



Repositorio Institucional de la Universidad Autónoma de Madrid

<https://repositorio.uam.es>

Esta es la **versión de autor** del artículo publicado en:

This is an **author produced version** of a paper published in:

Clínica e Investigación en Arteriosclerosis 29.4 (2017): 157 – 165

DOI: <http://doi.org/10.1016/j.arteri.2017.01.004>

Copyright: © 2017 Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Sociedad Española de Arteriosclerosis

El acceso a la versión del editor puede requerir la suscripción del recurso
Access to the published version may require subscription

Manuscript Number: ARTERI-D-17-00001

Title: La sobre-expresión vascular de la lisil oxidasa altera la estructura de la matriz extracelular e induce estrés oxidativo. Vascular lysyl oxidase over-expression alters extracellular matrix structure and induces oxidative stress.

Article Type: Original

Keywords: Lisil oxidasa; colágeno; elastina; estrés oxidativo
Lysyl oxidase; collagen; elastin oxidative stress

Corresponding Author: Dr. Cristina Rodriguez,

Corresponding Author's Institution: Centro de Investigación
Cardiovascular (CSIC-ICCC), IIB-Sant Pau, Barcelona

First Author: Saray Varona

Order of Authors: Saray Varona; Ana B García-Redondo; José Martínez-González; Mercedes Salaices; Ana M Briones; Cristina Rodriguez

Abstract: Introducción: La lisil oxidasa (LOX) contribuye al ensamblaje de las fibras de colágeno y elastina de la matriz extracelular (MEC). Hemos determinado las consecuencias de la sobre-expresión vascular de LOX sobre la estructura de la MEC y su contribución al estrés oxidativo. Métodos: Los estudios se desarrollaron en ratones que sobre-expresan la LOX (Tg) específicamente en células musculares lisas vasculares (CMLV). Se realizaron análisis por PCR a tiempo real, tinción de rojo sirio, producción de H₂O₂ y actividad NADPH oxidasa. Se caracterizaron las fenestras de la lámina elástica interna mediante microscopía confocal. Resultados: Las CMLV de ratones transgénicos presentaron niveles de actividad LOX superiores a los de animales control. En consonancia, las células transgénicas depositaron más fibras de elastina organizada y sus sobrenadantes indujeron un mayor ensamblaje de colágeno en ensayos in vitro. El nivel de colágeno maduro fue superior en la pared vascular de ratones Tg, que presentaban un menor área de las fenestras y un aumento de la expresión de la Fibulina-5. La producción vascular de H₂O₂ y la actividad NADPH oxidasa fueron superiores en los ratones transgénicos. La incubación de CMLV con catalasa atenuó el incremento en la deposición de fibras de elastina madura inducido por la transgénesis de LOX. Conclusiones: La sobre-expresión de la LOX en CMLV se asocia a una alteración de la estructura vascular del colágeno y la elastina. La LOX podría constituir una nueva fuente de estrés oxidativo que participaría en la alteración estructural de la MEC y podría contribuir al remodelado vascular

Introduction: Lysyl oxidase (LOX) participates in collagen and elastin fiber assembly. We have analyzed the impact of vascular LOX over-expression on extracellular matrix (ECM) structure and its contribution to oxidative stress

Methods: Studies were developed in mice over-expressing LOX (Tg) specifically in smooth muscle cells (VSMC). Gene expression was assessed

by real-time PCR analysis. Sirius Red staining, H₂O₂ production and NADPH oxidase activity were analyzed in different vascular beds. The size and number of fenestra of the internal elastic lamina were determined by confocal microscopy.

Results: Lysyl oxidase activity was up-regulated in VSMC from transgenic mice compared with cells from control animals. In agreement, transgenic cells deposited more organized elastin fibers and their supernatants induced a stronger collagen assembly in in vitro assays. Vascular collagen cross-linking was also higher in Tg mice, which exhibited a decrease in the size of fenestrae and an enhanced expression of Fibulin-5. Interestingly, higher H₂O₂ production and NADPH oxidase activity was detected in the vascular wall from transgenic mice. The H₂O₂ scavenger catalase attenuated the stronger deposition of mature elastin fibers induced by LOX Transgenesis.

Conclusions: LOX over-expression in VSMC was associated with an altered structure of collagen and elastin fibers. LOX could constitute a novel source of oxidative stress that might participate in elastin disturbance and contribute to vascular remodelling.

Suggested Reviewers:

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

La sobre-expresión vascular de la lisil oxidasa altera la estructura de la matriz extracelular e induce estrés oxidativo.

Vascular lysyl oxidase over-expression alters extracellular matrix structure and induces oxidative stress

Los resultados presentados son fruto del desarrollo del proyecto titulado "Contribución de la lisil oxidasa (LOX) al estrés oxidativo, la rigidez vascular y la hipertensión arterial", galardonado con una BECA FEA/SEA 2016 para investigación básica.

1
2
3
4
5
6
7 **RESUMEN**
8

9 **Introducción:** La lisil oxidasa (LOX) contribuye al ensamblaje de las fibras de
10 colágeno y elastina de la matriz extracelular (MEC). Hemos determinado las
11 consecuencias de la sobre-expresión vascular de LOX sobre la estructura de la
12 MEC y su contribución al estrés oxidativo.
13
14

15
16 **Métodos:** Los estudios se desarrollaron en ratones que sobre-expresan la LOX
17 (Tg) específicamente en células musculares lisas vasculares (CMLV). Se
18 realizaron análisis por PCR a tiempo real, tinción de rojo sirio, producción de H₂O₂
19 y actividad NADPH oxidasa. Se caracterizaron las fenestras de la lámina elástica
20 interna mediante microscopía confocal.
21
22
23
24

25
26 **Resultados:** Las CMLV de ratones transgénicos presentaron niveles de actividad
27 LOX superiores a los de animales control. En consonancia, las células
28 transgénicas depositaron más fibras de elastina organizada y sus sobrenadantes
29 indujeron un mayor ensamblaje de colágeno en ensayos *in vitro*. El nivel de
30 colágeno maduro fue superior en la pared vascular de ratones Tg, que
31 presentaban un menor área de las fenestras y un aumento de la expresión de la
32 Fibulina-5. La producción vascular de H₂O₂ y la actividad NADPH oxidasa fueron
33 superiores en los ratones transgénicos. La incubación de CMLV con catalasa
34 atenuó el incremento en la deposición de fibras de elastina madura inducido por la
35 transgénesis de LOX.
36
37
38
39
40
41
42
43

44
45 **Conclusiones:** La sobre-expresión de la LOX en CMLV se asocia a una alteración
46 de la estructura vascular del colágeno y la elastina. La LOX podría constituir una
47 nueva fuente de estrés oxidativo que participaría en la alteración estructural de la
48 MEC y podría contribuir al remodelado vascular.
49
50
51

52 **Palabras clave:** Lisil oxidasa, colágeno, elastina, estrés oxidativo.
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6 **ABSTRACT**

7
8 **Introduction:** Lysyl oxidase (LOX) participates in collagen and elastin fiber
9 assembly. We have analyzed the impact of vascular LOX over-expression on
10 extracellular matrix (ECM) structure and its contribution to oxidative stress
11
12

13
14 **Methods:** Studies were developed in mice over-expressing LOX (Tg) specifically in
15 smooth muscle cells (VSMC). Gene expression was assessed by real-time PCR
16 analysis. Sirius Red staining, H₂O₂ production and NADPH oxidase activity were
17 analyzed in different vascular beds. The size and number of fenestra of the internal
18 elastic lamina were determined by confocal microscopy.
19
20
21
22

23
24 **Results:** Lysyl oxidase activity was up-regulated in VSMC from transgenic mice
25 compared with cells from control animals. In agreement, transgenic cells deposited
26 more organized elastin fibers and their supernatants induced a stronger collagen
27 assembly in *in vitro* assays. Vascular collagen cross-linking was also higher in Tg
28 mice, which exhibited a decrease in the size of fenestrae and an enhanced
29 expression of Fibulin-5. Interestingly, higher H₂O₂ production and NADPH oxidase
30 activity was detected in the vascular wall from transgenic mice. The H₂O₂
31 scavenger catalase attenuated the stronger deposition of mature elastin fibers
32 induced by LOX Transgenesis.
33
34
35
36
37
38
39

40
41 **Conclusions:** LOX over-expression in VSMC was associated with an altered
42 structure of collagen and elastin fibers. LOX could constitute a novel source of
43 oxidative stress that might participate in elastin disturbance and contribute to
44 vascular remodelling.
45
46
47

48
49
50 **Keywords:** Lysyl oxidase, collagen; elastin; oxidative stress.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

INTRODUCCIÓN

La lisil oxidasa (LOX) cataliza una de las etapas clave en la síntesis y estabilización de la matriz extracelular (MEC).^{1,2} Este enzima es una amino-oxidasa dependiente de cobre que participa en el ensamblaje covalente de las fibras de colágeno y elastina de la MEC. Concretamente, la LOX cataliza la deaminación oxidativa de residuos de lisina e hidroxilisina, lo que da lugar a la formación de peptidil semialdehídos altamente reactivos que condensan entre sí formando enlaces tanto intramoleculares como intermoleculares, una reacción que genera H₂O₂ como subproducto.¹

La actividad LOX condiciona las propiedades mecánicas y estructurales de los tejidos conectivos y su alteración se ha vinculado con múltiples procesos patológicos, entre ellos cáncer y enfermedades cardiovasculares.^{2,3} Estudios recientes sugieren que la actividad LOX y el mayor ensamblaje en las fibras de colágeno asociado, podrían jugar un papel fundamental en la rigidez vascular.⁴ En lo que respecta a la elastina, la alteración en su estructura determina la mecánica vascular tanto en arterias de gran calibre como en las de pequeño calibre,⁵⁻⁷ y contribuye, al menos en parte, al aumento de la rigidez vascular en la hipertensión,^{8,9} si bien existen menos evidencias del papel de la LOX en dicho proceso.

Sorprendentemente, además de su función meramente estructural, la LOX se ha implicado en el control de múltiples procesos celulares entre los que destacan la diferenciación celular, la migración, la transformación y la regulación de la expresión génica.^{1,2} Es interesante señalar que algunas de estas funciones biológicas, tales como el control de la migración celular y de la quimiotaxis de las células musculares lisas de la pared vascular (CMLV), se han vinculado con el aumento en la producción de H₂O₂ derivado de la actividad LOX.^{10,11} Sin embargo, no se ha establecido si la LOX podría contribuir al estrés oxidativo vascular ni su posible impacto sobre la estructura vascular. Nuestros resultados obtenidos en un

1
2
3
4 modelo de ratón transgénico que sobre-expresa la LOX específicamente en
5 CMLV muestran que la sobre-expresión de LOX se asocia a un mayor estrés
6 oxidativo en la pared vascular que contribuye a la alteración de la estructura de la
7 elastina lo que podría tener importantes repercusiones fisiopatológicas.
8
9

10 **MATERIAL Y MÉTODOS**

11 **Modelo animal**

12
13
14 Los estudios se realizaron en un modelo de ratón transgénico que sobre-expresa
15 la LOX en CMLV (Tg) en un fondo genético C57BL/6J.¹² Como controles se
16 incluyeron ratones C57BL/6J hermanos de camada de la misma edad (3 meses).
17 Los animales fueron mantenidos en un ambiente libre de patógenos bajo
18 condiciones estándar de iluminación (ciclos de 12 h de luz/oscuridad) y
19 temperatura (21±1 °C) en la Unidad de Experimentación Animal (CSIC-ICCC,
20 Barcelona, España) con acceso *ad libitum* a bebida y alimento durante todo el
21 procedimiento. La investigación fue realizada de acuerdo con los principios y las
22 directrices establecidas por la Sociedad de Americana de Fisiología para la
23 investigación animal, y todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité
24 Ético del Centro de Investigación Cardiovascular de Barcelona, de acuerdo con la
25 Política Española de Protección de Animales RD53/2013, que cumple con la
26 Directiva de la Unión Europea 2010/63/UE relativa a la protección de animales de
27 experimentación.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 Los animales se sacrificaron por inhalación de CO₂ y los distintos lechos
44 vasculares se aislaron, se limpiaron para eliminar el exceso de grasa y tejido
45 conectivo y se procesaron para los distintos análisis.
46
47

48 **Organización de la lámina elástica interna**

49
50 Se utilizaron segmentos de arterias mesentéricas de resistencia presurizados con
51 un miógrafo de presión (45 mm Hg) fijados con paraformadehído al 4%. La
52 organización de la elastina en la lámina elástica interna se estudió mediante
53 microscopía confocal de fluorescencia basada en las propiedades
54 autofluorescentes de la elastina (longitud de onda de excitación: 488 nm; longitud
55 de onda de emisión: 500-560 nm) tal y como se describió previamente.⁵ Los
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 experimentos se realizaron con un microscopio confocal Leica TCS SP2 (Leica
5 Microsistemas S.L.U., Barcelona, España). Se capturaron secciones ópticas
6 seriadas desde la adventicia a la luz vascular (distancia entre secciones en el eje
7 $z = 0,5 \mu\text{m}$) capturadas con un objetivo de inmersión en aceite x40 zoom 4. Se
8 capturaron un mínimo de dos series de imágenes de diferentes regiones en cada
9 segmento arterial. El análisis cuantitativo de la lámina elástica interna se realizó
10 con el software de análisis de imagen Metamorph (Molecular Devices, Sunnyvale,
11 CA, USA) como se describió anteriormente.⁵ De cada serie de imágenes se
12 reconstruyeron las proyecciones máximas individuales de la lámina elástica
13 interna y se determinó el área y el número de fenestras.
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 **Inmunohistoquímica**

24
25 Las arterias carótidas de los ratones se perfundieron con PBS, se fijaron en
26 paraformaldehído al 4% durante 24 h y se embebieron en parafina. Se prepararon
27 secciones de $5 \mu\text{m}$ de grosor con un micrótopo (Jung RM2055, Leica
28 Microsistemas S.L.U., Barcelona, España) que se desparafinaron y rehidrataron
29 en un gradiente de soluciones de etanol. Los portaobjetos se tiñeron con rojo
30 picrosirio y la refringencia se visualizó mediante microscopía de luz polarizada.¹³
31
32
33
34
35
36

37 **Determinación de la actividad NADPH oxidasa**

38
39 La actividad NAD(P)H oxidasa se determinó en homogenados vasculares
40 mediante un método quimioluminiscente con lucigenina. Los tejidos se
41 homogenizaron en un tampón de lisis (50 mM de KH_2PO_4 , 1 mM de ácido
42 tetraacético de etilen glicol y 150 mM de sacarosa, pH 7,4). La reacción se inició
43 con la adición de NAD(P)H (0,1 mM) a la suspensión que contenía la muestra,
44 lucigenina ($5 \mu\text{M}$) y tampón fosfato. La luminiscencia se midió en un luminómetro
45 de placa (Auto-Lumat LB 953, Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad,
46 Alemania). La lectura correspondiente al blanco del tampón se substrajo al valor
47 de cada lectura. La actividad NADPH oxidasa se normalizó por el contenido en
48 proteína y se expresó relativo a los animales control (WT).¹⁴
49
50
51
52
53
54
55
56
57

58 **Determinación de la producción de H_2O_2**

59
60 La producción de H_2O_2 se analizó en segmentos aórticos utilizando el compuesto
61
62
63
64
65

1
2
3
4 Amplex Red (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) como sustrato fluorogénico de
5 la peroxidasa de rábano (HRP). Concretamente, se añadió Amplex Red (100 μ M)
6 y HRP de tipo II (0,2 U/ml) al homogenado aórtico. Las lecturas de fluorescencia
7 se realizaron por triplicado en placas de 96 pocillos a una Ex/Em de 530/580 nm
8 utilizando 50 μ l de muestra. El nivel de H₂O₂ se extrapola de una curva patrón, se
9 normalizó por el contenido de proteína y se expresó en porcentaje respecto a los
10 animales control (WT).
11
12

13 **Cultivo celular**

14
15 Las CMLV de aorta murina se obtuvieron mediante una modificación de la técnica
16 de explantes tal y como se ha descrito previamente.¹⁵ Brevemente, la aorta se
17 abrió longitudinalmente, se eliminó la adventicia y el endotelio y la capa media se
18 dividió en fragmentos de 1-2 mm que se transfirieron a frascos de cultivo de 25
19 cm² que contenían 5 ml de medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*,
20 Gibco, Carlsbad, CA, USA) suplementado con un 10% de suero bovino fetal
21 (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel) y antibióticos (Gibco, Carlsbad,
22 CA, USA). Las CMLV migraron de los explantes al cabo de entre 2 y 3 semanas,
23 momento en el que se extrajeron los explantes y las células se tripsinizaron y se
24 subcultivaron de manera rutinaria. Las células se utilizaron entre los pases 3 a 6.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

38 **PCR a tiempo real**

39
40 El ARN total se aisló mediante UltraspecTM (Biotecx, Houston, TX, USA) y se
41 realizó una transcripción reversa mediante el kit *High Capacity cDNA Reverse*
42 *Transcription kit* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA,
43 USA) en presencia de hexámeros al azar. La cuantificación de los niveles de
44 ARNm se realizó usando el equipo *ABI PRISM 7900HT sequence detection*
45 *system* y oligonucleótidos y sondas específicos proporcionados por el sistema
46 *TaqManTM gene expression assays-on-demand* (Applied Biosystems, Thermo
47 Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) para la amplificación de la FBLN5
48 murina (Mm00488601_m1). La gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH;
49 Mm99999915_g1) se usó como control endógeno. Cada muestra se amplificó por
50 duplicado y los niveles relativos de ARNm se determinaron mediante el método de
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 $2^{-\Delta\Delta CT}$.
5
6

7 **Ensayo de polimerización de colágeno *in vitro***

8
9 Las CMLV de ratones WT y Tg se sembraron en placas de seis pocillos (150000
10 células/pocillo). Al cabo de 3 días se recogieron los sobrenadantes celulares y se
11 centrifugaron a 10000 x *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente. A
12 continuación los sobrenadantes se concentraron 4 veces mediante centrifugación
13 con filtros Amicon Ultra 10K (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). El colágeno
14 tipo I de cola de rata (150 μ l) se neutralizó y se añadió sobre placas con fondo de
15 vidrio (Willco Wells B. V., Amsterdam, Holanda) y se incubó durante 40 minutos a
16 37 °C hasta su gelificación. Entonces, se añadieron 400 μ l de sobrenadante
17 concentrado sobre la superficie del gel y se incubó durante 24 h a 37 °C. La matriz
18 de colágeno se visualizó mediante microscopía confocal de reflexión (Leica
19 DMIRE2) tal y como se describió previamente.¹⁶
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

30 **Actividad lisil oxidasa**

31
32 La actividad LOX se determinó mediante un método fluorescente tal y como se
33 describió previamente.¹⁷ Las CMLV se sembraron a una densidad de 150000
34 células/pocillo en placas de 6 pocillos y al cabo de 48 h el medio se reemplazó por
35 medio RPMI sin Rojo Fenol (Gibco, Carlsbad, CA, USA), suero, antibióticos ni
36 glutamina. Tras 24 h la actividad LOX se cuantificó en el sobrenadante celular.
37 Para ello, se incubó una alícuota de medio (50 μ l) en presencia y ausencia de β -
38 aminopropionitrilo (BAPN; 500 μ M) a 37 °C durante 30 min con 1 U/ml de HRP, 10
39 μ M de Amplex Red (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) y 10 mM de 1,5-
40 diaminopentano en 1,2 M de urea y borato sódico 0,05 M a pH 8,2. La reacción se
41 detuvo en hielo y se determinó la diferencia en intensidad de fluorescencia (λ de
42 excitación: 563 nm; λ de emisión: 587 nm) entre muestras con y sin BAPN.¹⁷
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

53 **Inmunocitoquímica**

54
55 Las CMLV de ratones WT y Tg se sembraron en placas μ -Dishes de 35 mm de
56 diámetro (Ibidi, Planegg/Martinsried, Alemania) en las que se mantuvieron en
57 crecimiento en medio completo durante 10 días. El medio se cambió cada dos
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 días. En algunos experimentos se adicionó catalasa (500 U/mL). A continuación
5 las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y, sin permeabilización previa, se
6 incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo contra la Elastina (Abcam,
7 Cambridge, UK; ab21607) durante toda la noche. Tras varios lavados exhaustivos,
8 las placas se incubaron durante 1 h con un anticuerpo secundario conjugado con
9 fluorescencia (Alexa Fluor 488 contra conejo generado en cabra; Thermo Fisher
10 Scientific Inc, Waltham, MA, USA). Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342
11 (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA).¹⁸ Las imágenes de
12 fluorescencia se captaron con un microscopio confocal Leica DMIRE2 (Leica
13 Microsistemas S.L.U., Barcelona, España). El análisis cuantitativo se realizó
14 usando el software Image J.

25 **Análisis estadísticos**

26
27 Los resultados se muestran como media \pm SEM. Las diferencias estadísticamente
28 significativas se establecieron mediante *t*-test o ANOVA seguido del test de
29 Bonferroni utilizando el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc, La
30 Jolla, CA, USA). Se consideraron significativas diferencias con $p < 0.05$.

35 **RESULTADOS**

37 **Los ratones transgénicos para la LOX presentan una mayor actividad LOX y** 38 **alteraciones en ensamblaje del colágeno vascular**

39
40 Las CMLV de la aorta de ratones transgénicos mostraron niveles de actividad lisil
41 oxidasa aproximadamente 4 veces superiores a los de las células aisladas de
42 ratones control (WT; Figura 1A). En concordancia, los sobrenadantes de las
43 CMLV de animales transgénicos indujeron un mayor ensamblaje de las fibras de
44 colágeno cuando se incubaron con colágeno tipo I soluble (Figura 1B). Asimismo,
45 tras la tinción con Rojo Sirio y la visualización con luz polarizada, se observó un
46 incremento del colágeno maduro en la capa media de la carótida de dichos
47 animales (Figura 1C). Estos resultados indican que la elevada actividad LOX de
48 las CMLV de los animales transgénicos promovería un mayor ensamblaje del
49 colágeno en la pared vascular.

60 **Los ratones Tg muestran alteraciones en la estructura de la elastina**

1
2
3
4 Las CMLV de los ratones transgénicos para la LOX depositaron fibras de elastina
5 más gruesas y estructuralmente organizadas, indicativo de un alto grado de
6 ensamblaje que las aisladas de ratones WT (Figura 2A). Asimismo, la
7 transgenes de LOX se asoció a una disminución en el tamaño (Figura 2B) y en
8 el número de las fenestras de la lámina elástica interna (WT: 3804 ± 258 ; Tg:
9 2550 ± 170 , n=6; $p < 0.01$ vs. WT).

15 **La sobreexpresión vascular de la LOX induce la expresión de la FBLN5**

16
17
18 A continuación analizamos si la transgenes de LOX podía afectar a la expresión
19 de proteínas elastogénicas como la FBLN5. Como se observa en la Figura 3A, la
20 sobre-expresión de LOX en CMLV incrementó la expresión de la FBLN5 en
21 aproximadamente 2,7 veces en comparación con células de ratones WT.
22 Análogamente, se detectó un incremento significativo del nivel de mRNA de la
23 FBLN5 en la aorta de los ratones transgénicos (Figura 3B).

29 **La transgenes de LOX induce estrés oxidativo en la pared vascular**

30
31
32 Puesto que la actividad LOX da lugar a la producción de H_2O_2 como subproducto,
33 analizamos sus niveles en la aorta de los ratones transgénicos. Puede observarse
34 que la producción aórtica de H_2O_2 se incrementó en los animales transgénicos
35 para la LOX (Figura 4A). De forma similar, la sobreexpresión de LOX indujo un
36 aumento significativo de la actividad NADPH oxidasa, importante enzima
37 productora de anión superóxido (Figura 4B).

43 **La catalasa previene la alteración en la estructura de la elastina.**

44
45 En vista de los resultados descritos anteriormente quisimos evaluar si el estrés
46 oxidativo inducido por la transgenes de LOX podía participar en la alteración en
47 la estructura de la elastina observada en este modelo. Para ello, analizamos el
48 impacto de la incubación con catalasa, un enzima detoxificador del H_2O_2 , sobre la
49 deposición de elastina en CMLV. Como se observa en la Figura 5 la incubación
50 con catalasa atenuó parcialmente la mayor organización de las fibras de elastina
51 depositada por las CMLV procedentes de animales transgénicos.
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

DISCUSIÓN

En los últimos años ha quedado patente la importancia de la LOX en el desarrollo de múltiples patologías y su implicación en el control de procesos clave en la fisiopatología cardiovascular.^{1,2,4,12,19-21} El carácter multifuncional de este enzima junto al descubrimiento de la actividad biológica del propéptido de la LOX (que se libera durante la maduración del enzima) y la existencia de formas intracelulares activas localizadas incluso en el núcleo celular han incrementado el interés por este enzima.^{1,2} Los estudios en este ámbito se han visto beneficiados por el desarrollo de un modelo animal transgénico que sobre-expresa la LOX específicamente en CMLV. Este modelo nos ha permitido demostrar que la LOX juega un papel fundamental en el remodelado vascular ya que limita la proliferación de las CMLV.¹² Se trata del único modelo animal modificado genéticamente disponible actualmente para mejorar nuestro conocimiento sobre la biología de este enzima, ya que los animales deficientes en LOX no son viables.²²

Las CMLV aisladas de los animales transgénicos para la LOX tienen una alta producción de proteína LOX bioactiva¹² y en consecuencia presentan niveles elevados de actividad LOX, lo que conlleva un incremento en la capacidad de los sobrenadantes de estas células para polimerizar el colágeno, uno de los principales sustratos de este enzima. En concordancia, los animales transgénicos muestran también un mayor grado de ensamblaje de las fibras de colágeno en la pared vascular.

Análogamente, las fibras de elastina depositadas por las CMLV aisladas de los animales transgénicos muestran un mayor grado de ensamblaje que se traduce en fibras de mayor grosor. Puesto que la elastogénesis es un proceso complejo que involucra múltiples etapas, el incremento en la organización de las fibras de elastina observado en los animales transgénicos podría estar asociado no sólo a la elevada actividad LOX, sino a otros efectos derivados de la sobre-expresión de este enzima, entre ellos el aumento en la expresión vascular de la FBLN5

1
2
3
4 observada en este estudio. La FBLN5 es una glicoproteína que regula la
5 activación proteolítica de la LOX y que es esencial en el mantenimiento de las
6 fibras elásticas y en el remodelado vascular.^{23,24} Además, la FBLN5 regula la
7 señalización mediada por integrinas y controla la adhesión, migración,
8 proliferación y supervivencia de las células vasculares,^{18,25,26} por lo que su
9 inducción en respuesta a la sobre-expresión de LOX podría afectar
10 profundamente a la homeostasis vascular. Asimismo, el análisis de la estructura
11 de la elastina de la lámina elástica interna en los ratones transgénicos reveló una
12 reducción en el número y el tamaño de las fenestras. En estudios previos, hemos
13 demostrado que la disminución en el área de las fenestras de la lámina elástica
14 interna explica, al menos en parte, el aumento de la rigidez vascular en modelos
15 animales de hipertensión.^{5,27-29} y se ha sugerido que la reducción en el tamaño de
16 las fenestras observada en animales hipertensos podría conllevar alteraciones
17 significativas en la comunicación mioendotelial y por tanto afectar de manera
18 crítica a la función vascular.³⁰ Por tanto, la alteración en el número y el tamaño de
19 las fenestras inducida por la transgénesis de LOX podría repercutir en una mayor
20 rigidez y en una alteración de la función vascular. Es evidente sin embargo, que
21 esta hipótesis deberá ser confirmada en un futuro y que se requerirán nuevos
22 estudios para esclarecer las consecuencias fisiopatológicas de este efecto.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 La LOX cataliza la transformación de un grupo amino por un grupo aldehído en
42 residuos peptidil lisina de las fibras de colágeno y elastina, lo que da lugar a la
43 generación de H₂O₂ como subproducto.^{1,2} Los animales transgénicos para la LOX
44 muestran niveles elevados de H₂O₂ en la pared vascular, fruto muy
45 probablemente de la mayor actividad LOX que presentan las CMLV de estos
46 animales. Estudios recientes en corazón de rata en desarrollo han identificado a la
47 LOX como una fuente significativa de H₂O₂ en la pared vascular.³¹ Nuestros
48 resultados amplían estas observaciones y ratifican la contribución de LOX a la
49 producción de H₂O₂ vascular. Asimismo, la transgenesis de LOX se asocia con un
50 incremento en la actividad NADPH oxidasa vascular. El mecanismo que subyace
51 a este efecto es en este momento desconocido. Sin embargo, cabe destacar que
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 el H₂O₂ es una especie reactiva de oxígeno (ROS) estable y permeable que ejerce
5
6 múltiples funciones en la pared vascular y que entre otras respuestas puede
7
8 afectar a la producción de estrés oxidativo procedente de otras fuentes de ROS,
9
10 entre ellas la propia NADPH oxidasa.^{32,33} El incremento en la producción de H₂O₂
11
12 derivado de la actividad LOX está implicado la capacidad de este enzima para
13
14 inducir la migración celular y la quimiotaxis de CMLV entre otros efectos.^{10,11,34}
15
16 Los resultados obtenidos en CMLV cultivadas en presencia de catalasa sugieren
17
18 precisamente que los elevados niveles de H₂O₂ producidos por las CMLV que
19
20 sobre-expresan la LOX contribuyen, al menos en parte, a la mayor deposición de
21
22 fibras de elastina madura detectada en estas células. De hecho, se ha descrito
23
24 que el H₂O₂ induce la deposición de diferentes componentes microfibrilares, lo
25
26 que podría contribuir también a la alteración en la estructura de la MEC observada
27
28 en nuestro modelo.³⁵

29
30 En resumen nuestros hallazgos demuestran que la sobre-expresión de la LOX se
31
32 asocia a un incremento del estrés oxidativo vascular y sugieren que este
33
34 mecanismo contribuiría, al menos en parte, a la alteración de la estructura de la
35
36 elastina inducida por la activación de este enzima. Puesto que el estrés oxidativo
37
38 juega un papel fundamental en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares,
39
40 estos resultados sugieren que el control de la actividad LOX podría ser una
41
42 estrategia útil para limitar la producción de ROS en patologías caracterizadas por
43
44 un incremento de la actividad/expresión de la LOX.

45 **RESPONSABILIDADES ÉTICAS**

46
47
48 **Protección de personas y animales:** Los autores declaran que la investigación
49
50 se realizó conforme a las normas éticas del Comité de Experimentación Clínica de
51
52 la institución, de acuerdo con la Declaración de Helsinki .

53 **FINANCIACIÓN**

54
55
56 Este estudio se ha financiado por la Fundación Española de Aterosclerosis, Beca
57
58 SEA/FEA de Investigación básica 2016 y por el Ministerio de Economía y
59
60 Competitividad (MINECO)-Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) [proyectos
61
62
63
64
65

1
2
3
4 PI15/01016, PI13/01488, SAF2012-36400; SAF2015-64767-R]. El CIBER de
5 Enfermedades Cardiovasculares es una iniciativa del ISCIII. AMB recibió una
6 ayuda del programa Ramón y Cajal (RYC-2010-06473). El estudio ha sido co-
7 financiado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), una manera de
8 hacer Europa.
9

10 **AUTORÍA**

11
12 CR y AMB diseñaron el estudio, llevaron a cabo la interpretación de los datos y
13 escribieron el manuscrito. SV y ABGR realizaron los experimentos y el análisis de
14 los datos y participaron en la elaboración del borrador del manuscrito. JMG y MS
15 participaron en el análisis de los resultados y la escritura del manuscrito. Todos los
16 autores aprobaron la versión final del manuscrito.
17

18 **CONFLICTO DE INTERÉS**

19 Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.
20

21 **AGRADECIMIENTOS**

22 Los autores agradecen el apoyo técnico de Laura García Redondo y Silvia Aguiló.
23

24 **REFERENCES**

- 25 1. Rodríguez C, Rodríguez-Sinovas A, Martínez-González J. Lysyl oxidase as a
26 potential therapeutic target. *Drug News Perspect.* 2008;21:218-24.
- 27 2. Rodríguez C, Martínez-González J, Raposo B, Alcudia JF, Guadall A, Badimon
28 L. Regulation of lysyl oxidase in vascular cells: lysyl oxidase as a new player in
29 cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res.* 2008;79:7-13.
- 30 3. Cox TR, Gartland A, Eler JT. Lysyl Oxidase, a Targetable Secreted Molecule
31 Involved in Cancer Metastasis. *Cancer Res.* 2016;76:188-92.
- 32 4. Ebersson LS, Sanchez PA, Majeed BA, Tawinwung S, Secomb TW, Larson DF.
33 Effect of lysyl oxidase inhibition on angiotensin II-induced arterial hypertension,
34 remodeling, and stiffness. *PLoS One.* 2015;10:e0124013.
- 35 5. Briones AM, González JM, Somoza B, Giraldo J, Daly CJ, Vila E, et al. Role of
36 elastin in spontaneously hypertensive rat small mesenteric artery remodelling.
37 *J Physiol.* 2003;552:185-95.

- 1
2
3
4 6. Clifford PS, Ella SR, Stupica AJ, Nourian Z, Li M, Martinez-Lemus LA, et al.
5 Spatial distribution and mechanical function of elastin in resistance arteries: a
6 role in bearing longitudinal stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:
7 2889-96.
8
9
- 10 7. Wagenseil JE, Mecham RP. Elastin in large artery stiffness and hypertension.
11 *J Cardiovasc Transl Res.* 2012;5:264-73.
12
13
- 14 8. Arribas SM, Hinek A, González MC. Elastic fibres and vascular structure in
15 hypertension. *Pharmacol Ther.* 2006;111:771-91.
16
17
- 18 9. Greenwald SE. Ageing of the conduit arteries. *J Pathol.* 2007;211:157-72.
19
20
- 21 10. Li W, Liu G, Chou IN, Kagan HM. Hydrogen peroxide-mediated, lysyl oxidase-
22 dependent chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *J Cell Biochem.*
23 2000;78:550-57.
24
- 25 11. Payne SL, Fogelgren B, Hess AR, Seftor EA, Wiley EL, Fong SF, et al. Lysyl
26 oxidase regulates breast cancer cell migration and adhesion through a
27 hydrogen peroxide-mediated mechanism. *Cancer Res.* 2005;65:11429-36.
28
29
- 30 12. Orriols M, Guadall A, Galán M, Martí-Pàmies I, Varona S, Rodríguez-Calvo R,
31 Briones AM, Navarro MA, de Diego A, Osada J, Martínez-González J and
32 Rodríguez C. Lysyl oxidase (LOX) in vascular remodelling. Insight from a new
33 animal model. *Thromb Haemost.* 2014;112: 812-24.
34
35
- 36 13. Pickup MW, Laklai H, Acerbi I, Owens P, Gorska AE, Chytil A, et al. Stromally
37 derived lysyl oxidase promotes metastasis of transforming growth factor- β -
38 deficient mouse mammary carcinomas. *Cancer Res.* 2013;73:5336-46.
39
40
- 41 14. Martínez-Revelles S, Avendaño MS, García-Redondo AB, Alvarez Y, Aguado
42 A, Pérez-Girón JV, et al. Reciprocal relationship between reactive oxygen
43 species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension.
44 *Antioxid Redox Signal.* 2013;18:51-65.
45
46
- 47 15. Rodríguez-Calvo R, Guadall A, Calvayrac O, Navarro MA, Alonso J, Ferrán B,
48 et al. Over-expression of neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1)
49 exacerbates neointimal hyperplasia after vascular injury. *Hum Mol Genet.*
50 2013;22:1949-59.
51
52
- 53 16. Wong CC, Gilkes DM, Zhang H, Chen J, Wei H, Chaturvedi P, et al. Hypoxia-
54 inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche
55 formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:16369-74.
56
57
- 58 17. Rodríguez C, Alcudia JF, Martínez-González J, Guadall A, Raposo B,
59 Sánchez-Gómez S et al. Statins normalize vascular lysyl oxidase down-
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4 regulation induced by proatherogenic risk factors. *Cardiovasc Res.* 2009;83:
5 595-603.
6
7
8 18. Guadall A, Orriols M, Rodríguez-Calvo R, Calvayrac O, Crespo J, Aledo R, et
9 al. Fibulin-5 is up-regulated by hypoxia in endothelial cells through a hypoxia-
10 inducible factor-1 (HIF-1 α)-dependent mechanism. *J Biol Chem.*
11 2011;286:7093-103.
12
13
14 19. Miana M, Galán M, Martínez-Martínez E, Varona S, Jurado-López R, Bausa-
15 Miranda B, et al. The lysyl oxidase inhibitor β -aminopropionitrile reduces body
16 weight gain and improves the metabolic profile in diet-induced obesity in rats.
17 *Dis Model Mech.* 2015;8:543-51.
18
19
20 20. Matsuura S, Mi R, Koupenova M, Eliades A, Patterson S, Toselli P, et al. Lysyl
21 oxidase is associated with increased thrombosis and platelet reactivity. *Blood.*
22 2016;127:1493-501.
23
24
25 21. Rodríguez C, Raposo B, Martínez-González J, Casaní L, Badimon L. Low
26 density lipoproteins downregulate lysyl oxidase in vascular endothelial cells
27 and the arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1409-14.
28
29
30 22. Mäki JM, Räsänen J, Tikkanen H, Sormunen R, Mäkikallio K, Kivirikko KI et al.
31 Inactivation of the lysyl oxidase gene *Lox* leads to aortic aneurysms,
32 cardiovascular dysfunction, and perinatal death in mice. *Circulation.* 2002;106:
33 2503-09.
34
35
36 23. Choi J, Bergdahl A, Zheng Q, Starcher B, Yanagisawa H, Davis EC. Analysis
37 of dermal elastic fibers in the absence of *FBLN5* reveals potential roles for
38 *FBLN5* in elastic fiber assembly. *Matrix Biol.* 2009;28:211-20.
39
40
41 24. Nakamura T, Lozano PR, Ikeda Y, Iwanaga Y, Hinek A, Minamisawa S, et al.
42 *FBLN5/DANCE* is essential for elastogenesis in vivo. *Nature.* 2002;415:171-5.
43
44
45 25. Yanagisawa H, Schluterman MK, Brekken RA. Fibulin-5, an integrin-binding
46 matricellular protein: its function in development and disease. *J Cell Commun*
47 *Signal.* 2009;3:337-47.
48
49
50 26. Spencer JA, Hacker SL, Davis EC, Mecham RP, Knutsen RH, Li DY, et al.
51 Altered vascular remodeling in fibulin-5-deficient mice reveals a role of fibulin-5
52 in smooth muscle cell proliferation proliferation and migration *Proc Natl Acad*
53 *Sci U S A.* 2005;102:2946-51.
54
55
56 27. Arribas SM, Briones AM, Bellingham C, González MC, Salaiques M, Liu K, et al.
57 Heightened aberrant deposition of hard-wearing elastin in conduit arteries of
58 prehypertensive SHR is associated with increased stiffness and inward
59 remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295:H2299-307.
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
28. González JM, Briones AM, Starcher B, Conde MV, Somoza B, Daly C, Vila E, McGrath I, González MC, Arribas SM. Influence of elastin on rat small artery mechanical properties. *Exp Physiol*. 2005;90:463-8.
 29. González JM, Briones AM, Somoza B, Daly CJ, Vila E, Starcher B, McGrath JC, González MC and Arribas SM. Postnatal alterations in elastic fiber organization precede resistance artery narrowing in SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291:H804-12.
 30. McGrath JC, Deighan C, Briones AM, Shafaroudi MM, McBride M, Adler J, et al. New aspects of vascular remodelling: the involvement of all vascular cell types. *Exp Physiol*. 2005;90:469-75.
 31. Wilhelm J, Ošťádalová I, Vytášek R, Vajner L. Generation of hydrogen peroxide in the developing rat heart: the role of elastin metabolism. *Mol Cell Biochem*. 2011;358:215-20.
 32. García-Redondo AB, Briones AM, Martínez-Revelles S, Palao T, Vila L, Alonso MJ et al. c-Src, ERK1/2 and Rho kinase mediate hydrogen peroxide-induced vascular contraction in hypertension: role of TXA2, NAD(P)H oxidase and mitochondria. *J Hypertens*. 2015;33:77-87.
 33. Daiber A. Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 2010;1797:897–906.
 34. Postovit LM, Abbott DE, Payne SL, Wheaton WW, Margaryan NV, Sullivan R, et al. Hypoxia/reoxygenation: a dynamic regulator of lysyl oxidase-facilitated breast cancer migration. *J Cell Biochem*. 2008;103:1369-78.
 35. Zenkel M, Krysta A, Pasutto F, Juenemann A, Kruse FE, Schlötzer-Schrehardt U. Regulation of lysyl oxidase-like 1 (LOXL1) and elastin-related genes by pathogenic factors associated with pseudoexfoliation syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:8488-95.

1
2
3
4
5
6
7
8
9 **PIES DE FIGURAS**

10 **Figura 1. La transgenesia de LOX incrementa la actividad lisil oxidasa e**
11 **induce el ensamblaje de las fibras de colágeno.** A) Actividad LOX evaluada en
12 el sobrenadante de CMLV procedentes de ratones transgénicos para la LOX (Tg)
13 y animales control (WT). Los resultados se expresan como media \pm SEM (*,
14 $p < 0.001$ vs. WT). B) Los sobrenadantes de CMLV procedentes de ratones Tg y
15 WT se adicionaron sobre geles de colágeno de tipo I y se incubaron a 37 °C
16 durante 24 h. Se muestra una imagen representativa de la visualización por
17 microscopía confocal de reflexión de dichos geles. Las imágenes corresponden a
18 la máxima proyección de una serie en z (18 secciones). Barra: 20 μ m. C) Imagen
19 representativa de la tinción con Rojo Sirio visualizada bajo luz polarizada de
20 arterias carótidas procedentes de dichos animales. Las puntas de flecha indican
21 regiones refringentes en rojo correspondientes a fibras de colágeno gruesas y
22 compactas (i.e. colágeno maduro).
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

36 **Figura 2. La transgénesis de LOX altera la estructura de la elastina.** A)
37 Tinción de elastina (en verde) en CMLV no permeabilizadas aisladas de ratones
38 control (WT) y transgénicos para la LOX (Tg). Los núcleos se tiñeron con Hoechst
39 33342 (azul). Barra: 20 μ m. B) Proyecciones máximas de la lámina elástica
40 interna de arterias mesentéricas procedentes de los animales indicados en A. Las
41 proyecciones se obtuvieron a partir de secciones ópticas seriadas capturadas con
42 un microscopio confocal de fluorescencia (objetivo de inmersión en aceite x40
43 zoom 4). Tamaño de imagen 93,75x93,75 μ m). Los resultados se expresan como
44 media \pm SEM (n=4-10; *, $p < 0.001$ vs. WT).
45
46
47
48
49
50
51
52

53 **Figura 3. La sobre-expresión vascular de la LOX incrementa la expresión de**
54 **la FBLN5.** Nivel de mRNA de la FBLN5 evaluado mediante PCR a tiempo real en
55 CMLV (A) y aorta (B) de ratones control (WT) y transgénicos para la LOX (Tg).
56 Los resultados se muestran como media \pm SEM. (n=4-7*, $p < 0.05$ vs. WT).
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 **Figura 4. La LOX es una fuente de estrés oxidativo vascular.** A) Nivel de H₂O₂
5 (A) y actividad NADPH oxidasa (B) evaluados en la aorta de ratones control (WT y
6 transgénicos para la LOX (Tg). Los resultados se expresan como media ± SEM
7 (n=4-10; *, *p*<0.05 vs. WT).
8
9

10
11 **Figura 5. La producción de H₂O₂ participa en la alteración de la estructura de**
12 **la elastina inducida por la sobre-expresión de LOX.** Las CMLV procedentes de
13 ratones control (WT) y transgénicos para la LOX (Tg) se incubaron en presencia o
14 ausencia de catalasa (Cat) durante 10 días. Se muestra la tinción de elastina (en
15 verde) en CMLV no permeabilizadas. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342
16 (azul). Barra: 20 μm. Los resultados se muestran como media ± SEM (n=6-10; *,
17 *p*<0.05 vs. WT; #, *p*<0.05 vs. Tg).
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

FIGURA 1

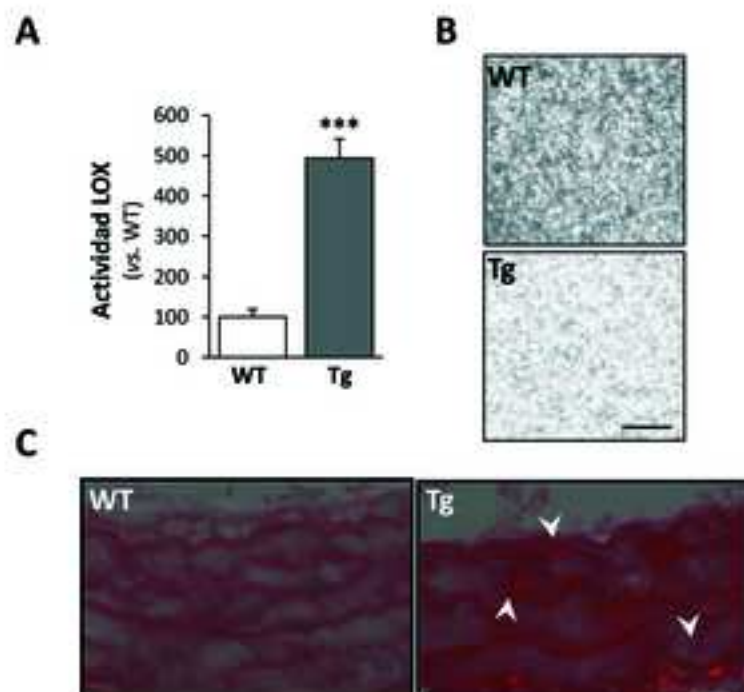
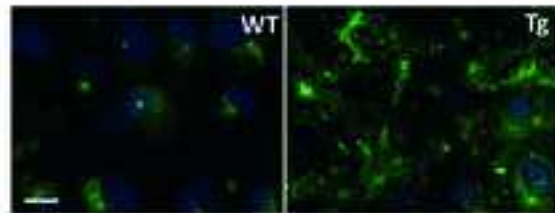


FIGURA 2

A



B

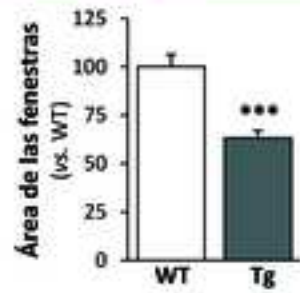
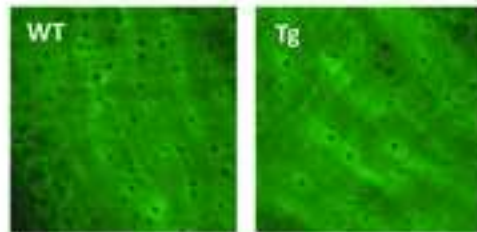


FIGURA 3

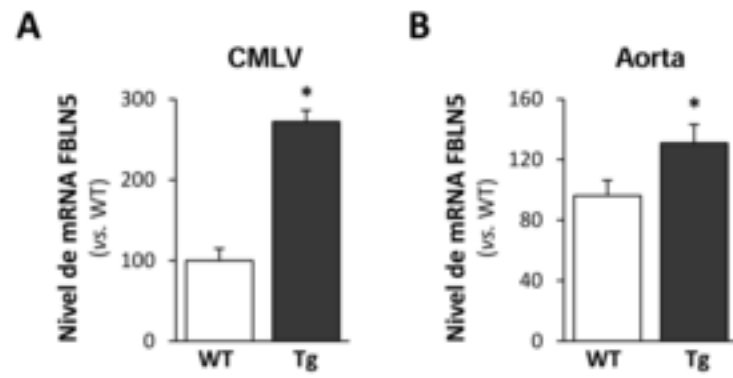


FIGURA 4

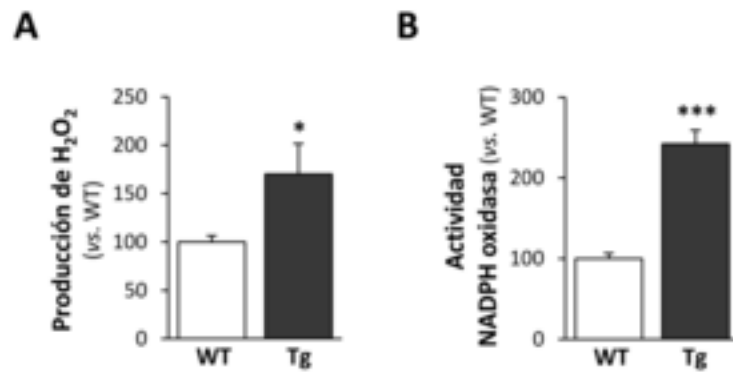


FIGURA 5

