

La hipoxia induce la expresión de la lisil oxidasa (LOX) en células endoteliales

Javier F. Alcudia, Anna Guadall, Maurizio Gentile, Lina Badimon, José Martínez-González y Cristina Rodríguez

Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICC). Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. España.

Introducción. La hipoxia participa en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares por la regulación coordinada de múltiples genes, incluidos aquellos implicados en la síntesis/reparación de la matriz extracelular (MEC). La lisil oxidasa (LOX), enzima implicada en la maduración de la MEC, parece tener un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis del endotelio. Nuestro objetivo fue determinar si la hipoxia modula la expresión de la LOX en células endoteliales.

Métodos. La expresión de LOX en células endoteliales bovinas de aorta (BAEC) y humanas de vena de cordón umbilical (HUVEC) se determinó mediante PCR a tiempo real. La actividad enzimática de LOX se analizó mediante un método fluorimétrico de alta sensibilidad y la actividad transcripcional de LOX, mediante estudios de transfección transitoria.

Resultados. La hipoxia (1% de O₂) incrementó la expresión de LOX en células BAEC y HUVEC (aproximadamente, 3 veces) en condiciones en que

este estímulo indujo los valores del factor inducible por hipoxia-1 α (HIF-1 α), la expresión de VEGF y la formación de neovasos. Este efecto se asoció a un aumento en la actividad enzimática LOX.

Análogamente, la incubación de células endoteliales con dimetil oxal glicina, inhibidor de prolil hidroxilasas, incrementó la concentración de ARNm de LOX. La inhibición de la transcripción con 5,6-diclorobencimidazol previno este efecto, lo que indica la implicación de un mecanismo transcripcional. Mediante estudios de transfección transitoria determinamos que tanto la hipoxia como la sobreexpresión de HIF-1 α incrementa la actividad del promotor de LOX de forma similar.

Conclusiones. La hipoxia induce la expresión y la actividad de LOX en células endoteliales por un mecanismo transcripcional en el que estaría implicado HIF-1.

Palabras clave:

Hipoxia. Células endoteliales. Lisil oxidasa.

Este estudio ha sido financiado por la Fundación Española de Aterosclerosis, Beca SEA/FEA de Investigación básica 2007, el proyecto FIS PI061480 y la Red Temática de Investigación Cardiovascular (RECAVA; RD/06/0014/0027) del Ministerio de Sanidad y Consumo-Instituto de Salud Carlos III, y el proyecto SAF2006-07378 del Ministerio de Educación y Ciencia.

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Correspondencia: Dra. C. Rodríguez.
Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC). Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
Sant Antoni M. Claret, 167. 08025 Barcelona. España.
Correo electrónico: crodriguez@csic-iccc.org

Recibido el 15-12-2008 y aceptado el 15-9-2009.

HYPOXIA INDUCES LYSYL OXIDASE (LOX) EXPRESSION IN ENDOTHELIAL CELLS

Introduction. Hypoxia actively participates in the pathogenesis of cardiovascular diseases through the coordinate regulation of several genes including those involved in extracellular matrix (ECM) synthesis/repair. Lysyl oxidase (LOX) is an enzyme involved in the maturation of ECM that seems to play a key role in the maintenance of endothelial homeostasis. Our aim was to determine if hypoxia could modulate endothelial LOX expression.

Methods. LOX expression in bovine aortic endothelial cells (BAEC) and human umbilical

cord vein endothelial cells (HUVEC) was assessed by real time PCR. LOX activity was evaluated by a fluorimetric method and LOX transcriptional activity by means of transient transfection studies.

Results. Hypoxia (1% O₂) increased LOX expression in both BAEC and HUVEC in conditions in which HIF-1 α levels, VEGF expression and neovessel formation were induced. We observed that this effect was associated to a significant increase in LOX enzymatic activity. Similarly, stimulation of endothelial cells with dimethyl-oxal-glycine, an inhibitor of prolyl hydroxylases, augmented mRNA LOX levels. Transcription inhibition with 5,6-dichlorobenzimidazole prevented this effect, suggesting the involvement of a transcriptional mechanism. In agreement, transient transfection studies demonstrated that both hypoxia and HIF-1 α over-expression induced LOX transcriptional activity to a similar extent.

Conclusions. Hypoxia induces LOX expression and activity in endothelial cells through an HIF-1-dependent transcriptional mechanism.

Key words:

Hypoxia. Endothelial cells. Lysyl oxidase.

Introducción

La lisil oxidasa (LOX) es una aminooxidasa dependiente de cobre que inicia el ensamblaje covalente de las fibras de colágeno y elastina de la matriz extracelular (MEC). Este enzima cataliza la desaminación oxidativa de residuos de lisina e hidroxilisina dando lugar a la formación de peptidil semialdehídos altamente reactivos que condensan entre sí formando enlaces tanto intramoleculares como intermoleculares¹⁻³. De este modo, la actividad de LOX determina las propiedades mecánicas de la MEC y asegura su integridad, estabilidad y correcto funcionamiento. La LOX se sintetiza en forma de proenzima que, secretada al espacio extracelular, se proteoliza y libera el propéptido de la enzima y la forma madura y catalíticamente activa³.

La generación de animales deficientes en LOX ha revelado su papel clave en el desarrollo y la funcionalidad del sistema cardiovascular. Las graves alteraciones vasculares y la mortalidad perinatal de estos animales indican que LOX tendría un papel único y clave en el mantenimiento de la homeostasis vascular⁴. En este sentido, los análisis inmunohistoquímicos muestran una expresión muy prominente de la LOX en el endotelio vascular⁵. De

hecho, nuestros estudios previos indican que la inhibición de la actividad/expresión de la LOX estaría relacionada con la disfunción endotelial desencadenada por factores de riesgo ateroesclerótico y por citocinas proinflamatorias, lo que indica la implicación de esta enzima en la fisiopatología de la enfermedad ateroesclerótica⁶⁻⁹.

La progresión de la lesión ateroesclerótica lleva implícita la generación de regiones de hipoxia intraplaca^{10,11} que promueven una respuesta adaptativa que implica la regulación de múltiples procesos, incluidas la angiogénesis, la transición epitelio-mesenchimal (EMT), la proliferación celular y la apoptosis, entre otros^{12,13}. En esta respuesta adaptativa el factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1) es causal de la regulación coordinada de múltiples genes, entre los que se incluyen los implicados en la síntesis/degradación de la MEC¹²⁻¹⁴. En este trabajo hemos analizado la regulación de la LOX por hipoxia en células endoteliales y hemos caracterizado la implicación del factor HIF-1 en este fenómeno.

Material y métodos

Cultivo celular

Las células endoteliales de aorta bovina (BAEC) se obtuvieron a partir de animales adultos normolipémicos mediante digestión con colagenasa, tal y como se describió previamente¹⁵. Las células se cultivaron en medio M199 (GIBCO), suplementado con el 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FCS) (Biological Industries), antibióticos (0,1 mg/ml de estreptomycin y 100 U/ml de penicilina G) y 2 mmol/l de L-glutamina. Las células endoteliales humanas de vena de cordón umbilical (HUVEC) se cultivaron en medio M199 (Biological Industries) suplementado con 20 mmol de Hepes (pH, 7,4), el 20 % de FCS, 1 mmol de piruvato sódico (Biological Industries), 30 μ g/ml de suplemento de crecimiento para células endoteliales (ECGS) (Upstate Reactiva), 100 μ g/ml de heparina (SIGMA), antibióticos y glutamina. Las células se usaron entre los pases 3 y 5. Cuando las células alcanzaban un 80% de confluencia (aproximadamente, 48 h), se reemplazaba el medio de cultivo y las células se mantenían en condiciones de normoxia (el 21% de O₂, el 5% de CO₂ y el 95% de humedad) o se sometían a hipoxia (el 1% de O₂, el 5% de CO₂ y equilibrado con N₂) durante diferentes periodos.

Extracción de ARN

El ARN total procedente de las células en cultivo se aisló mediante el reactivo Ultraspec (Biotech) según las instrucciones del fabricante. La concentración y la pureza del ARN se determinaban a partir de la absorbancia a 260 nm y de la relación de absorbancia 260 nm/280 nm, respectivamente.

PCR a tiempo real

Se retranscribió 1 μ g de ARN total utilizando el High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). La cuantificación de los valores relativos de ARNm de la LOX y del VEGF se realizó mediante PCR a tiempo real utilizando el sistema ABIPRISM 7900 (Applied Biosystems) y oligonucleótidos

dos y sondas Taqman™ específicas proporcionados por el sistema Assay-on-Demand™ (Applied Biosystems), tal y como se describió previamente¹⁶. Los valores de expresión de la proteína de unión a TATA (TBP, *TATA-binding protein*) se usaron para normalizar los resultados.

Actividad de lisil oxidasa

La actividad de LOX se evaluó en el sobrenadante de BAEC mediante un ensayo fluorescente muy sensible, como se ha descrito previamente⁶. Para ello se sembraron 100.000 células/pozo en placas de 6 pozos. Cuando alcanzaron la confluencia, el medio se reemplazó por M199 libre de rojo fenol y de FCS y las células se sometieron a hipoxia o normoxia durante los tiempos indicados. La actividad de LOX se evaluó en 200 μ l de medio que se incubó en presencia y ausencia de 500 μ mol/l de beta-aminopropionitrilo (BAPN) a 37 °C durante 30 min con 1 U/ml de peroxidasa de rábano, 10 μ mol/l de Amplex red (Molecular Probes) y 10 mmol/l de 1,5-diaminopentano en 1,2 mol/l de urea y 0,05 mol/l de borato sódico pH 8,2. La reacción se detuvo en hielo y se determinó la diferencia en intensidad de fluorescencia (longitud de onda de excitación, 563 nm; longitud de onda de emisión, 587 nm) en presencia y ausencia de BAPN. Los resultados se normalizaron por el contenido de proteína celular.

Transfección transitoria

Las células BAEC se transfectaron transitoriamente con Lipofectin™ (Invitrogen) y el vector reportero acoplado a luciferasa pGL3/LOX que contiene el promotor de la LOX junto al pSV β -gal, como se describió previamente⁸. En los estudios de cotransfección se utilizó un vector de expresión de HIF-1 α (pHIF-1 α), proporcionado por el Dr. E. Huang (Department of Health & Human Services, HHU, Bethesda, Maryland) o el correspondiente vector vacío (pcDNA3). Los complejos ADN/liposoma se añadieron a las células durante 5 h. A continuación el medio se reemplazó por medio fresco y las células se mantuvieron en normoxia o se sometieron a condiciones de hipoxia durante 24 h. La actividad luciferasa se determinó en el lisado celular con el Luciferase assay kit (Promega) y usando el luminómetro Orion I (Berthold Detection Systems), según las recomendaciones del fabricante. Los resultados se normalizaron por la actividad beta-galactosidasa determinada mediante el Enzyme Assay System™ (Promega).

Análisis de promotor

El promotor de la LOX se analizó en busca de posibles elementos de respuesta a hipoxia (HRE) utilizando el programa MatInspector (www.genomatix.de).

Obtención de extractos nucleares

Se cultivaron células BAEC en placas de Petri de 100 mm de diámetro bajo condiciones de normoxia o hipoxia durante 24 h. Las células se recogieron en tampón fosfato salino (PBS) frío y los extractos nucleares se obtuvieron usando el NucBuster Protein Extraction kit (Novagen), según las instrucciones del fabricante. La concentración proteínica de los extractos se determinó mediante el método del ácido bicinónico (BCA), según el BCA Protein Assay (Pierce). Los extractos se alicuotaron, se congelaron en N₂ y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

Western-blot

Los extractos nucleares se resolvieron mediante electroforesis en SDS (SDS-PAGE) en condiciones reductoras. Las protei-

nas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,45 μ mol (Bio-Rad) que se incubaron con anticuerpos contra HIF-1 α (NB100-449A, Novus). Los complejos antígeno-anticuerpo se detectaron mediante la incubación con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidada usando como sustrato el reactivo SuperSignal West Dura Extendend Duration Substrate (Thermo Scientific). Las bandas correspondientes a la proteína de interés se visualizaron mediante autorradiografía por exposición en películas CURIX RP2 PLUS (Agfa). La homogeneidad de la carga proteínica en cada carril se verificó mediante la tinción de Ponceau¹⁷.

Análisis de la formación de neovasos en Matrigel

El efecto de la hipoxia en la capacidad de formación de neovasos de BAEC se evaluó en estudios *in vitro* en Matrigel. Para ello se trataron placas de 24 pozos con 250 μ l/pozo de Matrigel (BD Biosciences) que se dejó polimerizar durante 1 h a 37 °C. A continuación se añadieron las células (20.000 células/pozo) en 200 μ l de medio. La formación de tubos se siguió mediante observación bajo microscopio invertido (18 h) y las imágenes se captaron con una cámara Leica DMIRE2. La cuantificación de la longitud de los tubos formados en ambas condiciones se realizó mediante el programa de procesamiento de imagen Image J (National Institute of Health)¹⁸.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm error estándar. Las diferencias entre grupos se determinaron mediante ANOVA. Las diferencias se consideraron significativas a partir de $p < 0,05$.

Resultados

La hipoxia induce la expresión y la actividad de la LOX en células endoteliales

Se analizó el efecto de la hipoxia en la expresión de LOX en células endoteliales. La exposición de células BAEC a hipoxia (1%, 18 h) causó un incremento en los valores nucleares del factor HIF-1 α (fig. 1A) e indujo la formación de neovasos en estudios en Matrigel (fig. 1B). En estas células la hipoxia aumentó la expresión de LOX de manera dependiente del tiempo de incubación, un efecto significativo al cabo de 8 h de estimulación y que fue máximo al cabo de 16 h (aproximadamente, 3 veces) (fig. 2A). Este efecto se tradujo en un incremento en la actividad de LOX evaluada en el sobrenadante de las células (fig. 2B). Análogamente, la hipoxia indujo la expresión de LOX en HUVEC, efecto que se acompañó por un incremento en el valor de ARNm del VEGF, que se utilizó como control positivo de respuesta a hipoxia (fig. 2C).

La inhibición de la prolil hidroxilasa induce la expresión de LOX en células endoteliales

Para determinar la posible implicación de HIF-1 en la inducción de la expresión de LOX por hipoxia, determinamos las consecuencias de la inhi-

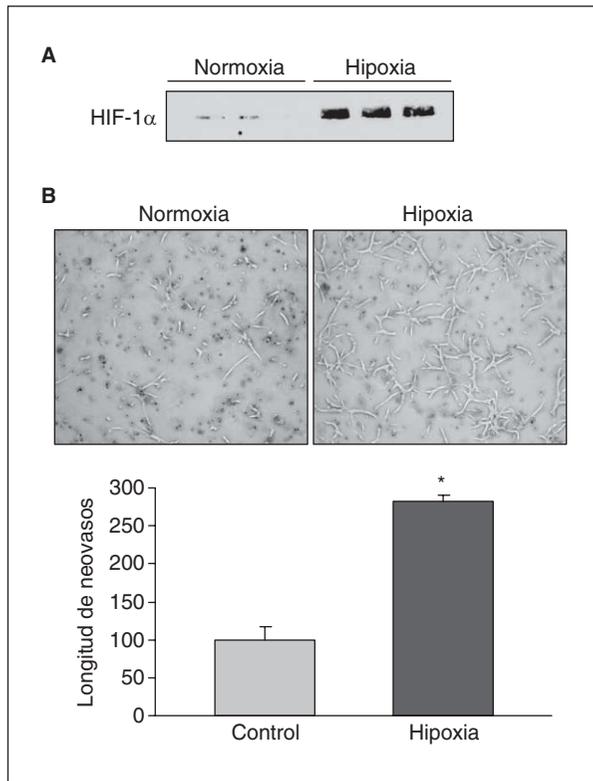


Figura 1. La hipoxia induce la expresión de HIF-1 α y la formación de neovasos en Matrigel. A: se muestran las concentraciones de proteína HIF-1 α analizados por *Western blot* en extractos nucleares de células BAEC sometidas a condiciones de normoxia o hipoxia (1% de O₂) durante 24 h. Se muestra una autorradiografía representativa de 3 ensayos realizados por triplicado. B: análisis de la formación de tubos en células BAEC sembradas en Matrigel mantenidas en condiciones de normoxia o hipoxia (1% de O₂) durante 24 h. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos realizados por triplicado. *p < 0,01 respecto a normoxia.

bición de la actividad proil hidroxilasa mediante dimetil oxal glicina (DMOG). El tratamiento con este agente produce un incremento de las concentraciones intracelulares de proteína HIF-1 α al inhibir su degradación proteosómica (fig. 3A)¹⁹. Como se muestra en la figura 3B el tratamiento de células BAEC con DMOG produjo un incremento en la expresión de LOX al igual que la propia hipoxia. Este resultado indica la implicación del factor HIF-1 en la inducción de LOX por la hipoxia.

La hipoxia induce la expresión de LOX mediante un mecanismo transcripcional

Con el objetivo de caracterizar los mecanismos implicados en la inducción de la expresión de LOX por la hipoxia en células endoteliales determinamos el efecto del 5,6-diclorobencimidazol (DRB),

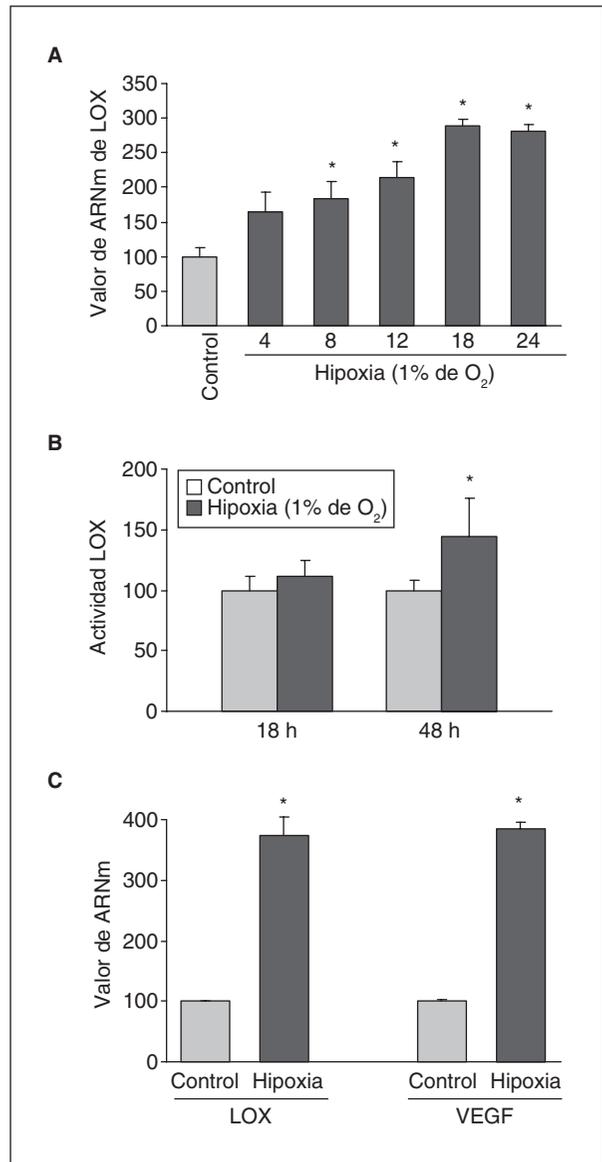


Figura 2. La hipoxia induce la expresión de LOX en células endoteliales. A: ensayo de dependencia del tiempo de incubación realizado en células BAEC mantenidas en condiciones de normoxia (control) o sometidas a hipoxia (1% de O₂) durante los tiempos indicados. Los valores de ARNm se evaluaron mediante PCR a tiempo real. Los resultados, normalizados por el gen control (TBP), se expresan como la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. B: grado de actividad de LOX evaluado en el sobrenadante de células BAEC mantenidas en condiciones de normoxia (control) o sometidas a hipoxia (1% de O₂) durante los tiempos indicados. El resultado se expresa en porcentaje respecto a las células mantenidas en normoxia y se normalizó por el contenido de proteína celular. C: valor de ARNm de LOX y VEGF evaluado mediante PCR a tiempo real en células HUVEC mantenidas en condiciones de normoxia (control) o sometidas a hipoxia (1% de O₂) durante 18 h. Como control endógeno se evaluó el valor de expresión de la TBP. Los resultados corresponden a la media \pm error estándar de 2 experimentos independientes realizados por triplicado. *p < 0,05 respecto a controles.

un inhibidor de la transcripción. Se incubaron células BAEC en condiciones de normoxia o hipoxia en presencia y ausencia de DRB (50 $\mu\text{mol/l}$, 18 h). La figura 4A muestra cómo la inhibición de la transcripción con DRB inhibió totalmente el incremento en la expresión de LOX causado por la hipoxia. En concordancia, los estudios de transfección transitoria con una construcción que contiene el promotor de la LOX acoplado a luciferasa mostraron que la hipoxia incrementó la actividad transcripcional de la LOX aproximadamente 2,5 veces (fig. 4B). Los estudios *in silico* realizados con el programa de análisis de secuencia MatInspector indicaban la presencia de 3 elementos posibles de respuesta a hipoxia (HRE) en el promotor de la LOX, situados en las posiciones -75, -370 y -457 (fig. 4C).

HIF-1 α está implicado en la regulación de LOX por hipoxia en células endoteliales

Quisimos corroborar la participación de HIF-1 en la regulación de LOX por hipoxia. Para ello, realizamos estudios de cotransfección con un vector de expresión para HIF-1 α . Nuestros resultados mostraron que la sobreexpresión de este factor produjo un incremento en la actividad transcripcional de la LOX similar al ejercido por la hipoxia, lo que apoya la implicación de este factor de transcripción en la regulación de esta enzima (fig. 4D).

Discusión

La LOX es una enzima clave en la síntesis y estabilización de la MEC³. En los últimos años el hallazgo de la implicación de esta enzima en distintos procesos patológicos ha aumentado el interés por su estudio²⁰. En lo que respecta al sistema cardiovascular nuestros trabajos previos apuntan a que la inhibición de LOX podría ser un mecanismo común a la disfunción endotelial desencadenada por distintos factores de riesgo aterosclerótico y que esta enzima podría ser clave en el mantenimiento de la homeostasis del endotelio^{6-9,21}.

La hipoxia tiene un papel fundamental en distintos procesos patológicos, entre ellos, las enfermedades cardiovasculares, en las que podría controlar el remodelado vascular asociado al desarrollo de la lesión²². La hipoxia que se desencadena en las regiones más internas de la placa aterosclerótica incrementa la expresión de HIF-1, cuyos valores se correlacionan con el grado de engrosamiento de la neointima^{10,11}. El factor de transcripción HIF-1 regula en gran medida la respuesta celular a la hipoxia por la modulación de múltiples genes que actúan de manera coordinada facilitando el aporte de

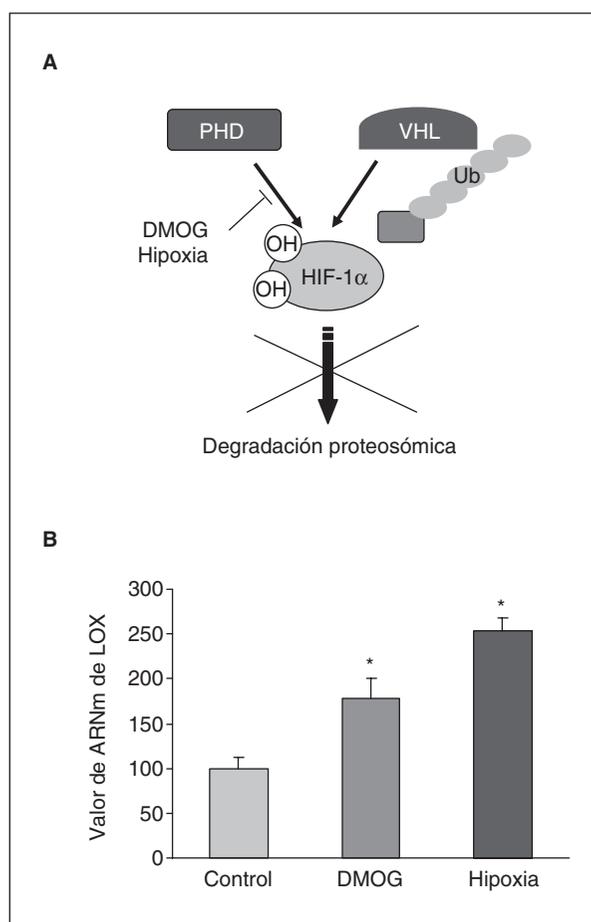


Figura 3. La inhibición de la actividad proil hidroxilasa induce la expresión de la LOX en células endoteliales. A: se detalla el mecanismo de regulación postransduccional del factor HIF-1 que implica la hidroxilación enzimática dependiente de oxígeno en residuos específicos mediante la actividad proil hidroxilasa (PHD). Esta hidroxilación promueve la proteólisis dependiente del factor Von-Hippel-Lindau-tumour suppressor (VHL) que supone la degradación proteosómica de la subunidad HIF-1 α . Se indica la inactivación de la actividad proil hidroxilasa ejercida por la dimetil oxal glicina (DMOG) y la hipoxia que lleva consigo un incremento en la estabilidad de HIF-1 α . B: efecto de la hipoxia y de la DMOG en el valor de ARNm de la LOX evaluado mediante PCR a tiempo real en células BAEC. El resultado corresponde a la media \pm error estándar de 2 experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$ respecto a controles.

nutrientes y oxígeno a las áreas isquémicas y regulando la supervivencia, la migración y el crecimiento celular^{12,23}. Asimismo, este factor de transcripción controla la expresión de proteínas componentes y modificadoras de MEC en células endoteliales y regula los procesos de fibrogénesis y la transición epitelio-mesénquima mediante, al menos en parte, la modulación de genes de la familia de LOX^{13,14}.

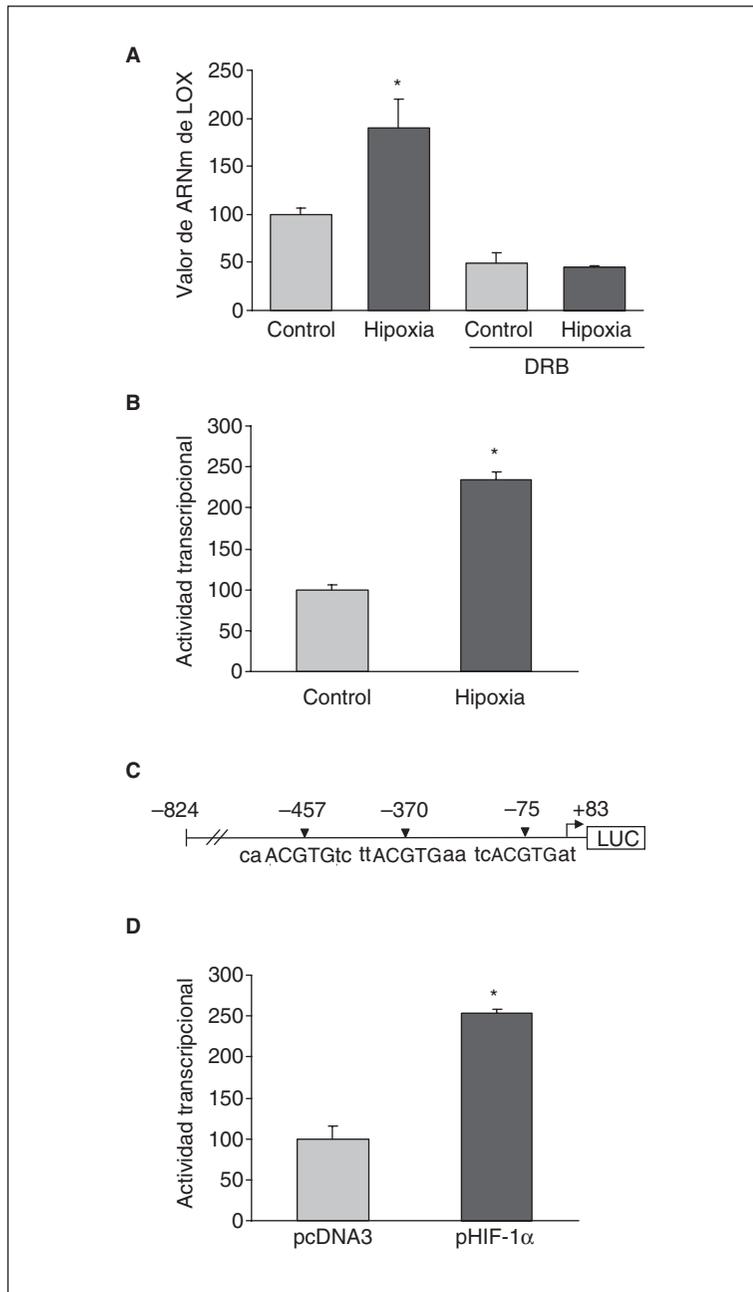


Figura 4. La hipoxia induce la expresión de LOX por un mecanismo transcripcional en el que estaría implicado HIF-1. A: las células BAEC se incubaron en normoxia (control) o en condiciones de hipoxia (1% de O₂) durante 24 h en presencia y ausencia de DRB (50 μmol/l). El resultado corresponde a la media ± error estándar de 2 experimentos independientes realizados por triplicado (*p < 0,05 respecto a controles). B: análisis de la actividad transcripcional de la LOX en células BAEC transfectadas con una construcción que contiene la región de -824 a +83 del gen de la LOX acoplado a luciferasa. Las células se mantuvieron en normoxia (control) o se sometieron a hipoxia (1% de O₂) durante 18 h. El resultado se expresa en porcentaje respecto a las células control y corresponde a la media ± error estándar de 3 experimentos independientes realizados por triplicado (*p < 0,05 respecto a controles). C: esquema de la construcción del promotor de la LOX acoplada a luciferasa en el que se sitúan los 3 posibles HRE identificados mediante análisis *in silico* con el programa MatInspector (HRE: elemento de respuesta a hipoxia). D: efecto de la cotransfección de un vector de expresión para HIF-1α (pHIF-1α) en la actividad transcripcional LOX. El resultado se expresa en porcentaje respecto a las células transfectadas con el correspondiente plásmido vacío (pcDNA3) y corresponde a la media ± error estándar de 3 experimentos independientes realizados por triplicado (*p < 0,05 respecto a pcDNA3).

En nuestros estudios realizados en células endoteliales, hemos corroborado que la hipoxia aumenta los valores nucleares del factor de transcripción HIF-1α y de expresión de VEGF, así como induce la formación de neovasos *in vitro*. En estas condiciones, la hipoxia conlleva un incremento en la expresión de la LOX en células endoteliales tanto bovinas como humanas. En el endotelio vascular la inhibición de LOX va asociada a la disfunción endotelial característica de las fases más tempranas

del proceso aterosclerótico^{6,9,21}. Sin embargo, en modelos de aterosclerosis avanzada, la expresión de LOX se incrementa en las lesiones muy engrosadas, con un alto grado de fibrosis y altamente estables²⁴. Por lo tanto, estos datos indican que la expresión de esta enzima se regula de forma diferencial en función del estadio de desarrollo de la lesión. La inducción de LOX por hipoxia en células endoteliales indica su implicación en el proceso de angiogénesis. De hecho, Erler et al²⁵ demost

ron que la hipoxia induce la expresión de LOX en distintos tipos de células tumorales, que la sobreexpresión de esta enzima incrementa el poder metastásico e invasivo de células de cáncer de mama y que su inhibición previene la adhesión y la migración de las células tumorales²⁶. Estos resultados indican que la LOX es una enzima fundamental en la metástasis inducida por la hipoxia y apuntan a que podría tener un papel crítico en los procesos de neovascularización, aunque, obviamente, la implicación de esta enzima en el desarrollo de nuevos vasos deberá evaluarse en profundidad en células endoteliales.

El incremento en la expresión de LOX se traduce en un aumento significativo de su actividad enzimática. Sorprendentemente, Postovit et al²⁷ no observaron incremento en la actividad de LOX en células tumorales sometidas a hipoxia, pese a detectar un aumento en las concentraciones de proteína madura. En este trabajo, la actividad de LOX tan sólo se induce tras la posterior reoxigenación de las células, un resultado coherente con el hecho de que la actividad de LOX es dependiente de O₂. Las discrepancias con nuestro estudio estarían en las diferencias metodológicas a la hora de evaluar la actividad de LOX. El método de citometría de flujo utilizado en el trabajo de Postovit analiza la actividad de LOX intracelular y técnicamente se desarrolla bajo un 1% de O₂. Por el contrario, el método fluorimétrico con el que hemos evaluado la actividad de LOX extracelular no puede desarrollarse en condiciones de hipoxia; por lo tanto, nuestros resultados indican que en las células endoteliales la hipoxia estaría induciendo las concentraciones de proteína LOX madura y que ésta es catalíticamente activa en presencia de O₂.

La actividad de HIF-1 se regula por la hidroxilación postranslacional de residuos específicos de prolina, lo que dirige a este factor de transcripción a la degradación por la vía del proteosoma^{19,28}. Este proceso catalizado por prolil hidroxilasas es inhibido con DMOG que incrementa el valor de HIF-1 en condiciones de normoxia. La inducción de LOX en presencia de DMOG apoya la posible implicación del factor de transcripción HIF-1 en la regulación de esta enzima. De hecho, los datos obtenidos en los ensayos con DRB, un inhibidor de la transcripción, indican que la regulación de LOX por hipoxia se produce mediante un mecanismo transcripcional, lo que corroboran los estudios de transfección transitoria en los que demostramos que la sobreexpresión de HIF-1 α en células endoteliales induce la actividad transcripcional de la LOX. Si bien otros efectores regulan la expresión de la LOX mediante

la modulación de la actividad transcripcional, no se ha llevado a cabo una caracterización exhaustiva de los elementos funcionales del promotor de LOX^{6-8,29}. El análisis *in silico* de esta región promotora revela la presencia de 3 elementos HRE posibles, uno de los cuales, el situado en la posición -75 respecto al inicio de la transcripción, se había involucrado previamente en la regulación de LOX por hipoxia en células de cáncer de mama²⁵.

Un aspecto interesante es que el incremento en la expresión de LOX inducido por la hipoxia en células tumorales es mayor que el observado en células endoteliales y muy dependiente de la capacidad invasiva de las células, lo que indica que debe haber otros factores que controlen la regulación de LOX por hipoxia²⁷. Efectivamente, se ha demostrado que la inducción de LOX en células tumorales es sólo parcialmente dependiente de HIF-1. De hecho, el tratamiento de células de cáncer de mama con agentes que mimetizan la hipoxia incrementando los valores de HIF-1 (CoCl₂ o DFO) produce un menor aumento en la expresión de LOX que la propia hipoxia²⁷, resultado similar al obtenido en nuestro estudio en células endoteliales estimuladas con el inhibidor de la prolil hidroxilasa (DMOG). Por lo tanto, si bien nuestros resultados indican la participación de HIF-1 en la regulación de LOX por hipoxia en células endoteliales, basados en nuestros datos experimentales no podemos descartar la participación de otros factores de transcripción en este efecto. En este contexto, se requerirán nuevos estudios que permitan definir con precisión cuál es el mecanismo implicado en la regulación de la LOX por hipoxia en células endoteliales y la relevancia patofisiológica de este fenómeno en el inicio y la progresión de la lesión aterosclerótica.

Agradecimientos

Agradecemos a Silvia Aguiló su apoyo técnico.

Bibliografía

1. Kagan HM, Trackman PC. Properties and function of lysyl oxidase. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1991;5:206-10.
2. Molnar J, Fong KS, He QP, Hayashi K, Kim Y, Fong SF, et al. Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1647:220-4.
3. Kagan HM, Li W. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem.* 2003;88:660-72.
4. Mäki J, Räsänen J, Tikkanen H, Sormunen R, Mäkilallio K, Kivirikko K, et al. Inactivation of the lysyl oxidase gene *Lox* leads to aortic aneurysms, cardiovascular dysfunction and perinatal death in mice. *Circulation.* 2002;106:2503-9.
5. Rodríguez C, Raposo B, Martínez-González J, Alcudia JF, Guadall A, Badimon L. Expresión de la lisil oxidasa (LOX) en la pared vascular: mecanismos implicados en la regulación de la LOX por lipoproteínas. *Clin Invest Arterioscl.* 2007;19:113-21.

6. Rodríguez C, Raposo B, Martínez-González J, Casani L, Badimon L. Low density lipoproteins down-regulates lysyl oxidase in vascular endothelial cells and the arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1409-14.
7. Raposo B, Rodríguez C, Martínez-González J, Badimon L. High levels of homocysteine inhibit lysyl oxidase (LOX) and down-regulates LOX expression in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2004;177:1-8.
8. Rodríguez C, Alcudia JF, Martínez-González J, Raposo B, Navarro MA, Badimon L. Lysyl oxidase (LOX) down-regulation by TNF α : A new mechanism underlying TNF α -induced endothelial dysfunction. *Atherosclerosis.* 2008;196:558-64.
9. Alcudia JF, Martínez-González J, Guadall A, González-Diez M, Badimon L, Rodríguez C. Lysyl oxidase and endothelial dysfunction: mechanisms of lysyl oxidase down-regulation by pro-inflammatory cytokines. *Front Biosci.* 2008;13:2721-7.
10. Björnheden T, Levin M, Evaldsson M, Wiklund O. Evidence of hypoxic areas within the arterial wall in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:870-6.
11. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Shibata R, Kusaba K, Tahara N, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α /vascular endothelial growth factor pathway for adventitial vasa vasorum formation in hypertensive rat aorta. *Hypertension.* 2002;39:46-50.
12. Semenza GL. Surviving ischemia: adaptive responses mediated by hypoxia-inducible factor 1. *J Clin Invest.* 2000;106:809-12.
13. Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, et al. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2007;117:3810-20.
14. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood.* 2005;105:659-69.
15. Rodríguez C, Martínez-González J, Sánchez-Gómez S, Badimon L. LDL downregulates CYP51 in porcine vascular endothelial cells and in the arterial wall through a sterol regulatory element binding protein-2-dependent mechanism. *Circ Res.* 2001;88:268-74.
16. García-Ramírez M, Martínez-González J, Juan-Babot JO, Rodríguez C, Badimon L. Transcription factor SOX18 is expressed in human coronary atherosclerotic lesions and regulates DNA synthesis and vascular cell growth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2398-403.
17. Martínez-González J, Escudero I, Badimon L. Simvastatin potentiates PGI(2) release induced by HDL in human VSMC: effect on Cox-2 up-regulation and MAPK signalling pathways activated by HDL. *Atherosclerosis.* 2004;174:305-13.
18. Turu MM, Slevin M, Matou S, West D, Rodríguez C, Luque A, et al. C-reactive protein exerts angiogenic effects on vascular endothelial cells and modulates associated signalling pathways and gene expression. *BMC Cell Biol.* 2008;9:47.
19. Cummins EP, Berra E, Comerford KM, Ginouves A, Fitzgerald KT, Seeballuck F, et al. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I κ B kinase- β , giving insight into hypoxia-induced NF κ B activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:18154-9.
20. Rodríguez C, Rodríguez-Sinovas A, Martínez-González J. Lysyl oxidase as a potential therapeutic target. *Drug News Perspect.* 2008;21:218-24.
21. Rodríguez C, Martínez-González J, Raposo B, Alcudia JF, Guadall A, Badimon L. Regulation of lysyl oxidase in vascular cells: lysyl oxidase as a new player in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res.* 2008;79:7-13.
22. Hänze J, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Rose F. Cellular and molecular mechanisms of hypoxia-inducible factor driven vascular remodeling. *Thromb Haemost.* 2007;97:774-87.
23. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med.* 2003;9:677-84.
24. Kagan HM, Raghavan J, Hollander W. Changes in aortic lysyl oxidase activity in diet-induced atherosclerosis in the rabbit. *Arteriosclerosis.* 1981;1:287-91.
25. Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhofer N, Kong C, Le QT, et al. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature.* 2006;440:1222-6.
26. Sion AM, Figg WD. Lysyl oxidase (LOX) and hypoxia-induced metastases. *Cancer Biol Ther.* 2006;5:909-11.
27. 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.
28. Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5:343-54.
29. Song YL, Ford JW, Gordon D, Shanley CJ. Regulation of lysyl oxidase by interferon- γ in rat aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:982-8.