



ORIGINAL

La expresión de la lisil oxidasa en las células musculares lisas determina el nivel de calcificación de la íntima en la aterosclerosis inducida por hipercolesterolemia



Carme Ballester-Servera ^{a,b,c}, Judith Alonso ^{a,b,c}, Manel Taurón ^{b,d},
Noemí Rotllán ^{c,e}, Cristina Rodríguez ^{b,c} y José Martínez-González ^{a,b,c,*}

^a Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IIBB-CSIC), Barcelona, España

^b CIBER de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

^c Institut de Recerca Sant Pau (IR SANT PAU), Barcelona, España

^d Departamento de Cirugía Cardíaca, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau-Universitat Autònoma de Barcelona (HSCSP-UAB), Barcelona, España

^e CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

Recibido el 19 de diciembre de 2023; aceptado el 24 de enero de 2024

Disponible en Internet el 23 de febrero de 2024

PALABRAS CLAVE

Aterosclerosis;
Calcificación
cardiovascular;
Lisil oxidasa

Resumen

Introducción: La calcificación cardiovascular es un importante problema de salud pública para el que no se dispone de estrategias farmacológicas eficaces. Previamente habíamos demostrado que la actividad lisil oxidasa (LOX) influye de manera determinante en la calcificación de las células musculares lisas de la pared vascular (CMLV) y las células intersticiales valvulares (VIC) a través de su impacto en el remodelado de la matriz extracelular. Hemos profundizado en la participación de la LOX en la aterosclerosis y la calcificación asociada, así como en la mineralización de la válvula aórtica.

Métodos: Se realizaron análisis inmunohistoquímicos y de expresión en lesiones ateroscleróticas humanas y de modelos experimentales, válvulas de pacientes con estenosis aórtica, VIC y estudios en un modelo de ratón modificado genéticamente que sobreexpresa LOX en CMLV ($TgLOX^{CMLV}$), en el que se indujo hiperlipemia y aterosclerosis mediante la administración de virus adenoasociados que codifican para una forma mutada de la PCSK9 (AAV-PCSK9^{D374Y}) y dieta aterogénica.

Abreviaturas: AAV, virus adenoasociado; ALPL, fosfatasa alcalina; ApoE, apolipoproteína E; CMLV, células musculares lisas vasculares; Col1a1, colágeno alfa-1 tipo I; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; HSCSP, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau; IL, interleucina; LOX, lisil oxidasa; MCP1, proteína quimiotáctica de monocitos 1; MEX, matriz extracelular; NOR-1, *Neuron-derived orphan receptor-1*; NOX, NADPH oxidasa; OM, medio osteogénico; OPN, osteopontina; ORO, Oil Red O; RUNX2, Runt-related transcription factor 2; $TgLOX^{CMLV}$, ratón transgénico que sobreexpresa LOX en CMLV; VIC, células intersticiales valvulares; WT, *wild-type*.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jose.martinez@iibb.csic.es (J. Martínez-González).

<https://doi.org/10.1016/j.arteri.2024.01.003>

0214-9168/© 2024 Sociedad Española de Arteriosclerosis. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Resultados: La expresión de la LOX se incrementa en la neointima de lesiones ateroscleróticas de arterias coronarias humanas y en regiones ricas en CMLV de las placas de ateroma desarrolladas tanto en la arteria braquiocefálica de animales control (C57BL/6J) transducidos con PCSK9^{D374Y} como en la raíz aórtica de ratones ApoE^{-/-}. En ratones TgLOX^{CMLV}, la transducción con PCSK9^{D374Y} no alteró significativamente el incremento de la expresión aórtica de genes implicados en el remodelado de la matriz, la inflamación, el estrés oxidativo y la diferenciación osteoblástica. La transgénesis de LOX no afectó al tamaño ni al contenido lipídico de las lesiones ateroscleróticas del arco aórtico, la arteria braquiocefálica y la raíz aórtica, pero exacerbó la calcificación de la íntima de las lesiones. Entre las isoenzimas de la familia de lisil oxidadas, la LOX es el miembro más expresado en válvulas de pacientes muy calcificadas, detectándose en células VIC positivas para RUNX2. La menor deposición de calcio y la disminución de RUNX2 causadas por la sobreexpresión del receptor nuclear NOR-1 en VIC se asoció a una reducción de los niveles de proteína de LOX.

Conclusiones: Nuestros resultados muestran que la expresión de LOX está aumentada en lesiones ateroscleróticas, y que la sobreexpresión de esta enzima en CMLV no afecta al tamaño ni al contenido lipídico de las lesiones pero sí a su grado de calcificación. Además, sugieren que la disminución de la calcificación inducida por NOR-1 en VIC estaría mediada por una reducción en nivel de LOX. Estas evidencias apoyan el interés de la LOX como diana terapéutica en la calcificación cardiovascular.

© 2024 Sociedad Española de Arteriosclerosis. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Atherosclerosis;
Cardiovascular
calcification;
Lysyl oxidase

Lysyl oxidase expression in smooth muscle cells determines the level of intima calcification in hypercholesterolemia-induced atherosclerosis

Abstract

Introduction: Cardiovascular calcification is an important public health issue with an unmet therapeutic need. We had previously shown that lysyl oxidase (LOX) activity critically influences vascular wall smooth muscle cells (VSMCs) and valvular interstitial cells (VICs) calcification by affecting extracellular matrix remodeling. We have delved into the participation of LOX in atherosclerosis and vascular calcification, as well as in the mineralization of the aortic valve.

Methods: Immunohistochemical and expression studies were carried out in human atherosclerotic lesions and experimental models, valves from patients with aortic stenosis, VICs, and in a genetically modified mouse model that overexpresses LOX in CMLV (TgLOX^{CMLV}). Hyperlipemia and atherosclerosis was induced in mice through the administration of adeno-associated viruses encoding a PCSK9 mutated form (AAV-PCSK9^{D374Y}) combined with an atherogenic diet.

Results: LOX expression is increased in the neointimal layer of atherosclerotic lesions from human coronary arteries and in VSMC-rich regions of atheromas developed both in the brachiocephalic artery of control (C57BL/6J) animals transduced with PCSK9^{D374Y} and in the aortic root of ApoE^{-/-} mice. In TgLOX^{CMLV} mice, PCSK9^{D374Y} transduction did not significantly alter the enhanced aortic expression of genes involved in matrix remodeling, inflammation, oxidative stress and osteoblastic differentiation. Likewise, LOX transgenesis did not alter the size or lipid content of atherosclerotic lesions in the aortic arch, brachiocephalic artery and aortic root, but exacerbated calcification. Among lysyl oxidase isoenzymes, LOX is the most expressed member of this family in highly calcified human valves, colocalizing with RUNX2 in VICs. The lower calcium deposition and decreased RUNX2 levels triggered by the overexpression of the nuclear receptor NOR-1 in VICs was associated with a reduction in LOX.

Conclusions: Our results show that LOX expression is increased in atherosclerotic lesions, and that overexpression of this enzyme in VSMC does not affect the size of the atheroma or its lipid content, but it does affect its degree of calcification. Further, these data suggest that the decrease in calcification driven by NOR-1 in VICs would involve a reduction in LOX. These evidences support the interest of LOX as a therapeutic target in cardiovascular calcification.

© 2024 Sociedad Española de Arteriosclerosis. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La calcificación cardiovascular es un importante problema de salud pública caracterizado por la acumulación de depósitos de calcio en forma de cristales de hidroxiapatita en los vasos sanguíneos y en las valvas de las válvulas cardíacas¹. Este proceso aumenta la rigidez del tejido, altera sus propiedades biomecánicas y conlleva una pérdida funcional. En concreto, la calcificación vascular se asocia al desarrollo de aterosclerosis y podría promover la inestabilidad de la placa, facilitando su rotura y la aparición de eventos cardiovasculares como el infarto de miocardio o el ictus², de ahí que el *score* de calcio coronario sea un factor predictivo de eventos cardiovasculares³. A su vez, la enfermedad de la válvula aórtica calcificada, la enfermedad valvular más común, conduce a estenosis aórtica que puede comprometer la función valvular y desembocar en insuficiencia cardíaca^{4,5}. A pesar de las graves consecuencias de la calcificación cardiovascular y del incremento de su prevalencia debido al envejecimiento de la población, no se dispone de tratamientos farmacológicos eficaces que limiten su progresión, por lo que el manejo de estos pacientes consiste fundamentalmente en la cirugía o el reemplazo de la válvula aórtica mediante tecnología transcatéter, intervenciones de elevado coste económico⁶. Por tanto, es fundamental profundizar en los mecanismos que subyacen al desarrollo de la calcificación cardiovascular con objeto de identificar nuevas estrategias terapéuticas.

La calcificación es un proceso activo regulado a través de mecanismos similares a los de la mineralización ósea y en el que tiene un papel fundamental la transdiferenciación de las células musculares lisas de la pared vascular (CMLV) y las células intersticiales valvulares (VIC) a un fenotipo osteoblástico, la inflamación, la apoptosis y el estrés oxidativo, entre otros^{7,8}. Múltiples factores de transcripción participan en la regulación coordinada de este proceso, entre ellos RUNX2 (del inglés *Runt-related transcription factor 2*), un factor esencial en la transdiferenciación osteogénica y la mineralización^{9,10}, y el receptor nuclear NOR-1 (del inglés *Neuron-derived orphan receptor-1*), que se ha implicado en la fisiopatología de diversas enfermedades cardiovasculares^{11,12}, y recientemente en la calcificación cardiovascular¹³. Asimismo, en los últimos años el remodelado de la matriz extracelular (MEX) ha adquirido una especial importancia en la calcificación cardiovascular. Se ha propuesto que las fibras de colágeno actuarían como soporte en el proceso de mineralización y guiarían el crecimiento y la deposición de los cristales de hidroxiapatita^{14,15}. De hecho, estudios recientes sugieren que el grado de entrecruzamiento o *cross-linking* de las fibras de colágeno de la MEX influye de forma decisiva en la mineralización de la matriz y muestran la importancia de la actividad lisil oxidasa (LOX) en este proceso^{16,17}.

Las enzimas de la familia de lisil oxidasa son responsables del entrecruzamiento covalente de las fibras de colágeno y elastina de la MEX, y su actividad condiciona sus propiedades biomecánicas. Esta familia está compuesta por cinco miembros, la LOX y cuatro enzimas LOX-like (LOXL1-4), que catalizan una reacción de deaminación oxidativa en residuos de lisina e hidroxilisina del colágeno y la elastina, dando lugar a semialdehídos altamente reactivos que condensan entre sí para formar enlaces covalentes intra- e

intermoleculares¹⁸⁻²¹. Previamente habíamos demostrado el incremento de la expresión de la LOX en válvulas y lesiones ateroscleróticas humanas calcificadas, y que la acción de la actividad LOX sobre la MEX contribuye a la calcificación de las VIC y de las CMLV^{16,17}. En el presente trabajo se han realizado análisis en lesiones ateroscleróticas humanas y de modelos experimentales, válvulas de pacientes con estenosis aórtica, VIC y estudios en un modelo de ratón modificado genéticamente que sobreexpresa LOX en CMLV (TgLOX^{CMLV}). Demostramos que la expresión de LOX en las lesiones ateroscleróticas es elevada, y que al inducir aterosclerosis la sobreexpresión de LOX en CMLV de los animales TgLOX^{CMLV} potencia la mineralización de la íntima aunque no afecta al tamaño de las lesiones ni a su contenido lipídico. Asimismo, nuestros resultados sugieren que, en VIC, la reducción en los niveles de LOX sería responsable, al menos en parte, de la disminución de la calcificación inducida por el receptor nuclear NOR-1.

Material y métodos

Estudios en muestras humanas

Se recogieron muestras de arterias coronarias de corazones procedentes de intervenciones de trasplante cardíaco realizados en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP). Estas muestras se fijaron y procesaron para realizar los análisis inmunohistoquímicos. Análogamente, se obtuvieron muestras de válvulas aórticas humanas procedentes de pacientes sometidos a reemplazo valvular en el HSCSP. Dependiendo de su grado de calcificación, las muestras de válvulas aórticas se clasificaron en dos categorías: válvulas poco calcificadas (PC), en las que se estimó que el área calcificada era inferior al 20% del área total, y válvulas muy calcificadas (MC), en las que se estimó que el área calcificada era superior al 80%. Las válvulas se utilizaron para el aislamiento de VIC en fresco, se congelaron a -80 °C para la posterior extracción de ARN o bien se procesaron para los análisis inmunohistoquímicos. El uso de estas muestras fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del HSCSP (códigos 12/267 y 19/267). Todos los estudios que incluyen muestras humanas se realizaron de acuerdo con la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 2013, y se obtuvo un consentimiento informado por escrito de los pacientes o de sus representantes legales.

Aislamiento, cultivo e inducción de calcificación en VIC

Los velos de las válvulas aórticas se lavaron con abundante PBS y se trocearon en pequeños fragmentos en condiciones de esterilidad que se digirieron con 1 mg/ml de colagenasa II (LS004176, Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, EE.UU.) disuelta en PBS durante 1 hora a 37 °C y en agitación constante^{13,17}. Tras la digestión, el tejido se centrifugó durante 5 min a 500 × g y el sedimento se resuspendió en medio DMEM/F-12 suplementado con 20% de suero fetal bovino (FBS; Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), 50 ng/ml de insulina y 10 ng/ml del factor de crecimiento de fibroblastos 2. Las células se sembraron en placas

recubiertas con gelatina y se subcultivaron. Para la inducción de calcificación, las VIC en pase bajo (3-4) se cultivaron en medio osteogénico (OM; DMEM 4 g/l glucosa con 5% FBS, 2 mM Na₂HPO₄ y 50 µg/ml de ácido L-ascórbico) como se ha descrito previamente^{13,17}.

Análisis de la deposición de calcio en VIC

Para visualizar la deposición de calcio en la MEX, las VIC en cultivo se tiñeron con rojo de alizarina al 1%^{13,17}. Brevemente, tras la fijación de las células con paraformaldehído al 4% durante 15 min, se adicionó la solución de rojo de alizarina al 1% y al cabo de 5 min se eliminó el exceso de colorante con abundante agua.

Sobreexpresión de NOR-1 en VIC mediante transducción lentiviral

Las VIC se transdijeron con un lentivirus recombinante para sobreexpresar el cDNA humano de NOR-1 utilizando la construcción pLVX-NOR-1¹³. Como control se usó el vector vacío pLVX. Las células se transdijeron durante 24 horas y se seleccionaron con puromicina durante 5 días antes de la inducción osteogénica.

Inducción de aterosclerosis en animales de experimentación

Los estudios se realizaron en un modelo de ratón transgénico que sobreexpresa la LOX humana en CMLV en un fondo genético C57BL/6J (TgLOX^{CMLV})^{17,22,23}. Como animales control se incluyeron hermanos de camada de genotipo salvaje (*wild-type* [WT]). También se incluyeron animales deficientes en apolipoproteína E (ApoE^{−/−}). El cuidado y el mantenimiento de los animales se llevaron a cabo en la Unidad de Experimentación Animal del Institut de Recerca del HSCSP (IRHSCSP) en condiciones controladas de humedad y temperatura (21±1°C) y ciclo estándar de luz/oscuridad (ciclos de 12 h luz/oscuridad). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético del IRHSCSP (Ley 5/Junio 21, 1995; Generalitat de Catalunya) y durante su desarrollo se cumplió de manera estricta la normativa europea y nacional vigente para la protección animal (Directiva Europea 2010/63/EU y Real Decreto 53/2013).

Se indujo aterosclerosis y calcificación en ratones macho TgLOX^{CMLV} y WT de 15 semanas mediante una única inyección a través de la vena de la cola de vectores virales adenoasociados (AAV) que codifican para una forma mutada de ganancia de función de la PCSK9 (AAV-PCSK9^{D374Y}) (Unidad de Vectores Virales CNIC, Madrid, España)^{13,17}. Los grupos control fueron tratados con suero salino. Al cabo de 24 horas todos los animales se alimentaron *ad libitum* con una dieta rica en grasa (21%) y colesterol (1,25% añadido) (D12108C, Research Diets, New Brunswick, EE.UU.). Los animales fueron asignados de manera aleatoria a los diferentes grupos experimentales mediante un generador de números aleatorios. A las 20 semanas, los animales se anestesieron (150 mg/kg ketamina y 1 mg/kg medetedomidina; i.p.) y se sacrificaron mediante toracotomía bilateral. Se aisló la aorta

y la primera ramificación del arco aórtico (arteria braquiocefálica) que se procesaron de la siguiente manera: la arteria braquiocefálica se fijó para incluirla en parafina o embeberla en OCT y congelarla a -80°C, un grupo de aortas se congeló a -80°C para aislar ARN y en otro grupo el arco aórtico se fijó, se embebió en OCT y se congeló a -80°C para análisis histológicos e inmunohistoquímicos. Además, se aisló la parte superior del corazón, se embebió en OCT y se congeló a -80°C para analizar las lesiones ateroscleróticas desarrolladas en la raíz aórtica.

Asimismo, se realizaron estudios en ratones ApoE^{−/−} (Charles River) de 8 semanas de edad que se sometieron a dieta aterogénica (D12108C; Research Diets) durante 12 semanas. Como grupo control los animales se alimentaron con una dieta estándar. En estos animales se aisló la parte superior del corazón para analizar las lesiones ateroscleróticas en la raíz aórtica.

Análisis plasmáticos

Se recogió sangre heparinizada a través de la vena submandibular de los ratones TgLOX^{CMLV} y WT a tiempo inicial y por punción intracardiaca al cabo de 20 semanas tras la transducción con AAV. Se analizaron los niveles plasmáticos de colesterol total (Wako Cholesterol E, Wako Pure Chemicals), triglicéridos (con la corrección de glicerol; L-type Tryglyceride M, Wako Pure Chemicals) y la PCSK9 humana circulante (Human PCSK9 Quantikine ELISA Kit).

Análisis de la expresión génica

El ARN total se aisló mediante el reactivo *TriPure Isolation Reagent* (Roche Diagnostics, Mannheim, GE) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN se retrotranscribió a ADNc mediante el *High Capacity cDNA reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). El nivel de ARNm se cuantificó mediante PCR a tiempo real con el sistema de detección ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems) y las siguientes sondas específicas proporcionadas por *Integrated DNA Technologies* o el sistema *TaqMan™ gene expression assays-on-demand* (Applied Biosystems): *Lox* (Mm.PT.58.12951302), *Col1a1* (Colágeno α-1 tipo I; Mm.PT.58.7562513), *Nox2* (NADPH oxidasa 2; Mm01287743_m1), *Mcp1* (proteína quimiotáctica de monocitos 1; Mm00441242_m1), *Il6* (interleucina 6; Mm.PT.58.10005566), *Il1β* (Mm.PT.58.41616450), *Runx2* (Mm00501584_m1), *Opn* (osteopontina; Mm00436767_m1), *Alpl* (fosfatasa alcalina; Mm.PT.58.8794492). Como control de normalización se usó *Gapdh* (Mm.PT.39a.1). Los niveles relativos de ARNm se determinaron con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Western Blot

La proteína total de VIC sembradas en monocapa se obtuvo utilizando un tampón de lisis que contenía 10 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM de ortovanadato y 1% SDS. Se realizó la electroforesis de los lisados proteicos en geles de poliacrilamida al 10% con dodecilsulfato sódico preparados en el laboratorio. La proteína se transfirió a membranas de difluoruro

de polivinilideno (Immobilon®-P Transfer Membrane; Merck-Millipore) que se bloquearon con leche desnatada en polvo al 5%. Las membranas se incubaron durante 16 horas con anticuerpos dirigidos contra LOX (NB-100-2530, Novus Biologicals) y RUNX2 (ab23981). Seguidamente se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (Dako Products, Agilent). Las membranas se revelaron mediante el reactivo *Luminata™ Western HRP Substrate* (Immobilon, Merck-Millipore) que se detectó mediante películas autoradiográficas Curix rp2 plus (Agfa) reveladas mediante procedimientos fotográficos estándar. Las películas se escanearon en el densitómetro GS-800 (Bio-rad) y la cuantificación relativa de las bandas se realizó mediante el programa Quantity One (Bio-rad). Se incluyó un marcador de peso molecular para estimar el peso molecular de las proteínas detectadas (Protein Marker VI (10-245) prestained, PanReac, Applchem, Barcelona). La homogeneidad de carga en todos los carriles se verificó mediante β -actina (A5441, Sigma).

Análisis histológicos e inmunohistoquímicos

Las arterias coronarias y válvulas aórticas humanas y las muestras vasculares de ratón (raíz aórtica, arco aórtico y arteria braquiocefálica) se fijaron en paraformaldehído al 4% y se incluyeron en parafina (arterias coronarias y válvulas aórticas humanas y arterias braquiocefálicas murinas) o bien se congelaron y embebieron en OCT (muestras vasculares de ratón). Se prepararon secciones de las muestras parafinadas que se desparafinaron y rehidrataron en un gradiente de alcoholes y se lavaron con agua destilada. Se realizó el desenmascaramiento de epitopos mediante tampón citrato 10 mM (pH 6,0) en un baño con agua en ebullición durante 20 min. A su vez, las microsecciones de muestras embebidas en OCT se atemperaron, se fijaron con acetona fría 10 min y se lavaron con PBS. A continuación, las secciones de incubaron al 3% en una solución de H_2O_2 diluida en metanol durante 30 min para bloquear la actividad de peroxidasa endógena. Seguidamente las secciones se expusieron a suero normal al 10%, se bloqueó la avidina y la biotina endógena (Vector Laboratories, Burliname, CA, EE.UU.) y se incubaron con un anticuerpo primario específico dirigido contra LOX (1/100; ab31238, Abcam) y RUNX2 (1/100; ab23981, Abcam). Al día siguiente, las preparaciones se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado adecuado y a continuación con el reactivo Vectastain (ABC) avidin-biotin peroxidase complex (Vector Laboratories) durante 30 min. Finalmente, se incubaron con 3,3'-diaminobenzidina (DAB), se contratiñeron con hematoxilina, se deshidrataron y se montaron con DPX. En paralelo, se realizaron controles negativos en los que se omitió el anticuerpo primario para excluir la señal inespecífica.

Se realizaron análisis histológicos mediante tinción con *Oil Red O* (ORO) y con rojo de alizarina al 1% en secciones embebidas en OCT de la raíz aórtica, el arco aórtico y la arteria braquiocefálica para analizar el contenido lipídico y la calcificación de la lesión aterosclerótica, respectivamente. Para visualizar el área calcificada en secciones de válvulas aórticas humanas se utilizó la tinción de Von Kossa.

Análisis estadístico

Los resultados se muestran como media \pm error estándar de la media (SEM). Las pruebas estadísticas para determinar diferencias significativas fueron la prueba t de Student, el análisis de ANOVA de una vía o de dos vías, o bien la comparación de múltiples grupos siguiendo el análisis de ANOVA de dos vías con medidas repetidas con la corrección *post-hoc* de Tukey. Los datos fueron analizados mediante el software GraphPad Prism (versión 8.0.2). Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados

La expresión de la LOX está aumentada en lesiones ateroscleróticas de pacientes y de modelos animales

Los análisis inmunohistoquímicos realizados en arterias coronarias humanas sin lesión revelaron la fuerte expresión de la LOX en el endotelio vascular que fue prácticamente indetectable en la capa media de estas muestras. En cambio, en las arterias coronarias con lesiones ateroscleróticas se detectó una intensa señal para la LOX en la neointima engrosada rica en CMLV (fig. 1A). Análogamente, caracterizamos la expresión de esta enzima en dos modelos murinos de aterosclerosis. Como se observa en las figuras 1B y 1C, la LOX se detectó en la neointima de las lesiones ateroscleróticas desarrolladas en la arteria braquiocefálica de animales C57BL/6J transducidos con PCSK9^{D374Y} alimentados con dieta aterogénica (fig. 1B), así como en las CMLV de las placas de ateroma presentes en la raíz aórtica de ratones ApoE^{-/-} alimentados también con dieta aterogénica (fig. 1C).

La transgénesis de LOX no afecta al contenido lipídico de las lesiones ateroscleróticas

Para estudiar el papel de la LOX en la aterosclerosis y la calcificación vascular, realizamos un abordaje *in vivo* en ratones TgLOX^{CMLV} en los que se indujo hiperlipemia y aterosclerosis mediante transducción con AAV de la PCSK9^{D374Y} combinada con una dieta aterogénica¹⁷. Esta estrategia incrementó significativamente los niveles de la proteína PCSK9 humana en el plasma tanto en animales WT y TgLOX^{CMLV} transducidos con PCSK9^{D374Y} (fig. 2A), lo que se tradujo en un aumento similar de los niveles plasmáticos de colesterol total y triglicéridos en ambos grupos experimentales (fig. 2A). No se observaron diferencias en el tamaño de las lesiones en los tres lechos vasculares analizados entre animales WT y TgLOX^{CMLV} (datos no mostrados). A continuación, determinamos el impacto de la sobreexpresión de la LOX en CMLV sobre el contenido lipídico de las lesiones ateroscleróticas desarrolladas en diferentes lechos vasculares. El análisis mediante la tinción con ORO de las placas de ateroma presentes en el arco aórtico, la arteria braquiocefálica y la raíz aórtica reveló que no existían diferencias significativas en el contenido lipídico de las lesiones desarrolladas en los ratones WT y TgLOX^{CMLV} en ninguno de los lechos vasculares analizados (fig. 2B).

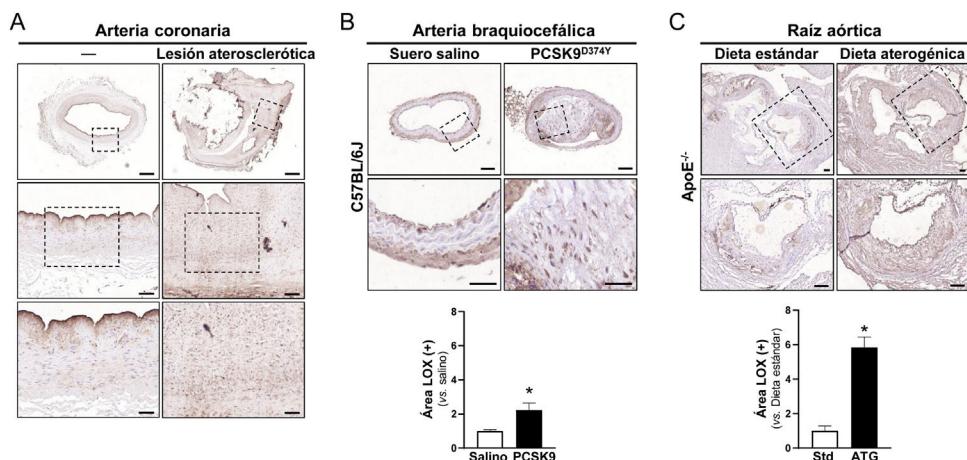


Figura 1 LOX aumenta en lesiones ateroscleróticas humanas y de modelos murinos. A) Imágenes representativas de los análisis inmunohistoquímicos para la LOX en arterias coronarias humanas sanas (izquierda) y con lesión aterosclerótica (derecha). Los paneles inferiores corresponden a la magnificación de las áreas indicadas en los paneles superiores. Barras: 500 μ m (panel superior), 100 μ m (panel central) y 50 μ m (panel inferior). B) Expresión de la LOX analizada mediante inmunohistoquímica y análisis cuantitativo de la inmunotinción de arterias braquiocefálicas de ratones C57BL/6J a los que se indujo aterosclerosis mediante transducción con PCSK9^{D374Y} y dieta aterogénica, y de arterias sin lesión de animales que recibieron suero salino (s. salino n=5, PCSK9 n=8). Barras: 100 μ m (panel superior) y 50 μ m (panel inferior). C) Imágenes representativas y cuantificación de los análisis inmunohistoquímicos para la LOX en raíces aórticas de animales ApoE^{-/-} alimentados con dieta estándar (Std) y dieta aterogénica (ATG) durante 12 semanas (n=4). Las imágenes inferiores muestran la magnificación de las áreas indicadas en los paneles superiores. Los resultados se expresan como media \pm SEM. * p < 0,01 vs. s. salino o dieta Std. Barras: 100 μ m.

El desarrollo de aterosclerosis aumenta la expresión de LOX, de mediadores inflamatorios y de marcadores de calcificación

La transducción con PCSK9^{D374Y} incrementó de forma comparable la expresión de genes implicados en el remodelado de la MEX (*Lox*, *Col1a1*) y el estrés oxidativo vascular (*Nox2*) en la aorta aterosclerótica de animales TgLOX^{CMLV} y WT (fig. 3A). En ambos grupos experimentales también se observó un aumento similar de los niveles de RNAm de diferentes mediadores de inflamación como *Il1 β* , *Il6* y *Mcp1* (fig. 3B) y de calcificación (*Runx2*, *Opn* y *Alpl*) (fig. 3C).

La transgénesis de LOX exacerbó la calcificación de las lesiones ateroscleróticas.

Aunque no detectamos diferencias en la expresión de los marcadores osteogénicos en las aortas de animales WT y TgLOX^{CMLV} transducidos con PCSK9^{D374Y}, la cuantificación de la tinción de rojo de alizarina mostró un incremento en la mineralización de las lesiones ateroscleróticas de los ratones transgénicos que sobreexpresan LOX en las CMLV, tanto en las placas de ateroma del arco aórtico (fig. 4A) como en las lesiones de la arteria braquiocefálica (fig. 4B).

La expresión de LOX aumenta en válvulas aórticas humanas muy calcificadas

Nuestros estudios previos indican que la actividad LOX es también relevante en la calcificación de la válvula aórtica¹⁷. En este estudio se analizó la expresión de los miembros de la familia LOX (LOX y las isoenzimas LOXL1-4) en válvulas

aórticas procedentes de una cohorte de pacientes sometidos a cirugía de reemplazo valvular en el HSCSP, que incluía válvulas poco y muy calcificadas (fig. 5A). No se detectaron diferencias significativas relativas a la edad, el género, el tabaquismo o el tratamiento farmacológico entre estos dos grupos de pacientes¹⁷. Como se observa en la figura 5B, en las válvulas poco calcificadas las isoenzimas que más se expresan son la LOX y la LOXL1. LOXL2 y LOXL3 muestran una expresión intermedia y LOXL4 es el miembro de esta familia que menos se expresa. En las válvulas muy calcificadas aumentaron los niveles de ARNm de LOX y LOXL2 respecto a las de menor mineralización, mientras la expresión de las demás isoenzimas no se vio afectada por el nivel de calcificación de las válvulas. Es de destacar que en las muestras que presentan una elevada calcificación, la expresión de la isoenzima LOX es significativamente superior a la del resto de miembros de esta familia (fig. 5B). En concordancia con los datos de expresión, los análisis inmunohistoquímicos reflejaron una fuerte señal de LOX en las válvulas muy calcificadas en regiones cercanas a la calcificación (zonas Von Kossa positivas). Los estudios en secciones consecutivas evidenciaron la colocalización de la LOX con el marcador de calcificación RUNX2 (fig. 5C). Tanto la expresión de LOX como la de RUNX2 fueron prácticamente indetectables en las válvulas menos calcificadas (fig. 5C).

La sobreexpresión de NOR-1 en VIC disminuyó la calcificación y la expresión de LOX

En estudios previos nuestro grupo ha descrito que el factor de transcripción NOR-1 limita la mineralización de las VIC¹³. En vista de los resultados anteriores, hemos analizado si este efecto de NOR-1 modifica la expresión de la

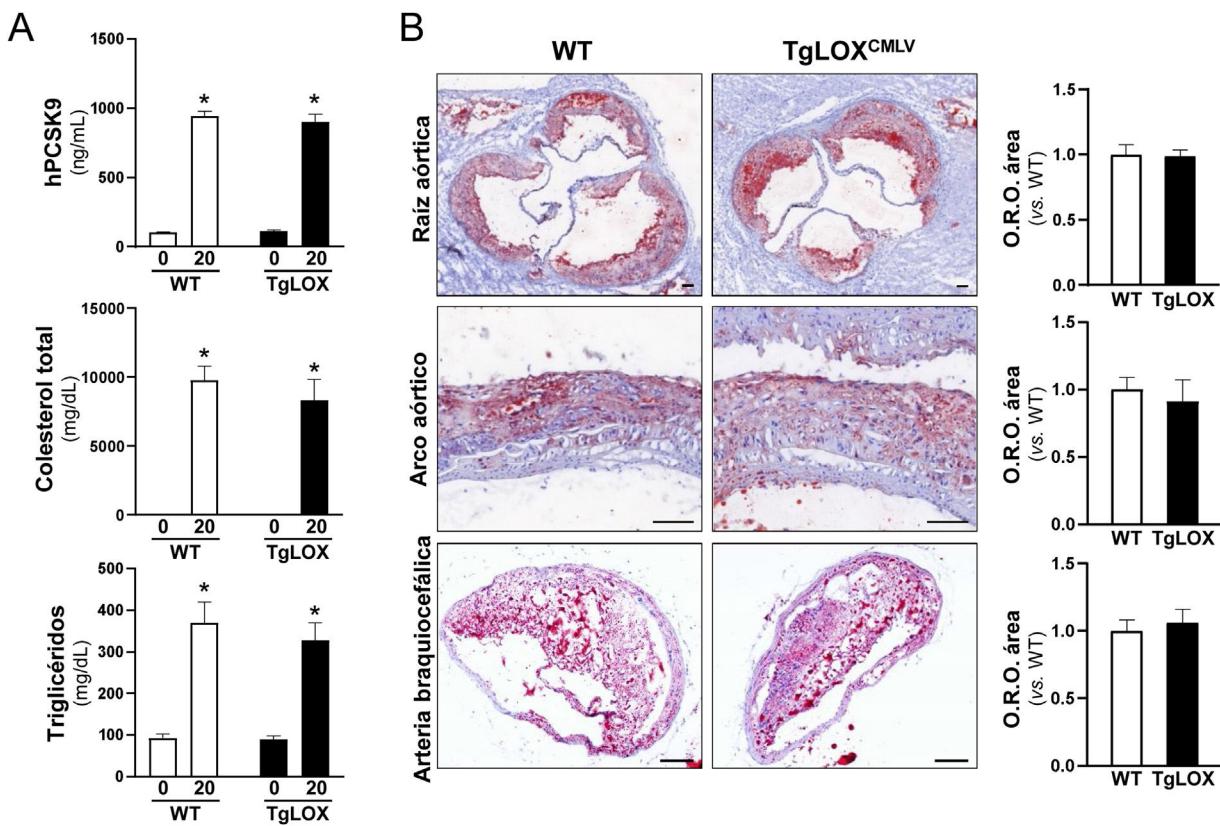


Figura 2 Impacto de la transducción con PCSK9^{D374Y} combinada con dieta aterosclerótica sobre los niveles plasmáticos de PCSK9 y de lípidos circulantes y el desarrollo de lesiones ateroscleróticas en ratón. Los ratones TgLOX^{CMLV} (barras negras) y control (WT; barras blancas) recibieron una inyección única de AAV-PCSK9^{D374Y} y se alimentaron con dieta aterogénica durante 20 semanas. A) Niveles plasmáticos de la proteína PCSK9 humana (hPCSK9) y de colesterol total y triglicéridos al inicio (0 semanas) y al final (20 semanas) del procedimiento experimental. Los resultados se expresan como media \pm SEM ($n=15$). * $p < 0.0001$ vs. $t=0$. B) Imágenes representativas de la tinción Oil Red O (ORO) y su cuantificación en secciones de raíces aórticas (panel superior, $n=15$), arco aórtico (panel central, $n=7$) y arteria braquiocefálica (panel inferior, $n=7-9$) de cada grupo experimental tras las 20 semanas de estudio. Los resultados se expresan como media \pm SEM.

LOX. En la figura 6A observamos que, como habíamos descrito anteriormente, la sobreexpresión lentiviral de NOR-1 en VIC cultivadas en un medio osteogénico limitó de manera muy significativa la deposición de calcio en comparación con las células control (transducidas con el vector pLVX vacío) y coherentemente disminuyó la expresión del marcador de diferenciación osteogénica RUNX2 (fig. 6B). Destacar que estas respuestas se asociaron con una reducción muy significativa del nivel de proteína de la LOX (fig. 6B).

Discusión

La actividad LOX es un factor determinante en el proceso de maduración de la MEX y en la fibrosis que subyace al desarrollo de múltiples patologías^{18,20}, y incide sobre la calcificación cardiovascular^{16,17}, un proceso fisiopatológico asociado a enfermedades cardiovasculares como la degeneración valvular aórtica o la enfermedad arterial coronaria, cuya prevalencia va en aumento y para la que no se dispone de herramientas farmacológicas útiles que limiten su progresión^{1,4-6,8}. Estudios recientes han implicado a la LOX en la calcificación ectópica asociada tanto al desarrollo de atherosclerosis como de la enfermedad de la válvula

aórtica^{16,17}. En este estudio, nuestros resultados han demostrado que la expresión de LOX está aumentada en las lesiones ateroscleróticas, y utilizando un modelo animal modificado genéticamente confirmamos el papel proactivo de la actividad LOX en la calcificación de la íntima de lesiones avanzadas. Además, determinamos que la sobreexpresión de LOX en las CMLV no afecta ni al tamaño ni al contenido lipídico de las lesiones ateroscleróticas experimentales pero ejerce un marcado efecto pro-calcificante, y que la disminución de esta enzima podría contribuir a la reducción de la mineralización mediada por NOR-1.

Los estudios inmunohistoquímicos realizados en arterias coronarias humanas sanas han revelado la fuerte expresión de la LOX en el endotelio vascular, como habíamos demostrado previamente en aorta porcina²⁴ y en concordancia con la contribución de esta enzima al mantenimiento de la homeostasis vascular²⁴⁻²⁷. Asimismo, nuestros análisis evidencian la fuerte expresión de la LOX en la neoíntima de las lesiones ateroscleróticas tanto en arterias coronarias humanas como en la arteria braquiocefálica y la raíz aórtica en dos modelos experimentales en los que la formación de ateromas se induce a través de distintos mecanismos. Analogamente, otros autores habían descrito que LOX se detecta

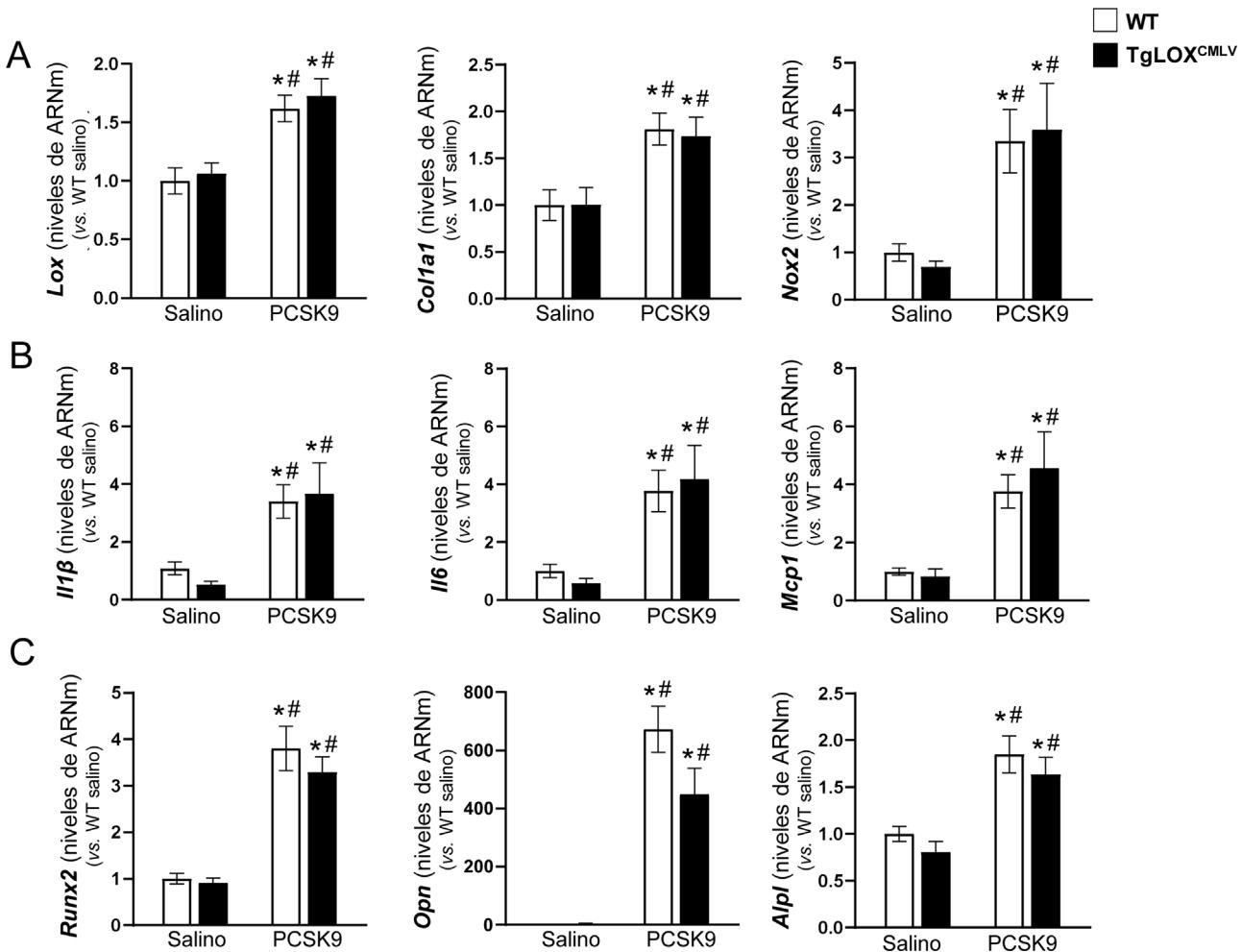


Figura 3 Expresión de genes relacionados con el remodelado de la matriz extracelular (MEX), el estrés oxidativo, la inflamación y la calcificación en aortas de ratones a los que se indujo aterosclerosis. Los ratones TgLOX^{CMLV} (barras negras) y control (WT; barras blancas) recibieron una inyección única de AAV-PCSK9^{D374Y} o suero salino y se alimentaron con dieta aterogénica durante 20 semanas. Niveles de ARNm de genes indicativos de remodelado de la MEX (*Lox* y *Col1a1*) y estrés oxidativo (*Nox2*) (A), inflamación (*Il1β*, *Il6* y *Mcp1*) (B), y marcadores de calcificación (*Runx2*, *Open* y *Alpl*) (C) en cada grupo experimental. Los resultados se expresan como media ± SEM (n = 12). p < 0,05; *vs. WT-salino; #vs. TgLOX-salino.

en las placas ateroscleróticas de endarterectomías carotídeas humanas, en regiones con fibrogénesis activa, en las que la expresión de esta enzima se vincularía con un fenotipo de placa estable²⁸. De hecho, este estudio muestra una asociación inversa entre el nivel de expresión de LOX y la incidencia de infarto de miocardio durante el seguimiento de estos pacientes, sugiriendo que la mayor expresión de la LOX podría prevenir la rotura de la cubierta fibrosa a través del incremento en el grado de maduración del colágeno de la lesión²⁸. No obstante, más allá de su mera participación en el remodelado de la MEX, esta enzima se ha vinculado con múltiples procesos a nivel cardiovascular, desde la proliferación de las CMLV y el engrosamiento de la neointima^{22,23}, hasta la rigidez arterial y el estrés oxidativo vascular^{29,30}, la hipertrofia cardiaca³¹ y, más recientemente, la calcificación cardiovascular^{16,17}.

Efectivamente, habíamos observado que la calcificación de las CMLV se asocia a un incremento en la expresión de la LOX y al consecuente aumento en la deposición de colágeno

altamente entrecruzado¹⁶. Mediante estrategias de silenciamiento y sobreexpresión génica en cultivo mostramos que la LOX no solo contribuye a la mineralización de la MEX, sino también a la transdiferenciación osteoblástica de las CMLV¹⁶. Para corroborar *in vivo* estas evidencias indujimos calcificación y aterosclerosis en ratón mediante transducción con virus adenoasociados que expresan un mutante de ganancia de función de la PCSK9 y la administración de dieta aterogénica³². Se ha demostrado que este abordaje provoca un aumento tanto de los niveles de colesterol como de los de triglicéridos³², y ha sido validado como un método útil para inducir aterosclerosis y calcificación vascular³³. De ese modo se evitó la necesidad de retrocruzar los animales TgLOX^{CMLV} con cepas hipercolesterolemicas susceptibles al desarrollo de ateromas como el ratón ApoE^{-/-} o el deficiente en receptor de las LDL^{13,17,34-37}. Ya habíamos evidenciado que la inducción de aterosclerosis y calcificación mediante esta estrategia en ratones TgLOX^{CMLV} agrava la aterosclerosis específicamente en la región de la aorta

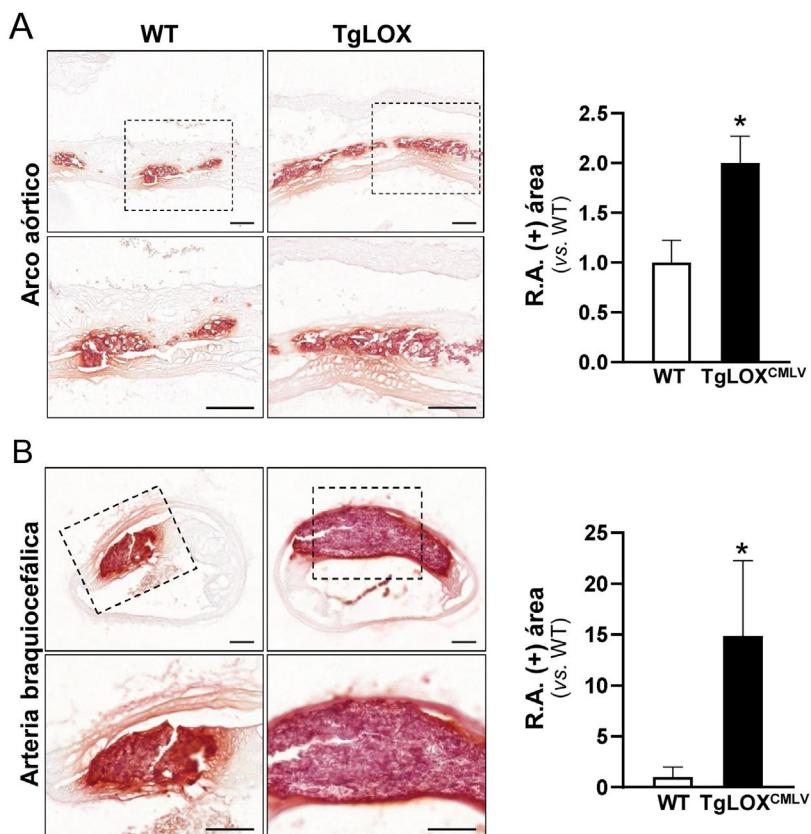


Figura 4 La sobreexpresión de LOX exacerbó la calcificación de las lesiones ateroscleróticas. A-B) Imágenes representativas de la tinción roja de alizarina (R.A.) y su cuantificación en secciones de lesiones ateroscleróticas del arco aórtico (A) y de la arteria braquiocefálica (B) de ratones WT (barras blancas) y TgLOX^{CMLV} (barras negras) transducidos con AAV-PCSK9^{D374Y} y alimentados con dieta aterogénica. Los paneles inferiores se corresponden a la magnificación de las áreas indicadas en los paneles superiores. Barras: 100 μ m. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n = 7-9). *p < 0,05 vs. WT transducido con PCSK9^{D374Y}.

abdominal¹⁷. De hecho, en el presente trabajo determinamos que la transgénesis de LOX no modifica la extensión de la lesión aterosclerótica en la raíz aórtica, el arco aórtico y la arteria braquiocefálica, confirmando los resultados previos que circunscribían el efecto pro-aterosclerótico de esta enzima a la aorta abdominal. Sin embargo, y aunque no se observaron diferencias ni en el área de la lesión ni en el contenido lipídico en dichos nichos vasculares, los animales transgénicos para la LOX mostraron una mayor deposición de calcio, como evidencia la tinción de rojo alizarina, con resultados análogos a los obtenidos mediante tinción de Von Kossa o utilizando una sonda fluorescente con afinidad por la hidroxiapatita¹⁷. La calcificación afecta de forma muy negativa al desarrollo de la lesión aterosclerótica, y lo hace, entre otros mecanismos, a través de una exacerbada inflamación vascular³⁸. El modelo de aterosclerosis/calcificación utilizado en nuestro estudio reproduce este aspecto de la patología, con una mayor expresión aórtica de mediadores inflamatorios, entre ellos MCP-1. Sin embargo, y aunque los ratones TgLOX^{CMLV} presentan una mayor deposición de calcio en la pared vascular, la inducción de mediadores inflamatorios no se vio afectada por la transgénesis de LOX, pese a que se ha descrito que esta enzima regula la expresión de MCP-1 en CMLV²². De manera análoga, tras la transducción con PCSK9, el aumento de la expresión de marcadores de diferenciación osteoblástica en

la aorta fue similar entre los animales control y los ratones TgLOX^{CMLV}.

Por otra parte, el estrés oxidativo destaca como un mediador fundamental en la calcificación vascular a través, entre otros, de la regulación de la transdiferenciación de las CMLV, la inflamación, el daño al DNA y el remodelado de la MEX³⁹. En este contexto, habíamos observado que las lesiones ateroscleróticas de los ratones TgLOX^{CMLV} presentaban mayor producción de especies reactivas de oxígeno. De hecho, la reacción catalizada por la LOX da lugar a la generación de H₂O₂ como subproducto²⁰, y diversas investigaciones, entre ellas las realizadas por nuestro grupo, han demostrado que la expresión de la LOX se asocia con un aumento del estrés oxidativo a nivel cardiovascular^{29-31,40}. En condiciones basales, las aortas de los ratones TgLOX^{CMLV} presentan niveles elevados de H₂O₂ y de anión superóxido junto a una mayor actividad NADPH oxidasa y un menor potencial de membrana mitocondrial²⁹. Aunque existe una compleja interrelación entre las diversas fuentes de especies reactivas de oxígeno en distintos contextos patológicos, como la hipertensión⁴¹, la expresión de NOX2, que se induce muy significativamente en los ratones transducidos para la PCSK9, no se ve alterada por la transgénesis de LOX, descartando que NOX2 pueda contribuir de forma relevante al mayor estrés oxidativo detectado en las lesiones de los ratones TgLOX^{CMLV}.

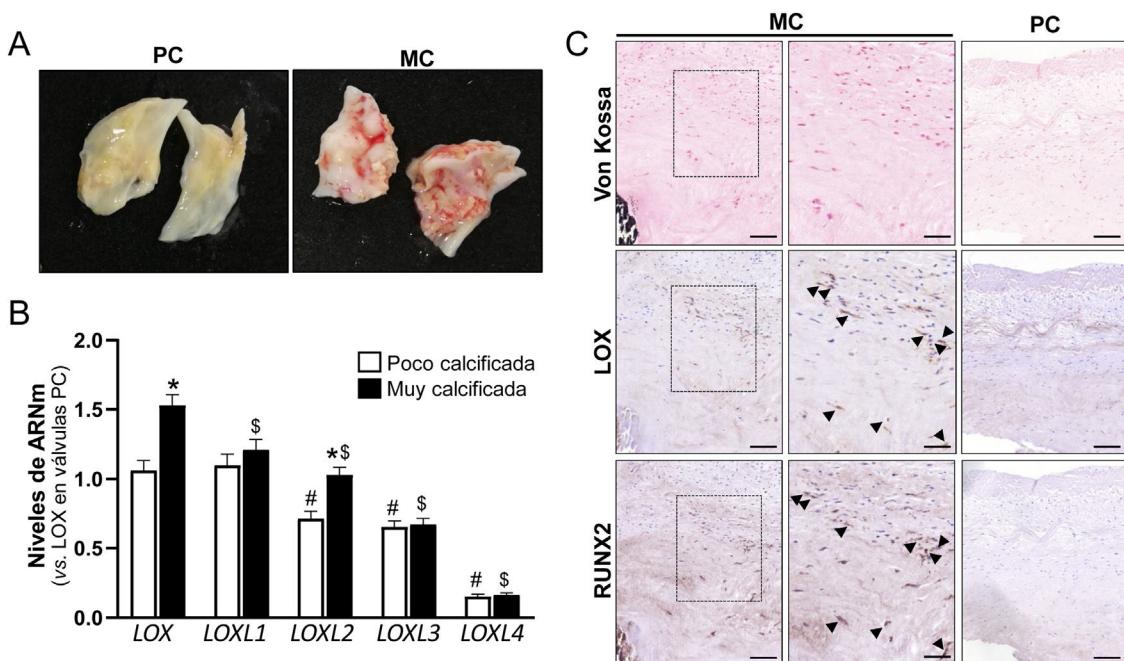


Figura 5 Expresión de LOX y de las isoenzimas LOXL-like (LOXL) en válvulas aórticas humanas con distinto grado de calcificación. A) Imágenes representativas de válvulas aórticas humanas poco (PC) y muy calcificadas (MC). B) Niveles de ARNm de LOX y LOXL1-4 en válvulas aórticas PC (n = 26; barras blancas) y MC (n = 53; barras negras). Los resultados se expresan como media \pm SEM. *p < 0,05; #vs. LOX en válvulas PC; \$vs. LOX en válvulas MC. C) Imágenes representativas de la tinción de Von Kossa y análisis inmunohistoquímicos de LOX y RUNX2 en válvulas MC y PC. Los paneles de la derecha muestran la magnificación de las áreas indicadas en las imágenes de la izquierda. Barras: 100 μ m (panel derecho e izquierdo) y 50 μ m (panel central).

En lo que respecta a la implicación de la LOX en la enfermedad de la válvula aórtica calcificada, nuestras recientes investigaciones han demostrado una mayor expresión de esta enzima en válvulas calcificadas en comparación con válvulas sanas, y que el remodelado de la MEX inducido por la actividad LOX agrava la deposición de calcio en VIC¹³. Los análisis realizados en una nueva cohorte de pacientes con enfermedad valvular evidencian que la LOX y la LOXL1 son las enzimas de esta familia más expresadas en válvulas poco calcificadas, mientras que en aquellas extensamente calcificadas la LOX es la isoenzima mayoritaria. Los análisis inmunohistoquímicos confirman la fuerte expresión de LOX en válvulas muy calcificadas, concretamente en áreas positivas para RUNX2, un factor de transcripción esencial en la calcificación, resultados que apoyan la implicación de LOX en esta enfermedad. Sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos que regulan la expresión de esta enzima en este escenario patológico. El receptor nuclear NOR-1 se ha implicado recientemente en la fisiopatología de la calcificación valvular. En concreto, este receptor nuclear regula negativamente la expresión de genes implicados en la diferenciación osteogénica de las VIC, en las que limita la mineralización de la MEX¹³. En el presente estudio observamos que la menor deposición de calcio promovida por la sobreexpresión de NOR-1 en VIC se acompaña por una reducción muy significativa no solo de RUNX2, sino también de la LOX. Estos datos sugieren que la inhibición de esta enzima podría ser uno de los mecanismos a través de los cuales NOR-1 limitaría el proceso de mineralización en estas células.

La inhibición farmacológica de la LOX mediante β -aminopropionitrilo (BAPN) había demostrado la contribución de la actividad lisil oxidasa a la mineralización de la matriz en CMLV¹⁶ y VIC¹³. Si bien la inclusión de un grupo experimental de tratamiento con BAPN en el presente estudio hubiera ratificado la relevancia *in vivo* de la LOX en este proceso, nuestros resultados apoyan la contribución de la LOX a la calcificación cardiovascular y sugieren que estrategias dirigidas a modular la actividad de esta enzima podrían ser útiles en el tratamiento de estas enfermedades.

Financiación

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación obtenida a través de la Fundación Española de Arteriosclerosis (Beca FEA 2022 Investigación Básica en Arteriosclerosis). Además, el estudio ha contado con financiación del Instituto de Salud Carlos III (PI21/01048) y del Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2021-122509OB-I00), financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y por «FEDER Una manera de hacer Europa». C.B.-S. está financiada a través de un contrato FPU (FPU19/05257, Ministerio de Universidades).

Autoría

C.B.-S y J.A. y N.R realizaron los estudios en el modelo experimental, el análisis y la interpretación de los resultados.

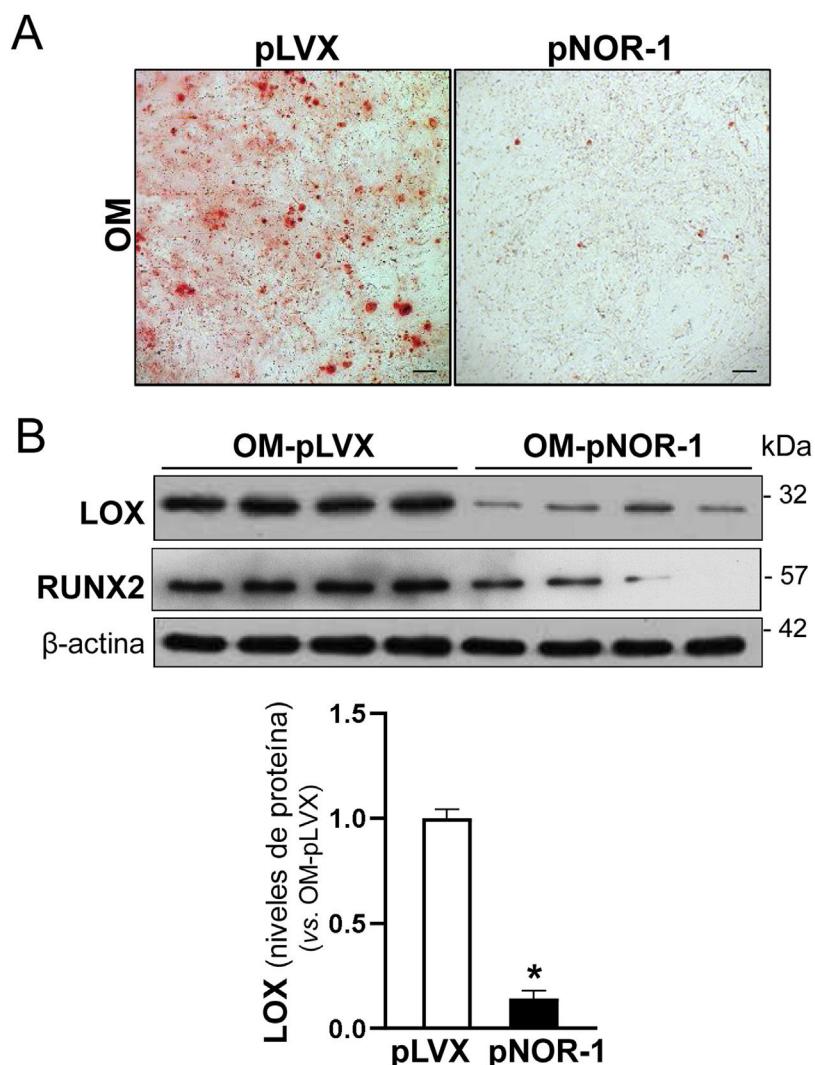


Figura 6 Efecto de la sobreexpresión de NOR-1 en células valvulares intersticiales (VIC) sobre la calcificación y la expresión de la LOX. Las células valvulares intersticiales (VIC) se transdijeron con un vector lentiviral para sobreexpresar NOR-1 (pLVX/NOR-1, pNOR-1) o con el vector lentiviral vacío (pLVX) y se incubaron en medio osteogénico (OM). A) Imágenes representativas de la tinción de rojo de alizarina en VIC transducidas con pNOR-1 o pLVX y expuestas a OM. B) Imágenes representativas del análisis por Western Blot de los niveles de proteína de LOX y RUNX2 en estas células. El gráfico de barras muestra la cuantificación densitométrica de los niveles de LOX en células transducidas con pLVX (barras blancas) y pNOR-1 (barras negras). Los resultados se expresan como media \pm SEM ($n = 4$). * $p < 0.05$ vs. VIC transducidas con pLVX expuestas a OM.

M.T. contribuyó a los aspectos clínicos del estudio, el análisis e interpretación de los datos y la revisión crítica del contenido. J.M.-G. y C.R realizaron la concepción y el diseño del estudio y la redacción del manuscrito.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Hutcheson JD, Goetsch C, Rogers MA, Aikawa E. Revisiting cardiovascular calcification: A multifaceted disease requiring a multidisciplinary approach. *Semin Cell Dev Biol.* 2015;46:68-77, <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.09.004>.
- Kelly-Arnold A, Maldonado N, Laudier D, Aikawa E, Cardoso L, Weinbaum S. Revised microcalcification hypothesis for fibrous cap rupture in human coronary arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:10741-6, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1308814110>.
- Greenland P, Blaha MJ, Budoff MJ, Erbel R, Watson KE. Coronary calcium score and cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol.* 2018;72:434-47, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2018.05.027>.
- Yi B, Zeng W, Lv L, Hua P. Changing epidemiology of calcific aortic valve disease: 30-year trends of incidence, prevalence, and deaths across 204 countries and territories. *Aging.* 2021;13:12710-32, <http://dx.doi.org/10.18632/aging.202942>.
- Shu S, Yang Y, Sun B, Su Z, Fu M, Xiong C, et al. Alerting trends in epidemiology for calcific aortic valve disease, 1990-2019: An age-period-cohort analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes.* 2023;9:459-73, <http://dx.doi.org/10.1093/ehjqcco/qcad018>.

6. Lindman BR, Sukul D, Dweck MR, Madhavan MV, Arsenault BJ, Coylewright M, et al. Evaluating medical therapy for calcific aortic stenosis: JACC state-of-the-art review. *J Am Coll Cardiol.* 2021;78:2354–76, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2021.09.1367>.

7. Rogers MA, Aikawa E. Cardiovascular calcification: Artificial intelligence and big data accelerate mechanistic discovery. *Nat Rev Cardiol.* 2019;16:261–74, <http://dx.doi.org/10.1038/s41569-018-0123-8>.

8. Moncla LM, Briand M, Bossé Y, Mathieu P. Calcific aortic valve disease: Mechanisms, prevention and treatment. *Nat Rev Cardiol.* 2023;20:546–59, <http://dx.doi.org/10.1038/s41569-023-00845-7>.

9. Sun Y, Byon CH, Yuan K, Chen J, Mao X, Heath JM, et al. Smooth muscle cell-specific runx2 deficiency inhibits vascular calcification. *Circ Res.* 2012;111:543–52, <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.267237>.

10. Dharmarajan S, Speer MY, Pierce K, Lally J, Leaf EM, Lin ME, et al. Role of Runx2 in calcific aortic valve disease in mouse models. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:687210, <http://dx.doi.org/10.3389/fcvm.2021.687210>.

11. Martínez-González J, Cañes L, Alonso J, Ballester-Servera C, Rodríguez-Sinovas A, Corrales I, et al. NR4A3: A key nuclear receptor in vascular biology, cardiovascular remodeling, and beyond. *Int J Mol Sci.* 2021;22:11371, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22111371>.

12. Martínez-González J, Cañes L, Alonso J, Ballester-Servera C, Rodríguez-Sinovas A, Corrales I, et al. Nuclear receptor NOR-1 (Neuron-derived Orphan Receptor-1) in pathological vascular remodelling and vascular remodelling. *Clin Investig Arterioscler.* 2022;34:229–43, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arteri.2022.03.002>.

13. Ballester-Servera C, Cañes L, Alonso J, Puertas-Umbert L, Vázquez-Sufuentes P, Taurón M, et al. Upregulation of NOR-1 in calcified human vascular tissues: Impact on osteogenic differentiation and calcification. *Transl Res.* 2023;264:1–14, <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2023.09.004>.

14. Zhang J, Ji Y, Jiang S, Shi M, Cai W, Miron RJ, et al. Calcium-collagen coupling is vital for biomineralization schedule. *Adv Sci (Weinh).* 2021;8:e2100363, <http://dx.doi.org/10.1002/advs.202100363>.

15. Di Vito A, Donato A, Presta I, Mancuso T, Brunetti FS, Mastro-roberto P, et al. Extracellular matrix in calcific aortic valve disease: Architecture, dynamic and perspectives. *Int J Mol Sci.* 2021;22:913, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms220913>.

16. Jover E, Silvente A, Marín F, Martínez-González J, Orriols M, Martínez CM, et al. Inhibition of enzymes involved in collagen cross-linking reduces vascular smooth muscle cell calcification. *FASEB J.* 2018;32:4459–69, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.201700653R>.

17. Ballester-Servera C, Alonso J, Cañes L, Vázquez-Sufuentes P, Puertas-Umbert L, Fernández-Celis A, et al. Lysyl oxidase-dependent extracellular matrix crosslinking modulates calcification in atherosclerosis and aortic valve disease. *Biomed Pharmacother.* 2023;167:115469, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioph.2023.115469>.

18. Rodríguez C, Martínez-González J. The role of lysyl oxidase enzymes in cardiac function and remodeling. *Cells.* 2019;8:1483, <http://dx.doi.org/10.3390/cells8121483>.

19. Martínez-González J, Varona S, Cañes L, Galán M, Briones AM, Cachofeiro V, et al. Emerging roles of lysyl oxidases in the cardiovascular system: New concepts and therapeutic challenges. *Biomolecules.* 2019;9:610, <http://dx.doi.org/10.3390/biom9100610>.

20. Rodríguez C, Rodríguez-Sinovas A, Martínez-González J. Lysyl oxidase as a potential therapeutic target. *Drug News Perspect.* 2008;21:218–24, <http://dx.doi.org/10.1358/dnp.2008.21.4.1213351>.

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, <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvn102>.

22. Orriols M, Guadall A, Galán M, Martí-Pàmies I, Varona S, Rodríguez-Calvo R, et al. Lysyl oxidase (LOX) in vascular remodelling. Insight from a new animal model. *Thromb Haemost.* 2014;112:812–24, <http://dx.doi.org/10.1160/TH14-01-0024>.

23. Varona S, Orriols M, Galán M, Guadall A, Cañes L, Aguiló S, et al. Lysyl oxidase (LOX) limits VSMC proliferation and neointimal thickening through its extracellular enzymatic activity. *Sci Rep.* 2018;8:13258, <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-31312-w>.

24. Rodríguez C, Alcudia JF, Martínez-González J, Guadall A, Raposo B, Sánchez-Gómez S, et al. Statins normalize vascular lysyl oxidase down-regulation induced by proatherogenic risk factors. *Cardiovasc Res.* 2009;83:595–603, <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvp136>.

25. Rodríguez C, Alcudia JF, Martínez-González J, Raposo B, Navarro MA, Badimon L. Lysyl oxidase (LOX) down-regulation by TNFalpha: A new mechanism underlying TNFalpha-induced endothelial dysfunction. *Atherosclerosis.* 2008;196:558–64, <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.06.002>.

26. Raposo B, Rodríguez C, Martínez-González J, Badimon L. High levels of homocysteine inhibit lysyl oxidase (LOX) and downregulate LOX expression in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2004;177:1–8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.06.015>.

27. Rodríguez C, Raposo B, Martínez-González J, Casaní L, Badimon L. Low density lipoproteins downregulate lysyl oxidase in vascular endothelial cells and the arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1409–14, <http://dx.doi.org/10.1161/01.atv.0000033818.21748.99>.

28. Ovchinnikova OA, Folkersen L, Persson J, Lindeman JH, Ueland T, Aukrust P, et al. The collagen cross-linking enzyme lysyl oxidase is associated with the healing of human atherosclerotic lesions. *J Intern Med.* 2014;276:525–36, <http://dx.doi.org/10.1111/joim.12228>.

29. Martínez-Revelles S, García-Redondo AB, Avendaño MS, Varona S, Palao T, Orriols M, et al. Lysyl oxidase induces vascular oxidative stress and contributes to arterial stiffness and abnormal elastin structure in hypertension: Role of p38MAPK. *Antioxid Redox Signal.* 2017;27:379–97, <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2016.6642>.

30. Varona S, García-Redondo AB, Martínez-González J, Salaices M, Briones AM, Rodríguez C. Vascular lysyl oxidase overexpression alters extracellular matrix structure and induces oxidative stress. *Clin Investig Arterioscler.* 2017;29:157–65, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arteri.2017.01.004>.

31. Galán M, Varona S, Guadall A, Orriols M, Navas M, Aguiló S, et al. Lysyl oxidase overexpression accelerates cardiac remodeling and aggravates angiotensin II-induced hypertrophy. *FASEB J.* 2017;31:3787–99, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.201601157RR>.

32. Lambert G, Jarnoux AL, Pineau T, Pape O, Chetiveaux M, Laboisson C, et al. Fasting induces hyperlipidemia in mice overexpressing proprotein convertase subtilisin kexin type 9: Lack of modulation of very-low-density lipoprotein hepatic output by the low-density lipoprotein receptor. *Endocrinology.* 2006;147:4985–95, <http://dx.doi.org/10.1210/en.2006-0098>.

33. Goetsch C, Hutcheson JD, Hagita S, Rogers MA, Creager MD, Pham T, et al. A single injection of gain-of-function mutant PCSK9 adeno-associated virus vector induces cardiovascular calcification in mice with no genetic modification. *Atherosclerosis.* 2016;251:109–18, <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.06.011>.

34. Bjorklund MM, Hollensen AK, Hagensen MK, Dagnaes-Hansen F, Christoffersen C, Mikkelsen JG, et al. Induction

of atherosclerosis in mice and hamsters without germ-line genetic engineering. *Circ Res.* 2014;114:1684-9, <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302937>.

35. Roche-Molina M, Sanz-Rosa D, Cruz FM, García-Prieto J, López S, Abia R, et al. Induction of sustained hypercholesterolemia by single adeno-associated virus-mediated gene transfer of mutant hPCSK9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35:50-9, <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303617>.

36. Singla B, Aithbathula RV, Pervaiz N, Kathuria I, Swanson M, Ekuban FA, et al. CD47 activation by thrombospondin-1 in lymphatic endothelial cells suppresses lymphangiogenesis and promotes atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2023;43:1234-50, <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.122.318904>.

37. Cao D, Khan Z, Li X, Saito S, Bernstein EA, Victor AR, et al. Macrophage angiotensin-converting enzyme reduces atherosclerosis by increasing peroxisome proliferator-activated receptor α and fundamentally changing lipid metabolism. *Cardiovasc Res.* 2023;119:1825-41, <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvad082>.

38. Waring OJ, Skenteris NT, Biessen EAL, Donners MMPC. Two-faced Janus: The dual role of macrophages in atherosclerotic calcification. *Cardiovasc Res.* 2022;118:2768-77, <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvab301>.

39. Hu CT, Shao YD, Liu YZ, Xiao X, Cheng ZB, Qu SL, et al. Oxidative stress in vascular calcification. *Clin Chim Acta.* 2021;519:101-10, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2021.04.012>.

40. Valls-Lacalle L, Puertas-Umbert L, Varona S, Martínez-González J, Rodríguez C, Rodríguez-Sinovas A. Human lysyl oxidase over-expression enhances baseline cardiac oxidative stress but does not aggravate ros generation or infarct size following myocardial ischemia-reperfusion. *Antioxidants (Basel).* 2021;11:75, <http://dx.doi.org/10.3390/antiox11010075>.

41. Dikalov SI, Nazarewicz RR. Angiotensin II-induced production of mitochondrial reactive oxygen species: Potential mechanisms and relevance for cardiovascular disease. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19:1085-94, <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2012.4604>.