	Mm00495386_m1
LOXL1	humà	Hs00173746_m1
LOXL2	humà	Hs00158757_m1
LOXL2	ratolí	Mm00804740_m1
LOXL3	humà	Hs00261671_m1
LOXL4	humà	Hs00260059_m1
MCP1		Mm00441242_m1
MMP-2	humà	Hs00234422_m1
MMP-9	humà	Hs00234579_m1
MMP-10	humà	Hs00233987_m1
SOX9	humà	Hs00165814_m1
SOX9	ratolí	Mm00448840_m1
TBP	humà	Hs99999910_m1
TBP	ratolí	Mm00446973_m1

**Anàlisi per PCR en temps real amb SYBR-Green**

FBLN5 sentit	5'-TTGGTGAGCGCTGTAATCT-3'
FBLN5 antisentit	5'-AGAGGGCTAAGCAAACCA-3'



# APÈNDIX 2

Publicacions





# Lysyl oxidase (LOX) in vascular remodelling

## Insight from a new animal model

Mar Orriols<sup>1†</sup>; Anna Guadall<sup>1†</sup>; María Galán<sup>1</sup>; Ingrid Martí-Pàmies<sup>1</sup>; Saray Varona<sup>1</sup>; Ricardo Rodríguez-Calvo<sup>1</sup>; Ana María Briones<sup>2</sup>; María A. Navarro<sup>3</sup>; Alicia de Diego<sup>4</sup>; Jesús Osada<sup>3</sup>; José Martínez-González<sup>1‡</sup>; Cristina Rodríguez<sup>1‡</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación Cardiovascular, CSIC-ICCC. Instituto de Investigación Biomédica Sant Pau (IIB Sant Pau), Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ), Madrid, Spain; <sup>3</sup>Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, CIBEROBN, Zaragoza, Spain; <sup>4</sup>Unidad de Transgénesis, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Zaragoza, Spain

### Summary

Lysyl oxidase (LOX) is an extracellular matrix-modifying enzyme that seems to play a critical role in vascular remodelling. However, the lack of viable LOX-deficient animal models has been an obstacle to deep in LOX biology. In this study we have developed a transgenic mouse model that over-expresses LOX in vascular smooth muscle cells (VSMC) to clarify whether LOX could regulate VSMC phenotype and vascular remodelling. The SM22 $\alpha$  proximal promoter drove the expression of a transgene containing the human LOX cDNA. Two stable transgenic lines, phenotypically indistinguishable, were generated by conventional methods (TgLOX). Transgene expression followed the expected SMC-specific pattern. In TgLOX mice, real-time PCR and immunohistochemistry evidenced a strong expression of LOX in the media from aorta and carotid arteries, coincident with a higher proportion of mature collagen. VSMC isolated from TgLOX mice expressed high lev-

els of LOX pro-enzyme, which was properly secreted and processed into mature and bioactive LOX. Interestingly, cell proliferation was significantly reduced in cells from TgLOX mice. Transgenic VSMC also exhibited low levels of Myh10 (marker of SMC phenotypic switching), PCNA (marker of cell proliferation) and MCP-1, and a weak activation of Akt and ERK1/2 in response to mitogenic stimuli. Accordingly, neointimal thickening induced by carotid artery ligation was attenuated in TgLOX mice that also displayed a reduction in PCNA and MCP-1 immunostaining. Our results give evidence that LOX plays a critical role in vascular remodelling. We have developed a new animal model to study the role of LOX in vascular biology.

### Keywords

Vascular remodelling, smooth muscle cells, cell proliferation, extracellular matrix

### Correspondence to:

José Martínez-González or Cristina Rodríguez  
Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC)  
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (pabellón N° 31)  
Avda. Sant Antoni Maria Claret 167  
08025 Barcelona, Spain  
Tel.: +34 93 5565897, Fax: +34 93 5565559  
E-mail: cdrodriguez@csic-iccc.org; jmartinez@csic-iccc.org

### Financial support:

This work was supported by Sociedad Española de Cardiología (Proyecto SEC para Investigación Básica 2012) and the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO)-Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) [grants PI12/01952, SAF2012-40127, RD12/0042/0053 and RD12/0042/0024]. AG and MG were supported by funds provided by Instituto de Salud Carlos III-Fondo de Investigaciones Sanitarias (PFIS and Sara Borrell programs respectively) and AMB is supported through the Ramón y Cajal program (RYC-2010-06473).

† The first two authors contributed equally to this work.  
‡ The last two authors contributed equally to this work.

Received: January 10, 2014

Accepted after major revision: May 6, 2014

Epub ahead of print: July 3, 2014

<http://dx.doi.org/10.1160/TH14-01-0024>

Thromb Haemost 2014; 112: ■■■

## Introduction

Vascular remodelling is critical in the pathogenesis of cardiovascular diseases such as atherosclerosis, coronary restenosis or bypass-graft failure. In response to injury, vascular remodelling encompasses an orchestrated reorganization of extracellular matrix (ECM) that fosters a migratory and proliferative activity of vascular smooth muscle cells (VSMC) (1-3). In fact, mechanical and biochemical ECM abnormalities strongly influence VSMC behaviour and phenotype (4).

One of the key stages in the synthesis and processing of ECM is catalysed by lysyl oxidase (LOX). LOX is a copper-dependent amine oxidase that catalyses the covalent cross-link of collagens

and elastin fibres (5). This enzyme oxidises lysine and hydroxylysine residues, leading to the synthesis of highly reactive peptidyl semialdehydes that spontaneously condense to form the intra- and intermolecular covalent cross-linkages responsible for ECM stability. LOX is synthesised and secreted as a pro-enzyme that is proteolytically processed into the extracellular space, yielding the mature and active form and a pro-peptide (LOX-PP) (5). LOX de-regulation induces connective tissue abnormalities related with pathological processes including cardiovascular diseases (6). In the vascular wall LOX is expressed by endothelial cells, VSMC and fibroblasts being difficult to establish the relative contribution of each cell type to vascular LOX activity (6). In our previous studies we have shown that LOX inhibition underlies endothelial dysfunction

tion triggered by atherosclerotic risk factors and proinflammatory cytokines, suggesting the involvement of LOX in the pathophysiology of atherosclerosis (7-10).

Beyond the contribution of LOX in the maintenance of the tensile and elastic features of connective tissues, recent reports have uncovered novel biological functions of this enzyme such as the control of gene expression and epithelial-to-mesenchymal transition, as well as cell proliferation, migration, adhesion and transformation (11-13). However, previous studies analysing the involvement of LOX in injury-induced vascular remodelling have yielded inconclusive results (14, 15). While early studies showed that LOX inhibition did not affect luminal narrowing in rabbits subjected to conventional balloon angioplasty (14), subsequently it was shown that this strategy limited restenosis in the same animal model (15). Thus, the role of LOX in the control of VSMC function and its contribution to neointimal thickening remains unclear, and the absence of viable genetically-modified LOX animals has hampered this objective (16, 17). In this study we describe the generation and characterization of a new transgenic mouse model that over-expresses human LOX specifically in SMC, aiming to clarify whether LOX could regulate VSMC plasticity and participate in vascular remodelling induced by carotid artery ligation.

## Materials and methods

### Animal handling

Animals were bred in the Animal Experimentation Unit of the Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC, Barcelona, Spain) and housed in a controlled, specific pathogen-free environment. All animal handling procedures were performed in compliance with the principles and guidelines established by the American Physiological Society for animal research, and all procedures were reviewed and approved by the Ethical Committee at the Centro de Investigación Cardiovascular as stated in Law 5/1995, 21 June, passed by the Generalitat de Catalunya. Animals were taken care of and used according to the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which meets the European Union Directive 2010/63/UE on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

### Plasmid construction and generation of transgenic mice

The pCAGGS-SM/hLOX was generated by cloning a full-length human LOX (hLOX) cDNA into the mammalian vector pCAGGS under the control of an SMC-specific promoter. The plasmid pCAGGS-SM containing the SM22 $\alpha$  proximal promoter was previously described (18). The hLOX full-length cDNA insert (GeneBank Accession N<sup>o</sup> S78694; positions 1-1757) corresponding to the clone HLO20 (kindly provided by Dr. Mäki; Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, University of Oulu, Finland) was released from pBluescript by *EcoRI* digestion and cloned into the *EcoRI* site of pCAGGS-SM (see Suppl. Figure 1, available online at [www.thrombosis-online.com](http://www.thrombosis-online.com)). The entire insert

and the flanking regions of the generated pCAGGS-SM/hLOX construct were verified by sequence analysis. This construct was used to achieve smooth muscle-specific expression of hLOX, as verified by transfection in rat VSMC and subsequent analysis of LOX expression by Western-blot and real-time PCR.

The expression cassette (2956 bp) was isolated by digestion with *Sall* and *HindIII* and purified using the QIAquick<sup>TM</sup> Gel Extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany). The transgene underwent pronuclear injection of zygotes in the Transgenesis Unit of the Aragon Health Science Institute under the Project Licenses PI29/08 and PI30/08 approved by the in-house Ethics Committee for Animal Experiments from the University of Zaragoza as previously reported (18, 19). Offspring were screened by PCR analysis of genomic DNA prepared from mouse tail biopsies using the DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue kit (Qiagen). PCR reaction was performed using specific primers that amplify a 360 bp fragment (upper primer 5'-GACAGACTGCTCCAACCTGG-3' and lower primer 5'-AGCACGGGTATCTCAGTCTCC-3'). PCR products were resolved by electrophoresis on a 1% agarose gel containing ethidium bromide, and were visualised under UV light. Images were captured using the BIO-RAD Gel Doc 1000 Multi-Analyst 1.1 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Stable transgenic mouse lines were established by backcrossing the transgene-carrying founders with C57BL/6J mice up to the tenth generation to guarantee the 99.9% of purity in this genetic background. Systolic blood pressure (SBP), body weight and echocardiographic data were determined in four-month-old mice. SBP was measured in conscious mice using the LE5001 tail-cuff blood pressure system (Harvard Apparatus). Mice were trained for tail cuff measurements over a period of one week. Arterial blood pressure measurements were performed at the same time (between 9 a.m. and 11 a.m.) in order to avoid the influence of the circadian cycle. The value of SBP was obtained on three consecutive days and was derived from an average of 10 measurements per animal each day. For basic measurement of cardiac function by Doppler echocardiography, transgenic mice and their wild-type littermates were anaesthetised by isoflurane inhalation and placed on a heating pad (37°C). Transthoracic echocardiography was performed using a Vevo 2100 system (VisualSonics, Toronto, ON, USA) with a 30 MHz transducer applied to the chest wall. All primary measurements were made from images captured on cine loops of 300 frames at the time of the study by use of the Vevo 2100 analysis software. Measurements of interventricular septal thickness (IVS), left ventricular internal diameter (LVID), and LV posterior wall thickness (LVPW) were made from two-dimensionally directed M-mode images of the LV in both systole and diastole. Biochemical analyses of plasma samples were measured using the automatic CLIMA MC-15 analyser (RAL, Barcelona, Spain).

### Cell culture

Aortic VSMC from mouse and rat were obtained by the explant technique as previously described (18, 20). Briefly, endothelium-denuded medial tissue was cut into 1-2 mm cubes that were transferred to a 25 cm<sup>2</sup> culture flask containing 5 ml of pre-warmed

DMEM supplemented with 10% foetal calf serum (FCS; Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel) and antibiotics (100 U/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin). VSMC migrate out from the explants within 2–3 weeks. Then, after removing the explants from the flask surface, cells were trypsinised, used as P1 stage cells, and routinely subcultured. Rat and mouse VSMC were cultured in DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% FCS, antibiotics and 2 mmol/l L-glutamine (Invitrogen). Human VSMC were obtained from non-atherosclerotic arteries of hearts removed in transplant surgeries at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain) and cultured in M199 (Gibco, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 20% FCS, 2% human serum, 2 mmol/l L-glutamine and antibiotics as previously described (21). All the procedures were approved by the Reviewer Institutional Committee on Human Research of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and conform to the Declaration of Helsinki. Cells between passages 3 to 6 were seeded in multiwell plates to be used in transfection experiments and to isolate RNA and protein extracts as described below.

### Real-time PCR

Total RNA was isolated from both cultured cells and mouse tissues using Ultraspec™ (Biotecx, Houston, TX, USA) or the RNeasy Micro kit (Qiagen), respectively. RNA (1 µg) was reverse transcribed into cDNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in the presence of random hexamers. Quantification of mRNA levels was performed by real-time PCR using an ABI PRISM 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems) and specific primers and probes provided by the Assay-on-Demand system for hLOX (Hs00184700\_m1), murine LOX (Mm00495386\_m1), murine LOXL1 (Mm01145738\_m1), murine LOXL2 (Mm00804740\_m1), murine LOXL3 (Mm01184865\_m1), murine LOXL4 (Mm00446385\_m1), murine monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1; Mm00441242\_m1), murine interleukin 1β (IL1β; Mm00434328\_m1), murine IL6 (Mm00446191\_m1), murine chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20; Mm01268754\_m1). TATA-binding protein (TBP) was used as an endogenous control (Hs99999910\_m1 and Mm00446973\_m1 for human and mouse TBP, respectively) (22). Each sample was amplified in duplicate.

### Western-blot analysis

Whole-cell extracts were obtained from VSMC as described (21). In some experiments, supernatants from TgLOX or wild-type VSMC concentrated with Amicon Ultra 10K filter units (Millipore, Billerica, MA, USA) were used. Whole-cell extracts and concentrated cell supernatants were resolved by SDS-PAGE and transferred to 0.45 µm polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon, Millipore). Blots were incubated with antibodies directed against LOX (ab31238, Abcam, Milton, UK), embryonic smooth muscle myosin heavy chain (Myh10; ab684, Abcam), proliferating cell nuclear antigen (PCNA; FL-261, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), Akt (9272, Cell Signalling, Danvers, MA,

USA), phosphorylated-Akt (Ser473) (9271, Cell Signalling), extra-cellular-signalling regulated kinase-1/2 (ERK1/2) (9102, Cell Signalling), phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (9106, Cell Signalling), p38 MAPK (sc7149, Santa Cruz Biotechnology) and phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (9216, Cell Signalling). Bound antibodies were detected after incubation with a HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG and using the SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce, Rockford, IL, USA). Equal loading of protein was verified by Ponceau staining and by β-actin (A5441, Sigma, St. Louis, MO, USA) or glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; MAB374, Millipore) signal as stated.

### FACS analysis

LOX protein levels were analysed in VSMC from wild-type and TgLOX mice by FACS. Briefly, cells were fixed and permeabilised using Cytotfix/Cytoperm solution, washed with Perm/Wash buffer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), and stained with a specific rabbit polyclonal antibody against LOX (NB100-2527, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) followed by allophycocyanin-conjugated goat anti-rabbit IgG (FR62, Sigma). For each sample, at least 10,000 events were acquired on a Coulter Epics XL Flow Cytometer equipped with a 488-nm argon laser (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). The mean fluorescence intensity (MFI) of each sample was quantified. Samples incubated with the same final concentration of isotype-matched antibody were used as a negative control. Data were analysed with the Expo32 software (Beckman Coulter).

### Immunohistochemistry and immunocytochemistry

Mouse aortas and carotid arteries were perfused with phosphate-buffered saline (PBS), removed, fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 mol/l PBS (pH 7.4) for 24 hours (h) and embedded in paraffin. Aortic and carotid sections (5-µm) from TgLOX and wild-type mice were deparaffinised in xylene and rehydrated in graded ethanol solutions. Slides were then rinsed in distilled water, treated with 10% hydrogen peroxide, blocked with a 10% of normal serum and incubated with antibodies against LOX (ab31238, Abcam), PCNA (FL-261, Santa Cruz Biotechnology) or MCP-1 (sc-1785, Santa Cruz Biotechnology) overnight at 4°C. After washing, samples were incubated for 1 h with a biotinylated secondary antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). After rinsing three times in PBS, standard Vectastain (ABC) avidin-biotin peroxidase complex (Vector Laboratories) was applied, and the slides were incubated for 30 minutes. Colour was developed using 3,3'-diaminobenzidine (DAB), and sections were counterstained with haematoxylin before dehydration, clearing, and mounting. Negative controls, in which the primary antibody was omitted, were included to test for non-specific binding. Picrosirius red staining of aortic medial layers was performed as previously described (23). Quantitative analysis was carried out using polarized light microscopy and refringence analysis of images processed using ImageJ software. Results were calculated as a percentage of

the area. For the immunocytochemical analysis, VSMC from TgLOX and wild-type mice were seeded in Permanox® Chamber Slides (Lab-Tek®) as previously described (18).

### Lysyl oxidase activity

LOX activity was measured by a high sensitive fluorescent assay as previously described (7, 24). VSMC were seeded at a density of 150,000 cells/well in a six-well plate and, 48 h later, the media was replaced by phenol red-free RPMI (Gibco) depleted of serum, antibiotics and glutamine. After 24 h, LOX activity was measured in the supernatant. Briefly, an aliquot of the media (50 µl) was incubated in the presence and absence of 500 µmol/l β-aminopropionitrile (BAPN) at 37°C for 30 min with 1 U/ml of horseradish peroxidase, 10 µmol/l Amplex red (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) and 10 mmol/l 1,5-diaminopentane in 1.2 mol/l urea, 0.05 mol/l sodium borate pH 8.2. The reaction was stopped on ice, and differences in fluorescence intensity (excitation wavelength: 563 nm; emission wavelength: 587 nm) between samples with and without BAPN were determined.

### In vitro collagen polymerisation assay

VSMC from TgLOX and wild-type mice were seeded in six-well plates (150,000 cell/well). After three days, cell supernatants were harvested and centrifuged at 10,000 x g for 5 min at room temperature to remove cells and debris. Clarified cell supernatants from TgLOX and wild-type VSMC were concentrated four-fold onto centrifugal filter units (Amicon Ultra 10K; Millipore). Neutralised rat tail type I collagen (150 µl) was poured onto glass-bottomed dishes (Willco Wells B. V., Amsterdam, The Netherlands) and incubated at 37°C for 40 min. After gelification, 400 µl of concentrated medium were added on top and further incubated for 24 h at 37°C. Then collagen matrix was visualised by confocal reflection microscopy (Leica DMIRE2) as previously described (25).

### Measurement of total collagen

Total collagen content was measured using the QuickZyme collagen assay (QuickZyme Biosciences, Leiden, The Netherlands) according to the manufacturer's instructions. Aortas were hydrolysed in 6 mol/l HCl at 95°C for 20 h and the amount of hydroxyproline was determined by colourimetry. Results were expressed as µg collagen per mg of dry tissue weight.

### Transient transfection

Rat VSMC were transiently transfected with the pCAGGS-SM/hLOX construct. Transfection experiments were carried out using Lipofectamine™ LTX and Plus™ Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions (21). Following transfection, rat VSMC monolayers were growth-arrested by serum starvation for 24 h and finally processed for either total RNA or protein isolation.

### Lentivirus production and VSMC infection

The human LOX cDNA was obtained by PCR amplification from clone HLO20 with primers 5'-CAAAAG-GATCCATGCGCTTCGCCTGGACCG-3' (forward; BamHI site is underlined) and 5'-GCTTGGATCCATAACGGGTGAAATTGTGCAGCC-3' (reverse; BamHI site is underlined). The hLOX cDNA was cloned into the pLVX-puro lentiviral vector to generate pLVX/LOX, and proper orientation was confirmed by DNA sequencing. The empty vector was used as control. These constructs were transfected in HEK 293T cells according to the Lenti-X™ Lentiviral Expression System (Clontech, Mountain View, CA, USA) in order to obtain viral particles. After 48 h, cell culture supernatants containing recombinant lentiviruses were harvested, centrifuged at 500 x g for 5 min at 4°C and then filtered through 0.45 µm PVDF membrane filters. The viral titre was evaluated by transduction of HeLa cells with 10-fold serial dilutions of the lentivirus stock. Lentiviral particles were added to cells in medium containing Polybrene (8 µg/ml; Sigma-Aldrich), which was changed 24 h later. The consequence of LOX over-expression by lentiviral infection on VSMC proliferation and expression was evaluated after 10 days of puromycin selection.

### Determination of DNA synthesis and cell number

*De novo* DNA synthesis, determined by [6-<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation into DNA, was used as an index of mitogenic activity (18, 26). VSMC were seeded in 24-well plates and grown to subconfluency. The incorporation of [6-<sup>3</sup>H]-thymidine into DNA was determined in two sets of cell cultures: cultures maintained in complete medium, and cultures incubated with a growth factor-poor medium (0.2% FCS for 24 h) to arrest cell proliferation, and then stimulated with complete medium (20% FCS). [6-<sup>3</sup>H]-thymidine (23 Ci/mmol; Amersham, Woburn, MA, USA) was added to the cells at a concentration of 0.5 µCi/ml as described elsewhere. After 24 h, cultures were washed with PBS, fixed with 95% methanol, treated with 10% TCA at 4°C and dissolved in 0.3 N NaOH. Aliquots were counted on a β-counter (Beckman Coulter™, LS 6500 Multipurpose Scintillation Counter). Cell number of VSMC maintained in standard culture conditions (72 h) was determined after cell trypsinisation using a Multisizer™ 3 Coulter Counter® (Beckman Coulter).

### Migration assay

Migration of VSMC was assessed in a modified Boyden chamber assay (CytoSelect™ 24-Well Cell Invasion Assay) using collagen-coated polycarbonate membranes with 8.0 µm pore. Briefly, 50,000 VSMC in serum-free medium were loaded in the upper chamber, and the lower chamber was filled with media containing PDGF-BB (25 ng/ml; Selleckchem, Munich, Germany). After 4 h of incubation, non-invading cells were gently removed from the upper side of the membrane with cotton-tipped swabs. Cells migrating to the lower side of the filter were stained and quantified at OD 560

nm after colorant extraction following manufacturer's instructions.

### Wound healing assay

VSMC were grown to 80% confluency on 12-well plates. The monolayer was wounded by scraping with a P200 pipette tip. After washing, fresh media was added, and the extent of healing was determined after 16 h using an inverted microscope in phase contrast mode (DMIRE2, Leica). Four different fields were visualized and photographed. The invaded area was quantified by Image J software.

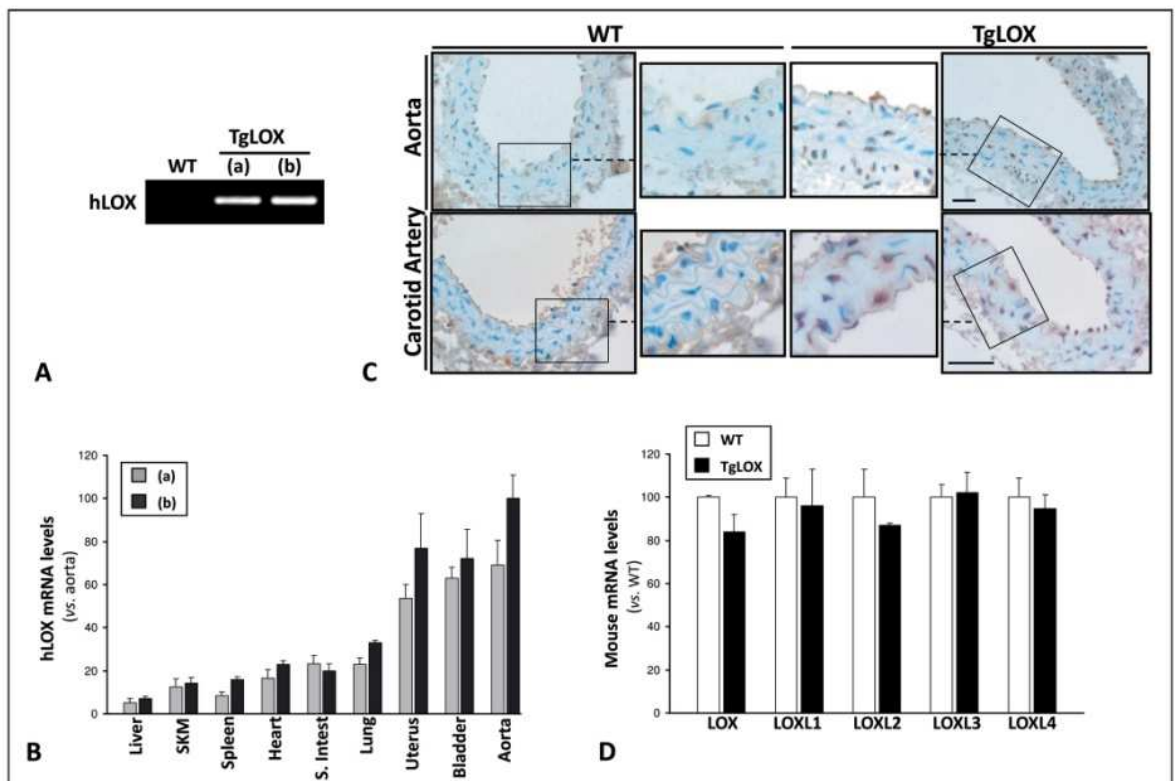
### Measurement of serum MCP-1 levels

MCP-1 levels were determined by ELISA (ELM-MCP1; RayBiotech Inc, Norcross, GA, USA) in mouse serum and cell superna-

tants. In cell cultures the results were normalised by lysate protein concentration.

### Carotid artery ligation experiments and morphometric analysis

Permanent ligation of the left common carotid artery was performed in four-month-old TgLOX (n=10) and wild-type mice (n=12) as previously described (18). Animals were anaesthetised by intraperitoneal injection of a ketamine/medetomidine/buprenorphine cocktail. A midline neck incision was made and the left common carotid artery was carefully dissected under a microscope and ligated with a 7-0 silk suture just proximal to its bifurcation. After three weeks under standard chow diet the animals were anaesthetised with ketamine (75 mg/kg) and medetomidine (1 mg/kg) and sacrificed by thoracotomy. Carotid arteries were then excised, fixed in 4% paraformaldehyde/0.1 mol/l PBS (pH



**Figure 1: Generation and characterisation of TgLOX mice.** A) Two stable transgenic mouse lines (a and b) were established by conventional methods. Offspring was screened by PCR of genomic DNA from mouse tail biopsies. The ethidium bromide-stained agarose gel shows the amplification of a 360 bp fragment corresponding to a part of the SM22 $\alpha$  promoter and the adjacent region of the human LOX (hLOX) cDNA, in samples from families a and b, that was not detected in wild-type mice (WT). B) Relative mRNA levels of hLOX in different tissues from TgLOX mice (families a and b) analyzed by real-time PCR. For comparative purposes, an arbitrary value of

100 was assigned to aorta (family b), the tissue that displays the highest expression. Results are expressed as media  $\pm$  SEM (n= 9; S. intest, small intestine; SKM, skeletal muscle). C) Representative immunohistochemical analysis showing LOX staining (brown colour) in aorta and carotid artery sections from both WT and TgLOX mice. The indicated areas are shown at high magnification (bars= 30  $\mu$ m). D) Endogenous mRNA levels of LOX and LOXL isoenzymes in aorta from wild-type (white bars) and TgLOX mice (black bars) evaluated by real-time PCR. Data are expressed as media  $\pm$  SEM (n= 9 mice per group; \*P<0.001 vs WT mice).

7.4) for 24 h, and embedded in paraffin for morphometric and immunohistochemical analysis (18). Serial sections (5  $\mu$ m thick) of paraffin-embedded arteries were cut using a microtome (Leica JUNG RM 2055). Cross-sections at 1.4, 1.5 and 1.6 mm from the ligation site were stained with hematoxylin and eosin. Images of these sections were captured with a microscope (Olympus Vanox AHBT3) at 100X magnification, and analysed using the image analysis software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). The circumferences of the lumen, internal elastic lamina (IEL) and external elastic lamina (EEL) were obtained by tracing their contours on digitalised images. Medial, intimal and lumen areas were calculated from these parameters and data were averaged. The media area is the area between EEL and IEL, and the intima area was calculated by subtracting the lumen area from the IEL area. The % stenosis was calculated as:  $[\text{intima area} / (\text{intima area} + \text{lumen area})] \times 100$  (18).

### Statistical analysis

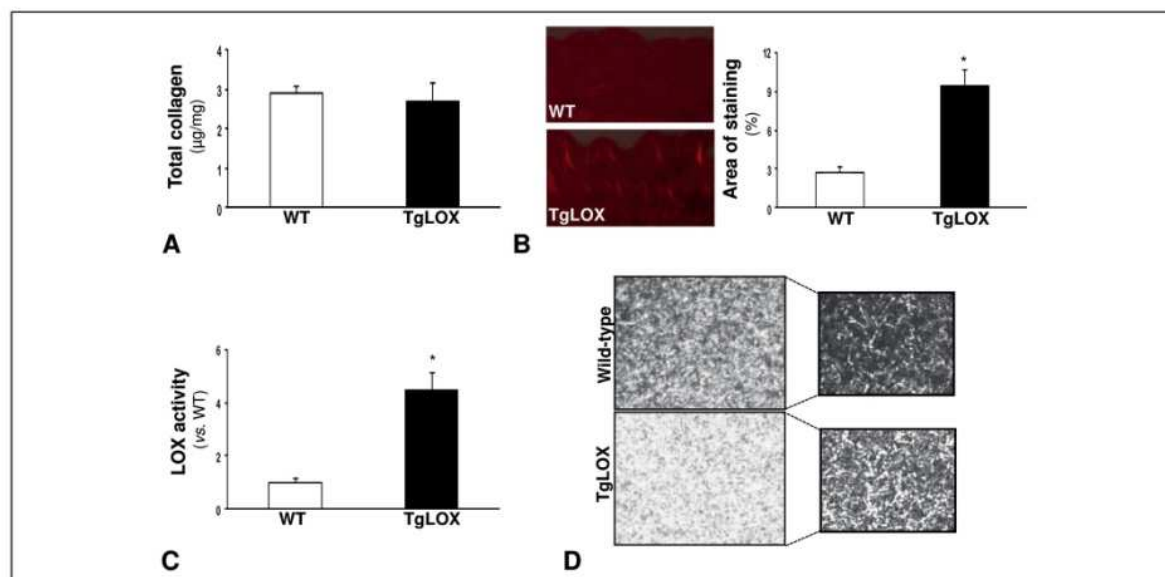
Results are shown as mean  $\pm$  standard error (unless otherwise stated). Significant differences were established by Student's t-test, or Mann-Whitney U-test for unpaired data. Analysis of data was done using the GraphPad Instat programme (GraphPad Software V2.03). Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## Results

### Establishment of a transgenic mice over-expressing LOX in SMC

The design of the pCAGGS-SM/hLOX expression construct is shown in Suppl. Figure 1A (available online at [www.thrombosis-online.com](http://www.thrombosis-online.com)). The full-length cDNA of human LOX (hLOX) was cloned into the *Eco*RI site of pCAGGS-SM, downstream the mouse SM22a minimal promoter that drives the expression to SMC. As shown in Suppl. Figure 1B and C (available online at [www.thrombosis-online.com](http://www.thrombosis-online.com)), rat VSMC transiently transfected with this construct exhibited an increase in both LOX mRNA and protein levels, and an enhanced secretion of LOX to the culture media.

The expression cassette was microinjected into the pronucleus of fertilised mouse eggs. Viable microinjected eggs were subsequently transferred to the oviducts of pseudopregnant recipient females. Twenty-five percent offspring was positive for the transgene. Two founders were mated with C57BL/6J mice and offspring was screened by PCR. The integrated transgene was stably transmitted to subsequent generations following the expected Mendelian ratios, suggesting that LOX transgenic mice (TgLOX) exhibit normal embryonic development. Furthermore, animals were viable, healthy and fertile. TgLOX mice were mated with C57BL/6J mice up to tenth generation to guarantee the 99.9% of purity on this genetic background. Both TgLOX lines (a and b;  $\blacktriangleright$  Figure 1A)



**Figure 2: Enhanced vascular collagen processing in TgLOX mice.** A) Vascular collagen content evaluated by hydroxyproline analysis in aorta samples from wild-type (WT) and TgLOX mice ( $n = 6$ ). B) Collagen fibril packing was analysed by Picrosirius Red staining under polarised light in aortic medial layers from TgLOX mice ( $n = 9$ ) and wild-type littermates ( $n = 7$ ). Representative staining (left panel) and bars graph showing the quantification of stained areas (right panel). \* $P < 0.001$  vs WT. C) LOX activity was evaluated in VSMC supernatants from TgLOX mice and WT littermates by a fluorimetric

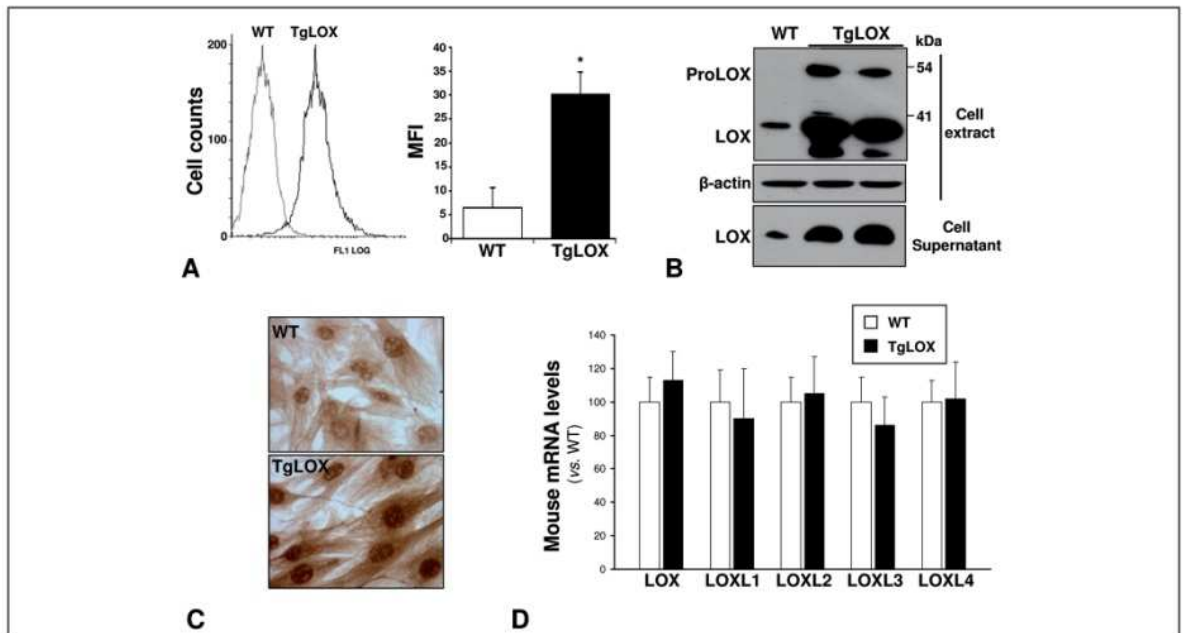
assay ( $n = 9$ ). \* $P < 0.001$  vs WT. D) Concentrated cell supernatants from TgLOX or WT VSMC were added on top of type I collagen gels and incubated at 37°C for 24 h. Representative photomicrographs of collagen gels were obtained by confocal reflection microscopy corresponding to the maximal projection of a z series (18 sections); a single Z plane corresponding to these images is shown on right. Supernatants from TgLOX cells induced the formation of a higher density of fibres.

grew until adulthood without evident phenotypic differences with their non-transgenic littermates, displaying normal body weight, blood pressure values, plasma lipids (Suppl. Table 1, available online at [www.thrombosis-online.com](http://www.thrombosis-online.com)) and echocardiographic data (Suppl. Table 2, available online at [www.thrombosis-online.com](http://www.thrombosis-online.com)). To assess the selectivity of the transgene for SMC-rich tissues, we analysed nine separate organs from adult transgenic animals by real-time PCR. A strong hLOX expression was observed in SMC-rich tissues such as aorta, bladder and uterus, while weak expression could be detected in other tissues such as liver (►Figure 1B). A similar expression pattern was observed in both transgenic lines. LOX over-expression in the media was confirmed by immunohistochemistry in both carotid artery and aorta without finding any difference between line a and b (►Figure 1C and data not shown). Furthermore, neither the vascular expression of endogenous LOX nor that of other LOX-Like (LOXL) isoenzymes was modified by the expression of the transgene (►Figure 1D).

### VSMC from TgLOX mice over-express an enzymatically active LOX

The analysis of total collagen content by a colorimetric quantification of hydroxyproline levels revealed no differences between

aortas from wild-type and transgenic mice (►Figure 2A). However, higher amounts of mature collagen were detected in the media from TgLOX mice as determined by picosirius red staining analysed under polarised light (►Figure 2B). To further analyse the bioactivity of LOX in these animals, aortic VSMC were isolated from both TgLOX mice and wild-type control littermates. LOX activity levels were higher in cell culture media from transgenic VSMC than in control cultures (►Figure 2C). Accordingly, VSMC supernatants from transgenic mice incubated with soluble type I collagen evoked a more prominent collagen cross-linking (►Figure 2D). The increased LOX activity detected in VSMC from TgLOX mice was associated to an intense expression of LOX evaluated by FACS, Western-blot and immunocytochemistry (►Figure 3A-C). Transgenic VSMC exhibited higher levels of both the pro-enzyme and the mature forms of LOX than wild-type cells, as well as an increase in the secretion of LOX to the extracellular environment evaluated in concentrated cell media (►Figure 3B, lower panel). Accordingly, an enhanced staining of LOX was observed in TgLOX cells (►Figure 3C). We excluded that LOX over-expression evoke a compensatory regulation of endogenous LOX or LOXL isoenzymes, because their mRNA levels were not significantly different between TgLOX and wild-type cells (►Figure 3D). Similar results were obtained with cells from both transgenic



**Figure 3: Aortic VSMC from TgLOX mice synthesise, process and secrete LOX.** VSMC were isolated from TgLOX mice and wild-type (WT) littermates as described in *Material and methods*. LOX expression was analysed by FACS (A), Western-blot (B) and immunocytochemistry (C). A) Representative histogram showing LOX expression analysed by FACS in VSMC from wild-type (WT; gray line) and TgLOX (black line). The graph on right summarizes the results of median MFI (Mean Fluorescence Intensity) measurement of 4 different pools of VSMC from both WT and TgLOX animals. B) LOX pro-

tein levels were determined by Western-blot in both cell lysates and supernatants. The position of the pro-enzyme (ProLOX) and mature LOX forms are indicated.  $\beta$ -actin was analyzed as loading control. Representative immunoblots from two independent experiments were shown. D) Endogenous expression of murine LOX and LOXL isoenzymes assessed by real-time PCR in VSMC from both TgLOX (black bars) and WT (white bars) animals. Media  $\pm$  SEM is represented (n= 6).

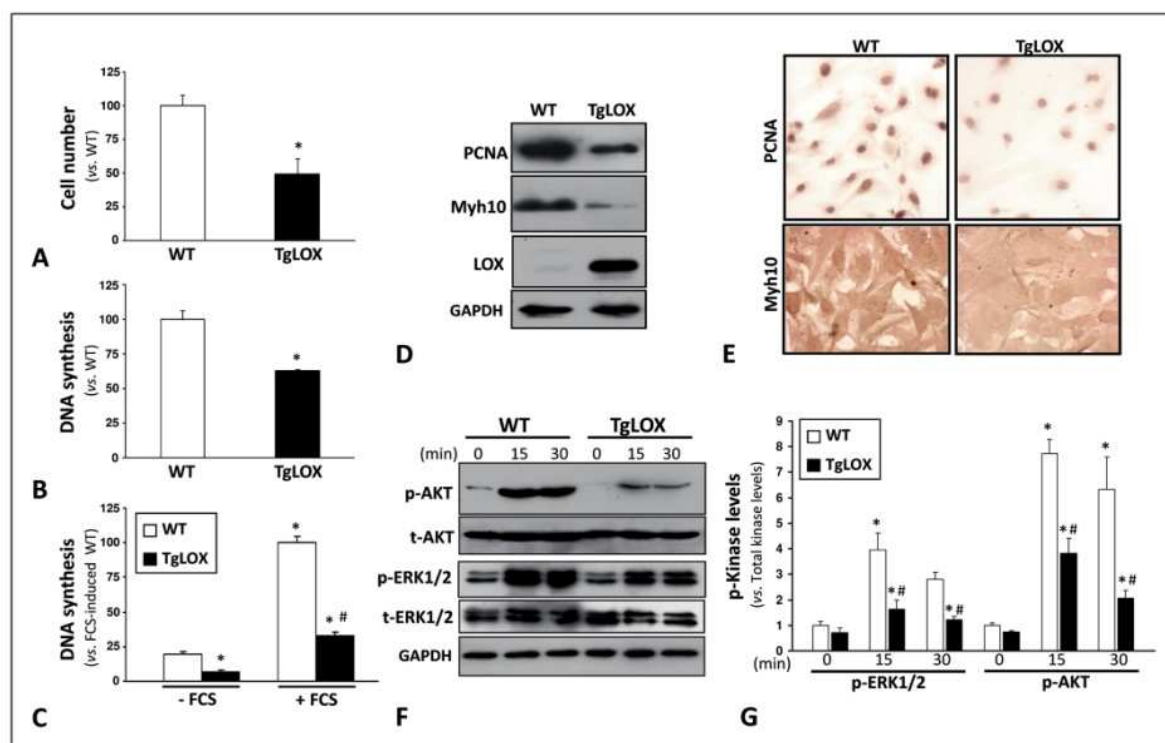


lines (data not shown) and therefore we interchangeably used both lines for subsequent studies. These data demonstrate high levels of human LOX in VSMC from transgenic mice and that this enzyme is properly secreted and processed to the extracellular environment, yielding an active enzyme that induces collagen assembly.

### LOX down-regulates VSMC proliferation

To characterise the impact of LOX on VSMC function, we examined whether LOX could affect VSMC proliferation. As shown in ►Figure 4A, a decrease in cell number was observed in TgLOX VSMC cultures maintained in standard culture conditions for 72 h compared with those from wild-type VSMC. In agreement, VSMC from TgLOX mice growing in complete medium showed lower [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation rates than cells from wild-type ani-

mals (►Figure 4B), and DNA synthesis was diminished in quiescent TgLOX VSMC stimulated with FCS compared with wild-type cells (►Figure 4C). Accordingly, VSMC from TgLOX mice exhibited a marked reduction in the expression of PCNA and Myh10, a marker of SMC phenotypic switching highly expressed in proliferating cells (►Figure 4D and E). These effects were associated with an attenuation of FCS-stimulated phosphorylation of Akt and ERK-1/2 (►Figure 4F and G), while p38 MAPK was similarly activated in both cell types (data not shown). Consequently, the ability of TgLOX VSMC to invade the denuded area in wound healing assays was lower than that of wild-type cells (Suppl. Figure 2A, available online at [www.thrombosis-online.com](http://www.thrombosis-online.com)), despite in modified Boyden's chamber transgenic cells show a discreet increase in cell migration in response to PDGF-BB respect normal cells (Suppl. Figure 2B, available online at [www.thrombosis-online.com](http://www.thrombosis-online.com)).



**Figure 4: Aortic VSMC from TgLOX mice showed attenuated cell proliferation rates.** A, B) Aortic VSMC isolated from TgLOX (black bars) or wild-type (WT; white bars) mice were maintained in complete medium and analysed for cell proliferation by cell counting (A) or by the [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation method (B). Results represented as mean  $\pm$  SEM come from three experiments performed in quintuplicate. \* $P < 0.02$  vs WT cells. C) [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation into DNA synthesis was evaluated in 24 h serum-starved cells stimulated (+FCS) or not (-FCS) with 20% FCS. Results are represented as mean  $\pm$  SEM from three experiments performed in quintuplicate. \* $P < 0.001$  vs quiescent WT cells; #  $P < 0.001$  vs FCS-induced WT cells. D) Representative immunoblot corresponding to PCNA, Myh10 and LOX from both cell types. GAPDH was analysed as loading control. E) Representative image

corresponding to the immunocytochemical analysis of PCNA and Myh10 in aortic VSMC from TgLOX and WT mice. F) The effect of LOX over-expression on the activation of Akt (p-Akt) and ERK1/2 (p-ERK1/2) in these cells was monitored by Western-blot. Total Akt (t-Akt) and ERK1/2 (t-ERK1/2) protein levels are also shown. GAPDH was used as a loading control. G) Bars graph showing the time course of Akt or ERK1/2 phosphorylation in WT and TgLOX VSMC. Values (obtained by densitometric analysis of Western-blot) are expressed as fold-change of pERK1/2 and pAkt levels in WT cells at time 0. Results normalised by the corresponding total kinase levels are shown as mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ;  $P < 0.05$ : \* vs WT or TgLOX cells at time 0; # vs WT cells at the same time of analysis).

com). Likewise, lentivirus-mediated over-expression of LOX in human VSMC triggered a reduction in proliferative rates (► Figure 5A), a concomitant decrease in Myh10 and PCNA expression (► Figure 5B and C) and a weaker activation of Akt and ERK-1/2 than control cells (► Figure 5D and E).

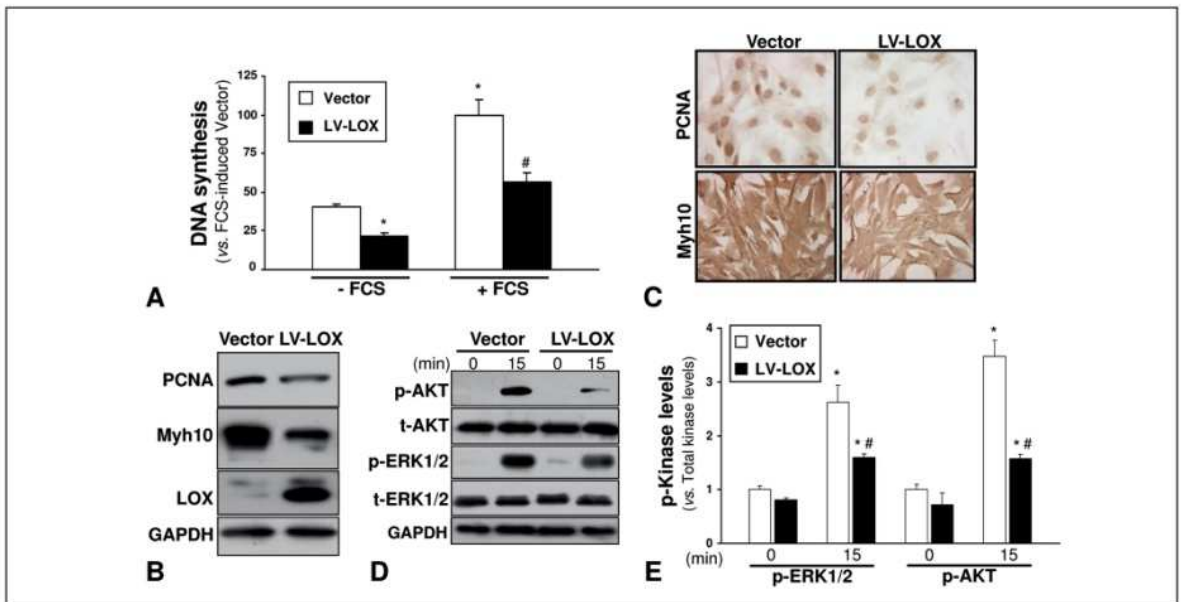
### LOX over-expression limits neointima formation in the carotid artery ligation model

Results described above suggest a role of LOX in the control of VSMC proliferation. To address its pathophysiological relevance, we examined the consequences of VSMC-LOX over-expression on neointimal formation in TgLOX mice. Carotid arteries from wild-type and TgLOX mice were ligated and harvested 21 days after ligation. Wild-type mice exhibited a substantial vascular remodelling. Morphometric analysis showed an attenuated neointimal thickening in TgLOX animals (► Figure 6A, upper panel). Our data evidenced a reduction in the percentage of stenosis and in the area of intima and media layers in TgLOX vessels compared with carotid arteries from their non-transgenic littermates (► Figure 6B). Furthermore, after carotid artery ligation, reduced PCNA

staining was observed in the neointima of TgLOX mice (► Figure 6A, lower panel). By contrast, vascular expression of transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 and basic fibroblast growth factor (bFGF), was similar in both wild-type and TgLOX mice (data not shown). Therefore, these results indicate that LOX over-expression attenuates lesion formation by reducing intimal hyperplasia and the effect seems to be independent of TGF- $\beta$ 1 and bFGF.

### LOX over-expression reduces neointimal MCP-1 expression

It has been previously described that adenoviral LOX over-expression inhibits MCP-1 in rat VSMC (27). Interestingly, MCP-1 immunostaining in the neointima of ligated carotid arteries was lower in TgLOX than in wild-type mice (► Figure 7A). In agreement, LOX transgenesis reduced both MCP-1 mRNA levels and secretion in VSMC in culture, while the expression of other cytokines/chemokines remained unaffected (► Figure 7B and C). Vascular LOX over-expression, however, did not affect circulating levels of MCP-1, that remained unchanged at 3, 14 and 21 days after carotid ligation in both WT and transgenic mice (► Figure 7D).



**Figure 5: LOX limits cell proliferation in human VSMC.** A) [3H]-thymidine incorporation into DNA synthesis was evaluated in human VSMC transduced with a lentiviral vector encoding for LOX (LV-LOX; black bars) or with the corresponding empty vector (Vector; white bars). Cells were serum-starved for 24 h and then stimulated (+FCS) or not (-FCS) with 20% FCS. Results represented as mean  $\pm$  SEM come from three experiments performed in quintuplicate. \* $P < 0.001$  vs quiescent vector cells; #  $P < 0.001$  vs FCS-induced Vector cells. B) Representative immunoblot corresponding to PCNA, Myh10 and LOX assessed in extracts from LV-LOX and Vector transduced human VSMC. GAPDH was analysed as a loading control. C) Immunocytochemical

analysis of PCNA and Myh10 expression in these cells. A representative image is shown. D) The effect of LOX over-expression in human VSMC on the activation of Akt (p-Akt) and ERK1/2 (p-ERK1/2) was monitored by Western-blot. Total Akt (t-Akt) and ERK1/2 (t-ERK1/2) protein levels are also shown. GAPDH was used as a loading control. E) Densitometric analysis of Western-blot showing the induction of Akt and ERK1/2 phosphorylation in Vector and LV-LOX VSMC. Values are expressed as fold-change of pERK1/2 and pAkt levels in Vector cells at time 0. Results normalised by the corresponding total kinase levels are shown as mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ); \* $P < 0.05$  vs Vector or LV-LOX cells at time 0; # $P < 0.05$  vs LV-LOX cells at 15 min).

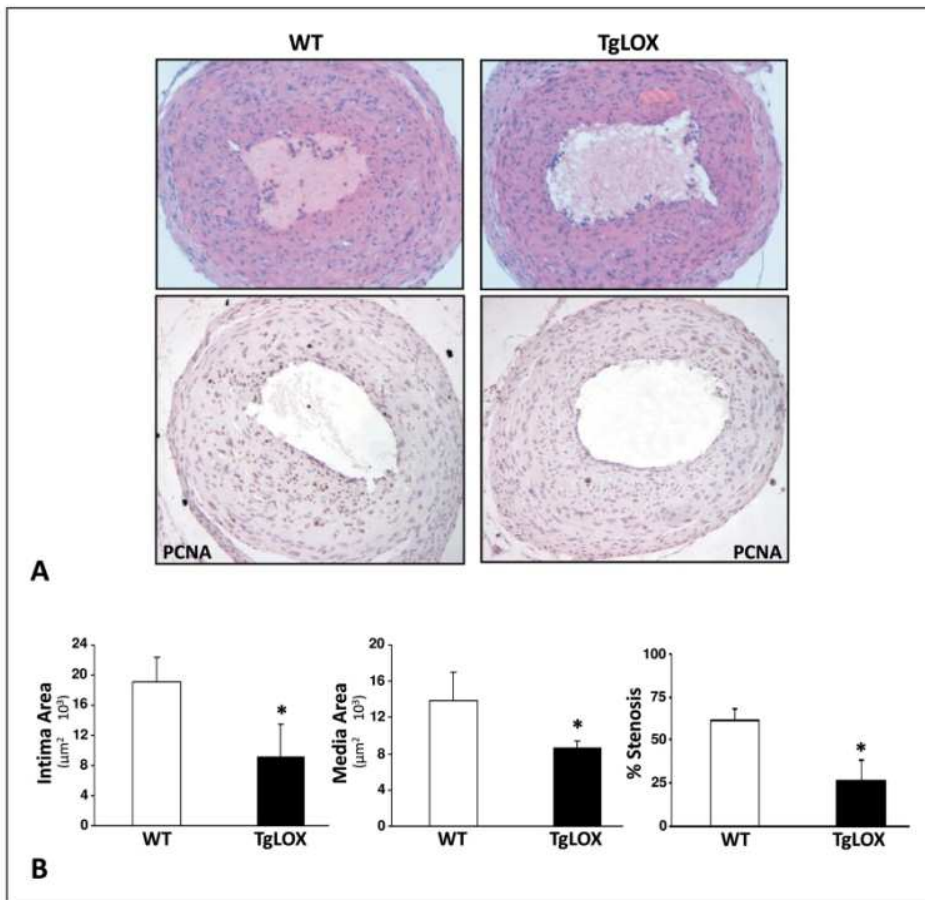
## Discussion

We and others have previously shown that LOX plays a key role in vascular endothelial homeostasis (7-10, 28); however, the contribution of this enzyme to the control of vascular remodelling and VSMC function is still controversial (29, 30). A deeper understanding of LOX biology would require genetically modified animal models. Because LOX knockout mice are not viable (16, 17), we have generated a transgenic mouse over-expressing LOX in VSMC to study the relevance of LOX in vascular biology.

Our transgenic mouse model did not show organ abnormalities, nor altered body weight, blood pressure or cardiac parameters. Furthermore, SMC-specific LOX over-expression did not influence fertility, and TgLOX animals exhibited a normal embryonic development. Conversely, two independent groups showed that LOX deletion has dramatic consequences on the development of cardiovascular and respiratory systems, leading to late gestational death (16, 17). The pathophysiological abnormalities observed in the cardiovascular system of LOX<sup>-/-</sup> embryos evidences the crucial role of this enzyme in the development and

function of the cardiovascular system and suggest that most of the biological activities elicited by LOX could not be carried out by other members of its family (31).

TgLOX mice displayed a SMC-specific pattern consistent with the SM22 $\alpha$  promoter-driven expression (18, 32). The SM22 $\alpha$  proximal promoter includes the two CArG boxes essential for the muscle-specific expression of SM22 $\alpha$ , as previously described (32-34). Accordingly, high hLOX expression was detected in SMC-rich tissues such as uterus and bladder, and in aorta and other vascular beds such as carotid arteries. Immunohistochemical analysis revealed LOX staining in the media. Consistent with immunohistochemical data, VSMC isolated from transgenic mice exhibited a cytosolic LOX staining extending from the nucleus toward the cell membrane, in agreement with the immunostaining pattern previously reported for LOX in several cell types including VSMC (35, 36). Interestingly, VSMC from transgenic mice expressed the pro-LOX form, which was properly secreted and processed, yielding high levels of mature and bioactive LOX. In agreement, an increase in collagen assembly was detected in the vascular wall of transgenic mice. Thus, our results indicate that the human transgene is

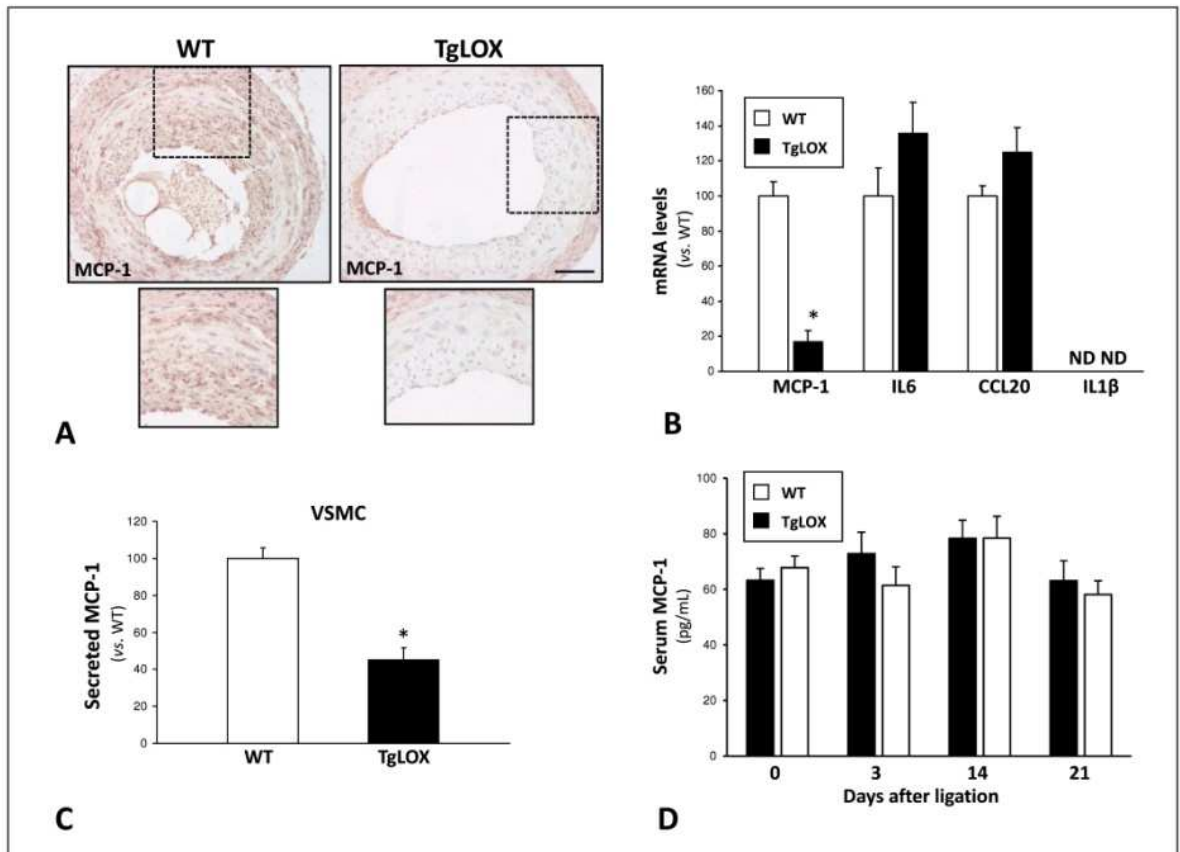


**Figure 6: Transgenesis of LOX limits vascular remodelling in the mouse ligation carotid model.** Left common carotid arteries were harvested from TgLOX mice (n= 10) and wild-type (WT) littermates (n= 12) 21 days after permanent ligation, and were subjected to morphometric analysis as described in *Material and methods*. A) Representative microphotographs of injured carotid arteries stained with hematoxylin and eosin in WT and TgLOX mice (upper panel). Lower panel shows PCNA immunostaining performed in sections from ligated carotid arteries in TgLOX mice and WT littermates. B) Analysis of intima and media areas and percentage of stenosis from sections covering the region 1.4 to 1.6 mm from the ligation site. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*P<0.05 vs wild-type mice.

properly expressed and that human LOX is post-translationally processed to yield the secreted and active form.

We observed that both VSMC from TgLOX mice and LOX lentiviral-transduced human VSMC exhibited lower proliferation rates than wild-type cells. LOX over-expressing cells displayed a concomitant decrease in the expression of PCNA (a marker of cell proliferation) and Myh10 (a marker of SMC phenotypic switching that is up-regulated in proliferating SMC) (37). In both cell types, this response was associated to a weaker phosphorylation of Akt and ERK-1/2 in FCS-stimulated cells. LOX over-expressing cells exhibited a slight increase in chemotaxis in response to PDGF respect normal cells, in agreement with previous results that involved LOX in PDGF-induced chemotaxis (29). However, in scratch assays, TgLOX VSMC showed a lower invasive capacity than wild-type cells. Considering that the wound healing assay tests the intrinsic ability of TgLOX to migrate and proliferate, our results suggest that both capabilities are attenuated in TgLOX

VSMC prevailing over the role that LOX could play in chemotaxis induced by exogenous stimuli such as PDGF. In fact, TgLOX VSMC expressed and secreted lower levels of MCP-1 that wild-type cells (see below). Furthermore, neointimal thickening was significantly attenuated in TgLOX mice after carotid artery ligation. Taken together, these results strongly support that LOX is involved in vascular remodelling limiting VSMC proliferation and neointimal thickening. It should be noted that previous approaches aiming to analyse the role of LOX in the regulation of cell proliferation, migration and signalling yielded inconclusive and somewhat controversial results (29, 30). For instance, although in quiescent rat adult VSMC proliferative stimuli increased LOX expression, in neonatal VSMC, proliferation rates and LOX expression levels were found inversely related (6). Similarly, over-expression of LOX has been observed in animal models after intravascular injury (38, 39); but this up-regulation was not clearly associated with vascular remodelling (14, 15). Our results are in



**Figure 7: Transgenesis of LOX reduces neointimal and VSMC MCP-1 expression.** A) Representative MCP-1 immunostaining in hematoxylin counterstained cross-sections of ligated carotid arteries from wild-type (WT) and TgLOX mice three weeks after ligation. The indicated areas are shown at high magnification (bar=30  $\mu$ m). B) mRNA levels of the indicated cytokines/chemokines evaluated by real-time PCR in VSMC from WT and TgLOX mice

(n= 6; \*P<0.05 vs WT cells; ND, non detected). C) Secreted MCP-1 levels determined by ELISA in cell supernatants from these cells (n= 6; \*p<0.05 vs WT). D) Serum MCP-1 levels determined in both WT (n= 12) and TgLOX mice (n= 10) undergoing carotid artery ligation. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM.

agreement with those suggesting an anti-proliferative role for LOX in VSMC. Low MCP-1 expression was detected in the neointima of carotid arteries from TgLOX mice, and we found reduced expression and secretion of this chemokine in transgenic VSMC compared with control cells, in agreement with previous data in rat VSMC over-expressing LOX (27). The reduction in the vascular expression of this chemokine, involved in VSMC proliferation and migration (40, 41), is in agreement with the reduced spontaneous ability of TgLOX VSMC to invade the denuded area in wound healing assays. Additionally, other mechanisms could be involved in the lower proliferative rates of transgenic cells. We have not observed significant differences in the vascular expression of growth factors involved in restenosis such as bFGF and TGF- $\beta$ 1, although these factors have been shown to be oxidised by LOX (42, 43). Finally, LOX-PP could also play a role because it has been described that in neonatal rat aortic VSMC this propeptide inhibits cell proliferation and Erk1/2 activation (30) and it is responsible for the LOX-induced growth inhibition in NIH3T3 fibroblasts. Indeed, in ras-transformed NIH3T3, LOX-PP limits the activation of phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, Erk1/2 kinase and NF- $\kappa$ B (44). It should be emphasised that most of the conflicting results related with the impact of LOX on cell biology come from studies performed with constructs that include tag sequences in their C-terminal ends or in which indispensable regions for LOX secretion have been deleted (45). Therefore, the subcellular location and biological activity of recombinant proteins could differ from the native ones. In our study we have over-expressed the entire Pro-LOX, and observed that it was normally secreted and pro-

cessed into mature and catalytically active LOX, thus supporting the biological relevance of our results.

In summary, our results evidence that LOX plays a critical role in VSMC proliferation and vascular remodelling, and validate a new animal model that could be a useful tool to improve our understanding of LOX in vascular biology.

#### Acknowledgements

We are indebted to Prof. Eric Olson and Dr Mäki for kindly providing us with the SM22 $\alpha$  promoter and human LOX cDNA respectively. Authors are grateful to Silvia Aguiló and Marta Sanz for their technical assistance.

#### Conflicts of interest

None declared.

#### References

- Fuster JJ, Fernández P, González-Navarro H, et al. Control of cell proliferation in atherosclerosis: insights from animal models and human studies. *Cardiovasc Res* 2010; 86: 254-264.
- Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med* 2002; 8: 1249-1256.
- Wessely R. New drug-eluting stent concepts. *Nat Rev Cardiol* 2010; 7: 194-203.
- Kim SH, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol* 2011; 209: 139-151.
- Rodríguez C, Rodríguez-Sinovas A, Martínez-González J. Lysyl oxidase as a potential therapeutic target. *Drug News Perspect* 2008; 21: 218-224.
- Rodríguez C, Martínez-González J, Raposo B, et al. Regulation of lysyl oxidase in vascular cells: lysyl oxidase as a new player in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 2008; 79: 7-13.
- Rodríguez C, Raposo B, Martínez-González J, et al. Low density lipoproteins down-regulate lysyl oxidase in vascular endothelial cells and the arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1409-1414.
- Rodríguez C, Alcludia JF, Martínez-González J, et al. Statins normalize vascular lysyl oxidase down-regulation induced by proatherogenic risk factors. *Cardiovasc Res* 2009; 83: 595-603.
- Raposo B, Rodríguez C, Martínez-González J, et al. High levels of homocysteine inhibit lysyl oxidase (LOX) and down-regulate LOX expression in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 2004; 177: 1-8.
- Rodríguez C, Alcludia JF, Martínez-González J, et al. Lysyl oxidase (LOX) down-regulation by TNF $\alpha$ : A new mechanism underlying TNF $\alpha$ -induced endothelial dysfunction. *Atherosclerosis* 2008; 196: 558-564.
- Payne SL, Hendrix MJ, Kirschmann DA. Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer—a prospect. *J Cell Biochem* 2007; 101: 1338-1354.
- Gacheru SN, Thomas KM, Murray SA, et al. Transcriptional and post-transcriptional control of lysyl oxidase expression in vascular smooth muscle cells: effects of TGF- $\beta$ 1 and serum deprivation. *J Cell Biochem* 1997; 65: 395-407.
- Green RS, Lieb ME, Weintraub AS, et al. Identification of lysyl oxidase and other platelet-derived growth factor-inducible genes in vascular smooth muscle cells by differential screening. *Lab Invest* 1995; 73: 476-482.
- Spears JR, Zhan H, Khurana S, et al. Modulation by beta-aminopropionitrile of vessel luminal narrowing and structural abnormalities in arterial wall collagen in a rabbit model of conventional balloon angioplasty versus laser balloon angioplasty. *J Clin Invest* 1994; 93: 1543-1553.
- Brasselet C, Durand E, Addad F, et al. Collagen and elastin cross-linking: a mechanism of constrictive remodeling after arterial injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H2228-2233.
- Maki JM, Rasanen J, Tikkanen H, et al. Inactivation of the lysyl oxidase gene *Lox* leads to aortic aneurysms, cardiovascular dysfunction and perinatal death in mice. *Circulation* 2002; 106: 2503-2509.

#### What is known about this topic?

- Lysyl oxidase (LOX), an enzyme responsible for ECM scaffolding, has been involved in the regulation of vascular homeostasis.
- Previous studies analysing the involvement of LOX in injury-induced vascular remodelling have yielded inconclusive results and clear evidence for a role of LOX in this process is still missing.
- The absence of viable genetically-modified LOX models limits our knowledge about LOX in vascular biology.

#### What does this paper add?

- A TgLOX mouse model that over-expresses human LOX specifically in SMC and shows high levels of functional LOX in the vascular wall.
- VSMC from TgLOX mice exhibit reduced proliferative rates, a lower expression of proliferative markers, a weaker activation of Akt and ERK-1/2 and a decreased secretion of MCP-1.
- TgLOX mice show an attenuated neointimal thickening induced by carotid artery ligation, supporting a critical role of LOX in VSMC proliferation and vascular remodelling.
- The TgLOX mouse is the unique viable animal model currently available to improve our understanding of LOX in vascular biology.

17. Hornstra IK, Birge S, Starcher B, et al. Lysyl oxidase is required for vascular and diaphragmatic development in mice. *J Biol Chem* 2003; 278: 14387-14393.
18. Rodriguez-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: 1949-1959.
19. Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, et al. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2003.
20. Churchman AT, Siow RC. Isolation, culture and characterisation of vascular smooth muscle cells. *Methods Mol Biol* 2009; 467: 127-138.
21. Calvayrac O, Rodriguez-Calvo R, Alonso J et al. CCL20 is increased in hypercholesterolemic subjects and is upregulated by LDL in vascular smooth muscle cells: role of NF- $\kappa$ B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 2733-2741.
22. Guadall A, Orriols M, Rodriguez-Calvo R, et al. Fibulin-5 is up-regulated by hypoxia in endothelial cells through a HIF-1[alpha] dependent mechanism. *J Biol Chem* 2011; 286: 7093-7103.
23. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979; 11: 447-55.
24. Guadall A, Orriols M, Alcludia JF, et al. Hypoxia-induced ROS signaling is required for LOX up-regulation in endothelial cells. *Front Biosci* 2011; 3: 955-967.
25. Wong CC, Gilkes DM, Zhang H, et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 16369-16374.
26. Martinez-Gonzalez J, Rius J, Castello A, et al. Neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) modulates vascular smooth muscle cell proliferation. *Circ Res* 2003; 92: 96-103.
27. Onoda M, Yoshimura K, Aoki H, et al. Lysyl oxidase resolves inflammation by reducing monocyte chemoattractant protein-1 in abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis* 2010; 208: 366-369.
28. Baker AM, Bird D, Welti JC, et al. Lysyl oxidase plays a critical role in endothelial cell stimulation to drive tumor angiogenesis. *Cancer Res* 2013; 73: 583-594.
29. Lucero HA, Ravid K, Grimsby JL, et al. Lysyl oxidase oxidizes cell membrane proteins and enhances the chemotactic response of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2008; 283: 24103-24117.
30. Hurtado PA, Vora S, Sume SS, et al. Lysyl oxidase propeptide inhibits smooth muscle cell signaling and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 366: 156-161.
31. Mäki JM, Sormunen R, Lippo S, et al. Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissues. *Am J Pathol* 2005; 167: 927-936.
32. Li L, Miano JM, Mercer B, et al. Expression of the SM22alpha promoter in transgenic mice provides evidence for distinct transcriptional regulatory programs in vascular and visceral smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1996; 132: 849-859.
33. Strobeck M, Kim S, Zhang JC, et al. Binding of serum response factor to CArG box sequences is necessary but not sufficient to restrict gene expression to arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 16418-16424.
34. Kakkar R, Ye B, Stoller DA, et al. Spontaneous coronary vasospasm in KATP mutant mice arises from a smooth muscle-extrinsic process. *Circ Res* 2006; 98: 682-689.
35. Li W, Nellaiappan K, Strassmaier T, et al. Localization and activity of lysyl oxidase within nuclei of fibrogenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 12817-12822.
36. Saad FA, Torres M, Wang H, et al. Intracellular lysyl oxidase: effect of a specific inhibitor on nuclear mass in proliferating cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 396: 944-949.
37. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease. *Physiol Rev* 2004; 84: 767-801.
38. Nuthakki VK, Fleser PS, Malinzak LE, et al. Lysyl oxidase expression in a rat model of arterial balloon injury. *J Vasc Surg* 2004; 40: 123-129.
39. 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: 1259-1271.
40. Spinetti G, Wang M, Monticone R, et al. Rat aortic MCP-1 and its receptor CCR2 increase with age and alter vascular smooth muscle cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1397-402.
41. Viedt C, Vogel J, Athanasiou T, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 induces proliferation and interleukin-6 production in human smooth muscle cells by differential activation of nuclear factor-kappaB and activator protein-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 914-920.
42. Li W, Nugent MA, Zhao Y, et al. Lysyl oxidase oxidizes basic fibroblast growth factor and inactivates its mitogenic potential. *J Cell Biochem* 2003; 88: 152-164.
43. Atsawasuwan P, Mochida Y, Katafuchi M, et al. Lysyl oxidase binds transforming growth factor-beta and regulates its signaling via amine oxidase activity. *J Biol Chem* 2008; 283: 34229-34240.
44. Jeay S, Pianetti S, Kagan HM, et al. Lysyl oxidase inhibits ras-mediated transformation by preventing activation of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 2251-2263.
45. Grimsby JL, Lucero HA, Trackman PC, et al. Role of lysyl oxidase propeptide in secretion and enzyme activity. *J Cell Biochem* 2010; 111: 1231-1243.











