





## **Doctorando:**

Pedro Molina Sánchez

## **Director de tesis:**

Vicente Andrés García

## **Título de la tesis:**

Papel de la fosforilación de p27 en la serina 10 en la función endotelial y el remodelado vascular patológico

## **Programa de doctorado:**

Doctorado en Biotecnología  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**Centro Nacional de  
Investigaciones  
Cardiovasculares – Carlos III**



**Universitat de València  
Departament de Bioquímica i  
Biología Molecular**



Portada: Fotografía de un leucocito rodando sobre una arteriola del músculo cremaster de ratón. La trayectoria del leucocito viene indicada por el color de la célula, siendo roja al contactar con el endotelio y volviéndose amarilla a medida que avanza por la arteriola.



El Doctor Vicente Andrés García, investigador Senior en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC),

Certifica:

Que D. Pedro Molina Sánchez, licenciado en Farmacia por la Universidad de Valencia y Máster en Biología Molecular, Celular y Genética por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral titulado: “Papel de la fosforilación de p27 en la serina 10 en la función endotelial y el remodelado vascular patológico”.

Revisado el presente trabajo, expreso mi conformidad para la presentación del mismo en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia, por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a su evaluación ante el tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctor.

En Madrid a 17 de mayo de 2015

Dr. Vicente Andrés García

Pedro Molina Sánchez





Esta tesis ha sido realizada en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares bajo la dirección del Dr. Vicente Andrés García. Pedro Molina Sánchez ha disfrutado de una beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU AP2009-0183). La realización de este trabajo ha sido financiada por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (SAF2010-16044, SAF2013-46663-R), el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y el Instituto de Salud Carlos III (RD06/0014/0021, RD12/0042/0028).



**“La verdadera ciencia no suprime nada, sino que busca las cosas que no comprende y las mira cara a cara, sin turbarse. Negar los hechos no los suprime, como cerrar los ojos.”**

***Paul Bernard (1866-1947)***

**“La verdadera generosidad hacia el futuro consiste en entregarlo todo al presente.”**

***Albert Camus (1913-1960)***



# Agradecimientos

Alegría y cierta intranquilidad. Son las dos sensaciones que siento antes de escribir estas páginas. Es alegría por terminar una etapa. Pero sobre todo lo es porque soy plenamente consciente de la suerte que he tenido de haber podido compartir esta “travesía” con *vosotros*. La intranquilidad se debe al temor de no poder transmitir lo agradecido que estoy por ello. Aun así lo voy a intentar.

Empezar agradeciendo al doctor **Vicente Andrés** la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio e introducirme en el apasionante mundo de la investigación científica. Sin duda ha sido una experiencia inolvidable y muy enriquecedora.

Quiero continuar acordándome de aquellos que ya no están en el laboratorio pero que han sido muy importantes durante mi estancia en el CNIC.

Agradecer a **José Javier Fuster** su ayuda nada más aterrizar en el laboratorio. Los primeros pasos son siempre difíciles.

A **Laia Trigueros**, por su amistad, por su apoyo en los buenos y sobre todo, en los malos momentos y por hacer del laboratorio un “hogar” para mí. Gracias.

A **Carlos Silvestre**, por su ayuda, amistad y ánimo en los primeros años de esta tesis. Y por todo lo que he aprendido trabajando con él. Es un científico como la copa de un pino. Gracias.

A **Raphaël Chèvre**. Este trabajo no podría haber sido posible sin su ayuda. Por su amistad y generosidad. Por ser uno de los máximos culpables de que estos años en Madrid hayan merecido la pena. Y por enseñarme el valor de una buena “pausa para café”. Gracias.

Y a “my friend” **Vanesa Esteban**. Por su compromiso desde el primer día que llegó al laboratorio y por su apoyo incondicional.

También quiero dar las gracias a los que están por aquí, ya sean unos auténticos veteranos o acaben de llegar.

A **José María González**, porque a pesar de ser un pesado “Premium” y de hacer las peores bromas del mundo, siempre me ha echado una mano cuando la he necesitado. Y por enseñarme la importancia de ser “crítico” para ser buen científico. Gracias.

A **Cristina Rius**, por su simpatía y por su ayuda en la realización de los experimentos de microscopía intravital y en el diseño de la portada de este trabajo. Gracias.

A **María Jesús Andrés** por estar siempre dispuesta a echarme una mano para cualquier experimento a pesar de mi falta de “previsión”. Gracias.

A **Lara del Campo** por su ayuda con los experimentos de reactividad vascular.

A **José Rivera**, por su cercanía y por sus sabios y sinceros consejos.

Y a todos los demás miembros del laboratorio. A **Marta** (de los McFly de toda la vida) a **Cristina**, a **Amanda**, a **Víctor**, a **Alberto**, a **Magda** y a **Bea**. Y a los miembros del antiguo departamento DEAIC, en especial a **Javier Mateos** (muy rico todo/ ¿dónde va el hombre?), **Eeva** y **Anabel** (aka Miss Pantallazo Azul).

También quiero acordarme de **Sara**, **Paola** y **Rosella**, mis chicas napolitanas de prácticas con las que he podido conocer la parte “docente” de este trabajo. *E perché grazie a loro, io parlo italiano come un vero maestro!*

Al laboratorio de **Andrés Hidalgo**. Primero como grupo, por “adoptarme” como uno más. Y por supuesto, a cada uno de sus miembros en particular. A Andrés por sus consejos, tanto científicos como personales, por demostrar siempre su interés en lo que hago y por animarme a seguir en “esto”. A **Magdalena Leiva**, a **Juan Antonio Quintana** (está pasando), a **Georgiana**, a **José María** y a **Ángel**. Y aunque ya no estén a **Linnea** y a **Christophe Pitaval** (...mariquita). Por último y muy especialmente a dos personas.

A **Noelia Alonso**, por su apoyo incondicional y su amistad que espero sea para muchos años y a **María Casanova**, que ha sido mi familia desde que llegué a Madrid. Gracias.

Quiero también dar las gracias a la unidad de animalario del CNIC, a todos sus técnicos, y sobre todo a **Virginia Zorita**. Sin ella la gestión de colonias de ratones hubiera sido imposible. Si lees esto, ve pensando en matar.

Agradecer a todo el laboratorio de **Juan Miguel Redondo** (aka David Bowie) por su ayuda para la realización de muchos de los experimentos que se muestran en este trabajo. En especial a **Nerea Méndez** que ha sido una buena “socia” todo este tiempo.

Al laboratorio de **Borja Ibáñez**. A **Jaime García-Prieto** y **David Sanz** por su compañerismo desde el primer día que llegué al CNIC y por estar siempre dispuestos a ayudarme en lo que necesitase.

A todas las unidades técnicas del CNIC con las que he tenido el placer de trabajar y aprender. Y a los científicos con los que he tenido el privilegio de colaborar estos años, sobre todo a **Mercedes Ferrer** y a **José Luis Martín Ventura**.

Ya termino. Fuera del ámbito científico quiero agradecer a los que son mis amigos desde hace ya diez años. A Amanda García por su apoyo durante los primeros años de la tesis. Y a todos los que forman parte de mi vida, bien en el día a día o, por desgracia, en el día a día “cuando nos vemos”. Espero que

sepan lo importantes que han sido y que son. Siempre. A **Manu, Raimon, Guille, Carlos, Jorge, César y Elena** (sí Elena Puig, tú también). Por ser “mi gente”. Gracias de corazón.

Y por último, pero no menos importante, a toda mi familia. En especial, a mis tíos/padrinos **Manoli y Juande** y por su puesto a **mis padres Pilar y Pedro**. Sin ellos, imposible. Gracias.

*“Our separation so abides and flies  
That thou, residing here, goes yet with me,  
And I, hence fleeting, here remain with thee.”*

*Antony and Cleopatra  
William Shakespeare*

Muchas gracias a todos

**Pedro Molina Sánchez**









# ÍNDICE GENERAL

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>25</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>29</b>
<b>1. Sistema cardiovascular .....</b>	<b>31</b>
<b>1.1 Componentes vasculares y estructura de la pared arterial.....</b>	<b>31</b>
<b>1.2 La aorta. Estructura anatómica .....</b>	<b>34</b>
<b>1.3 El endotelio vascular .....</b>	<b>35</b>
1.3.1 Tráfico de leucocitos y control inflamatorio. Reclutamiento leucocitario .....	37
1.3.1.1 Captura y rodamiento .....	37
1.3.1.2 Adhesión firme y parada.....	39
1.3.1.3 Diapédesis .....	39
1.3.2 Regulación del tono vascular mediada por el endotelio .....	40
1.3.2.1 Factores reguladores de la contractilidad vascular liberados por el endotelio .....	41
<b>1.4 Remodelado patológico de la pared vascular.....</b>	<b>47</b>
1.4.1 Aterosclerosis .....	47
1.4.1.1 Fisiopatología de la aterosclerosis .....	48
1.4.1.2. Modelos de estudio de aterosclerosis. El ratón apoE-/-.....	50
1.4.2. Aneurisma Aórtico Abdominal (AAA).....	52
1.4.2.1 Fisiopatología del AAA .....	52
1.4.2.2 Modelos de estudio del AAA. El modelo de infusión de AngII en ratones apoE-/-	55
<b>2. El supresor tumoral p27 .....</b>	<b>57</b>
<b>2.1 El ciclo celular en mamíferos: Conceptos generales.....</b>	<b>57</b>
<b>2.2 Regulación del ciclo celular.....</b>	<b>58</b>
<b>2.3 p27: Generalidades y función .....</b>	<b>62</b>
2.3.1 Otras funciones de p27.....	64
2.3.2 Modificaciones postraduccionales de p27. Fosforilación de p27 en la S10 .....	65
2.3.3 p27 y enfermedad cardiovascular.....	68

<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>71</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>75</b>
<b>1. Reactivos de uso común y fármacos utilizados.....</b>	<b>77</b>
<b>2. Líneas de ratones .....</b>	<b>78</b>
2.1 Genotipaje, mantenimiento y sacrificio .....	79
<b>3. Obtención de tejidos y células primarias de ratón .....</b>	<b>80</b>
3.1 Obtención de corazón y aorta de ratón.....	80
3.2 Obtención y cultivo de células endoteliales .....	81
3.3 Obtención de leucocitos de médula ósea .....	83
3.4 Obtención de sangre, suero y determinación de niveles de colesterol .....	83
<b>4. Análisis de extractos proteicos .....</b>	<b>84</b>
4.1 Obtención de extractos proteicos .....	84
4.2 Análisis de extractos proteicos (SDS-PAGE y Western-Blot) .....	84
<b>5. Análisis de expresión génica. PCR cuantitativa en tiempo real .....</b>	<b>89</b>
5.1 Extracción de ARN.....	89
5.2 PCR cuantitativa en tiempo real .....	90
<b>6. Ensayos de adhesión leucocito-endotelio.....</b>	<b>91</b>
6.1 <i>In vitro</i> .....	91
6.2 <i>In vivo</i> . Microscopía intravital en cremaster de ratón .....	92
<b>7. Estudios de rodamiento leucocitario en carótida de ratón.....</b>	<b>94</b>
<b>8. Estudios de reclutamiento leucocitario en aorta <i>in vivo</i>.....</b>	<b>95</b>
<b>9. Estudios de formación de placa aterosclerótica temprana .....</b>	<b>96</b>
<b>10. Análisis de poblaciones leucocitarias y moléculas de adhesión.....</b>	<b>96</b>
<b>11. Ensayos de proliferación en cultivos de células endoteliales.....</b>	<b>97</b>
<b>12. Ensayos de migración en células endoteliales en cultivo .....</b>	<b>98</b>
<b>13. Estudios de reactividad vascular <i>ex vivo</i>. Miógrafo de alambre.....</b>	<b>98</b>
<b>14. Ensayos de reactividad vascular <i>in vivo</i>.....</b>	<b>101</b>

<b>15. Determinación de moléculas vasoactivas liberadas por aorta de ratón .....</b>	<b>101</b>
<b>16. Análisis de la actividad COX en células endoteliales en cultivo .....</b>	<b>103</b>
<b>17. Medidas de presión arterial.....</b>	<b>103</b>
<b>18. Estudios de formación de AAA .....</b>	<b>104</b>
<b>19. Estudios histológicos.....</b>	<b>105</b>
19.1 Caracterización de las lesiones ateroscleróticas .....	105
19.2 Caracterización de las lesiones aneurismáticas .....	107
19.3 Estudios estructurales en aorta torácica .....	109
<b>20. Análisis estadístico.....</b>	<b>110</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>113</b>
<b>1. Papel de la fosforilación de p27-S10 en la activación endotelial y en la formación de placa aterosclerótica temprana .....</b>	<b>115</b>
1.1 La hipercolesterolemia inducida por dieta grasa reduce rápidamente la fosforilación de p27 en la S10 y promueve la expresión de moléculas de adhesión en aorta de ratón .....	115
1.2 La hipercolesterolemia induce la defosforilación de p27 en la S10 en células endoteliales de aorta de ratón <i>in vitro</i> .....	117
1.3 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 promueve la expresión de moléculas de adhesión en aorta de ratón.....	118
1.4 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta la expresión de VCAM-1 en células endoteliales de aorta de ratón.....	120
1.5 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 no modifica las poblaciones leucocitarias en sangre de ratón ni la expresión de moléculas de adhesión en leucocitos .....	120
1.6 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 incrementa la actividad de la vía de señalización RhoA/ROCK en células endoteliales de aorta de ratón .....	121
1.7 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 en el endotelio promueve la adhesión leucocitaria como consecuencia de un aumento de la actividad de la vía RhoA/ROCK y de la sobreexpresión de VCAM-1.....	122
1.8 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 incrementa el rodamiento leucocitario en carótida de ratones apoE <sup>-/-</sup> durante la aterogénesis .....	125
1.9 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 promueve el reclutamiento leucocitario en aortas de ratones apoE <sup>-/-</sup> como consecuencia de un mecanismo dependiente de RhoA/ROCK .....	126
1.10 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 promueve la formación de aterosclerosis temprana como consecuencia de un incremento de la actividad de la vía RhoA/ROCK .....	127
1.11 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 no modifica la proliferación ni la migración en células endoteliales en cultivo, pero reduce los niveles citosólicos de p27 .....	130

<b>2. Papel de la fosforilación de p27 en el control de la reactividad vascular dependiente de endotelio.....</b>	<b>132</b>
2.1 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta la expresión y la actividad de la enzima COX-2 en células endoteliales de aorta de ratón.....	132
2.2 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta la contractilidad vascular dependiente de endotelio en respuesta a fenilefrina mediante la acción de COX-2.....	133
2.3 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta la producción de tromboxano 2 mediada por COX-2 en aorta de ratón.....	137
2.4 La ausencia de fosforilación p27 en la S10 no modifica los niveles de presión arterial en ratones .....	138
2.5 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta el diámetro luminal en aortas murinas .....	139
<b>3. Papel de la fosforilación de p27 en la S10 el desarrollo de AAA.....</b>	<b>140</b>
3.1 La ausencia de fosforilación de p27-S10 promueve la formación de AAA en un modelo de ratón basado en la infusión de AngII .....	140
3.2 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 no modifica la composición de las lesiones aneurismáticas ni la presión arterial de ratones tratados con AngII.....	142
3.3 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta la expresión de COX-2 en aortas aneurismáticas .....	144
3.4 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta la expresión de MMPs en aortas murinas .....	146
3.5 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 promueve la formación de AAA en ratones por un mecanismo dependiente de COX-2 .....	147
 <b>DISCUSIÓN.....</b>	 <b>151</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>173</b>
 <b>ANEXO I</b>	
 <b>ANEXO II</b>	

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura 1.</b> Esquema general de la circulación sanguínea .....	32
<b>Figura 2.</b> Estructura de la pared arterial .....	33
<b>Figura 3.</b> Estructura anatómica de la aorta .....	35
<b>Figura 4.</b> Función endotelial .....	36
<b>Figura 5.</b> Esquema de las distintas etapas involucradas en la migración transendotelial del leucocito.....	38
<b>Figura 6.</b> Esquema de la ruta de producción de los principales agentes vasoactivos derivados del ácido araquidónico .....	43
<b>Figura 7.</b> Esquema de las principales etapas en la formación de la placa aterosclerótica.....	48
<b>Figura 8.</b> Fisiopatología del aneurisma aórtico abdominal.....	56
<b>Figura 9.</b> Regulación del ciclo celular en mamíferos.....	59
<b>Figura 10.</b> Alineamiento de las secuencias de ADNc (arriba) y proteicas (abajo) de p27 en humano y en ratón.....	63
<b>Figura 11.</b> Residuos susceptibles de fosforilación en p27. Se indican las distintas fosforilaciones descritas en p27 así como sus quinasas responsables.....	67
<b>Figura 12.</b> Microscopía intravital.....	93
<b>Figura 13.</b> Miógrafo de alambre.....	99
<b>Figura 14.</b> La hipercolesterolemia inducida por dieta grasa reduce rápidamente la fosforilación de p27 en la S10 en aorta de ratones apoE-/- .....	115
<b>Figura 15.</b> La hipercolesterolemia incrementa rápidamente la expresión de moléculas de adhesión en aorta de ratones apoE-/- .....	116
<b>Figura 16.</b> La hipercolesterolemia induce la defosforilación de p27-S10 en células endoteliales de aorta de ratón .....	117
<b>Figura 17.</b> La ausencia de fosforilación de p27 en la serina 10 incrementa los niveles de expresión de moléculas de adhesión en aorta de ratón .....	118
<b>Figura 18.</b> La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta la expresión de VCAM-1 en células endoteliales de aorta de ratón.....	119
<b>Figura 19.</b> La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 no modifica las poblaciones leucocitarias en sangre ni la expresión de moléculas de adhesión en dichas poblaciones en ratones apoE-/- .....	121
<b>Figura 20:</b> La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 activa la ruta RhoA/ROCK en células endoteliales de aorta de ratón .....	122

<b>Figura 21.</b> La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 en el endotelio promueve la adhesión leucocitaria in vitro como consecuencia de un aumento de la actividad de la vía RhoA/ROCK.	123
<b>Figura 22.</b> La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 promueve la adhesión leucocitaria in vivo como consecuencia de un aumento de la actividad de la vía RhoA/ROCK y de la sobreexpresión de VCAM-1	124
<b>Figura 23.</b> La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 incrementa el rodamiento de leucocitos en la carótida de ratones apoE-/-	125
<b>Figura 24:</b> La ausencia de la fosforilación de p27-S10 promueve el reclutamiento leucocitario en aortas de ratones apoE-/- durante la aterogénesis debido a la activación de RhoA/ROCK	126
<b>Figura 25.</b> Lesiones ateroscleróticas en seno aórtico de ratones apoE-/- tras cuatro semanas de dieta grasa	127
<b>Figura 26.</b> La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta la formación de aterosclerosis temprana debido a un incremento de la actividad de la vía RhoA/ROCK	128
<b>Figura 27:</b> La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta la expresión de VCAM-1 y la extravasación leucocitaria en aortas de ratones apoE-/- tras 4 semanas de dieta grasa	129
<b>Figura 28.</b> La ausencia de fosforilación en p27-S10 no modifica ni la proliferación ni la capacidad migratoria de células endoteliales in vitro	130
<b>Figura 29.</b> La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 se asocia con una reducción de los niveles citoplasmáticos de p27	131
<b>Figura 30.</b> La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta la expresión de la enzima COX-2 en células endoteliales de aorta de ratón	132
<b>Figura 31.</b> La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta la actividad de la enzima COX-2 en células endoteliales de aorta de ratón	133
<b>Figura 32.</b> La ausencia de fosforilación en p27-S10 aumenta la contractilidad vascular dependiente de endotelio en respuesta a fenilefrina	134
<b>Figura 33.</b> La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta la contractilidad vascular en respuesta a fenilefrina por un mecanismo dependiente de COX-2	135
<b>Figura 34.</b> La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta la producción de tromboxano A2 en aortas de ratón	136
<b>Figura 35.</b> La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta la expresión de TBXAS1 en aorta de ratón	137
<b>Figura 36.</b> La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 no modifica la presión arterial basal, ni tras tratamiento con fenilefrina en ratones	138
<b>Figura 37.</b> La ausencia de la fosforilación de p27 en la S10 aumenta el diámetro luminal en aortas murinas	140



<b>Figura 38.</b> La ausencia de fosforilación de p27-S10 promueve la formación de aneurismas aórticos abdominales en ratones tras tratamiento con AngII .....	141
<b>Figura 39.</b> La ausencia de fosforilación de p27-S10 no altera el contenido en colágeno, macrófagos y CMLVs de aneurismas aórticos abdominales de ratones tratados con AngII.....	142
<b>Figura 40.</b> La ausencia de fosforilación de p27-S10 no modifica la presión arterial en ratones tratados con AngII .....	143
<b>Figura 41.</b> La ausencia de fosforilación de p27-S10 incrementa la expresión aórtica de COX-2 en respuesta a AngII.....	145
<b>Figura 42.</b> La AngII reduce la fosforilación de p27 en la S10 y promueve la expresión de COX-2 en células endoteliales .....	146
<b>Figura 43.</b> La ausencia de fosforilación de p27-S10 promueve la expresión de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-12 en aorta de ratón .....	147
<b>Figura 44.</b> La ausencia de fosforilación de p27-S10 promueve la formación de aneurismas aórticos abdominales en ratones a través de una aumentada actividad COX-2 .....	148
<b>Figura 45.</b> Mecanismo propuesto para el agravamiento de la aterosclerosis temprana asociado a una deficiente fosforilación de p27 en la S10.....	160
<b>Figura 46.</b> Efecto de la fosforilación de p27 en la S10 en la expresión de COX-2 y su implicación en el remodelado vascular .....	167
<b>Figura 47.</b> Papel de p27 en el remodelado vascular patológico .....	169
<b>Tabla 1.</b> Principales CDKs y ciclinas en mamíferos y su función en el ciclo celular .....	61
<b>Tabla 2.</b> Fármacos empleados en los experimentos <i>in vivo</i> , <i>ex vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	78
<b>Tabla 3.</b> Cebadores empleados en el genotipaje de las distintas líneas de ratón. ....	80
<b>Tabla 4.</b> Lista de anticuerpos empleados .....	87
<b>Tabla 5.</b> Cebadores empleados para qPCR.....	91





<b>AAA</b>	Aneurisma aórtico abdominal
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>AngII</b>	Angiotensina-II
<b>apoE</b>	Apolipoproteína E
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino ( <i>bovine serum albumin</i> )
<b>CDK</b>	Quinasa dependiente de ciclina
<b>CKI</b>	Inhibidor de quinasas dependientes de ciclina ( <i>cyclin-dependent kinase inhibitor</i> )
<b>CMLVs</b>	Células de músculo liso vascular
<b>COX</b>	Ciclooxigenasa
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Agua bidestilada
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGFP</b>	Proteína fluorescente verde ( <i>Enhanced green fluorescent protein</i> )
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintasa endotelial ( <i>Endothelial nitric oxide synthase</i> )
<b>FBS</b>	Suero bovino fetal ( <i>Fetal bovine serum</i> )
<b>GMPc</b>	Guanosín monofosfato cíclico
<b>H/E</b>	Hematoxilina/Eosina
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adhesión intercelular 1 ( <i>Intercellular adhesion molecule 1</i> )
<b>IL</b>	Interleuquina

<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa inducible ( <i>Inducible nitric oxyde synthase</i> )
<b>IV</b>	Intravenoso
<b>LDLs</b>	Lipoproteínas de baja densidad ( <i>Low-density lipoprotein</i> )
<b>MCSF</b>	Factor estimulante de colonias de macrófagos ( <i>Macrophage colony stimulating factor</i> )
<b>MMP</b>	Metaloproteinasa de matriz
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PECAM-1</b>	Molécula de adhesión plaqueta/célula endotelial 1 ( <i>Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1</i> )
<b>PGD</b>	Prostaglandina
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PGES</b>	Prostaglandina E <sub>2</sub> sintasa
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaciclina
<b>PVDF</b>	Polifluoruro de vinilideno
<b>qPCR</b>	PCR cuantitativa a tiempo real
<b>ROCK</b>	Protein-quinasa asociada a Rho ( <i>Rho-associated protein kinase</i> )
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>Sel-E</b>	Selectina E
<b>Sel-L</b>	Selectina L
<b>Sel-P</b>	Selectina P
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Tromboxano A <sub>2</sub>
<b>VCAM-1</b>	Molécula de adhesión vascular 1 ( <i>Vascular cell adhesion molecule 1</i> )
<b>VLDL</b>	Lipoproteína de muy baja densidad ( <i>Very low-density liporpotein</i> )



## **Introducción**





# **1. Sistema cardiovascular**

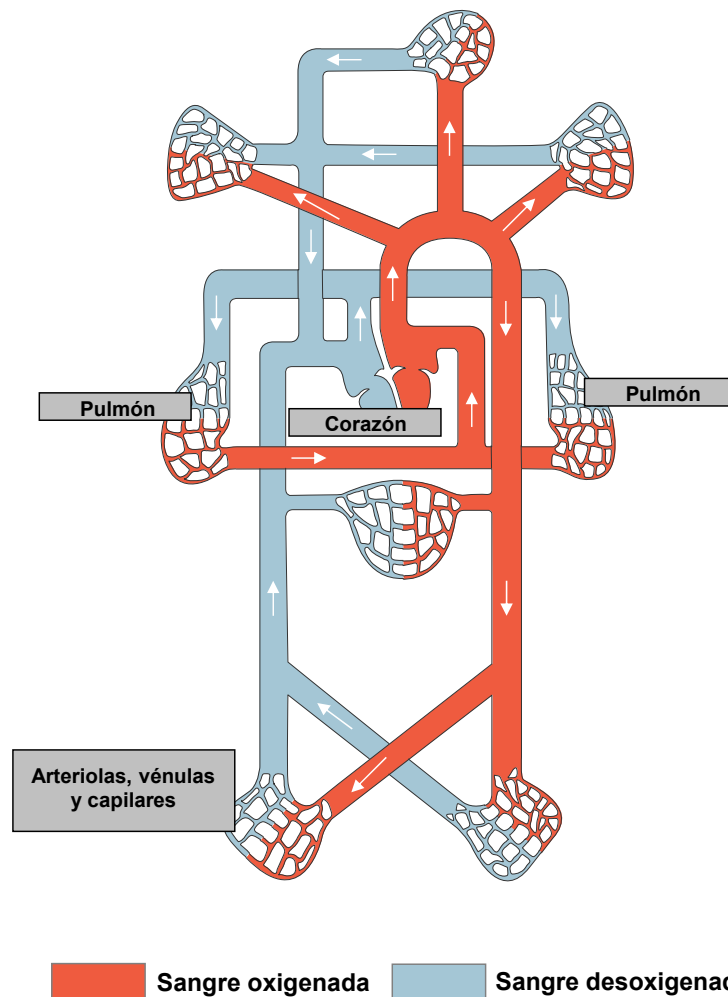
El sistema cardiovascular o circulatorio es un sistema biológico fundamental para el mantenimiento de la vida en gran número de organismos que, mediante la circulación sanguínea, permite el transporte de oxígeno y nutrientes a las células del individuo, la eliminación del dióxido de carbono, el mantenimiento del pH óptimo y el tráfico de proteínas y células del sistema inmune.

El aparato circulatorio está compuesto por el corazón, el órgano muscular encargado del bombeo de la sangre, y una red de vasos sanguíneos (arterias, venas y capilares) que conforma una estructura ramificada y organizada que posibilita el aporte de sangre a cada célula del organismo.

## **1.1 Componentes vasculares y estructura de la pared arterial**

En su viaje desde el corazón a los tejidos, la sangre pasa a través de una serie de “canales” que componen el árbol vascular, formado por vasos de seis tipos: arterias elásticas, arterias musculares, arteriolas, capilares, vénulas y venas. En este sistema, las arterias muestran una progresiva disminución en diámetro a medida que se alejan del corazón, desde unos 25 mm en la aorta de humanos, hasta 0.3 mm en arteriolas. De un modo similar, el diámetro es menor en las vénulas y aumenta progresivamente a medida que se aproxima al corazón. Las arterias son las encargadas de llevar la sangre oxigenada a los tejidos (arterias sistémicas) y la sangre desoxigenada a los pulmones para su oxigenación (arterias pulmonares). Las venas por su parte, son las encargadas del transporte de la sangre desoxigenada, salvo las venas pulmonares que llevan sangre oxigenada de los pulmones al corazón para luego ser distribuida por todo el organismo (OpenStax-College, 2013) (**figura 1**).

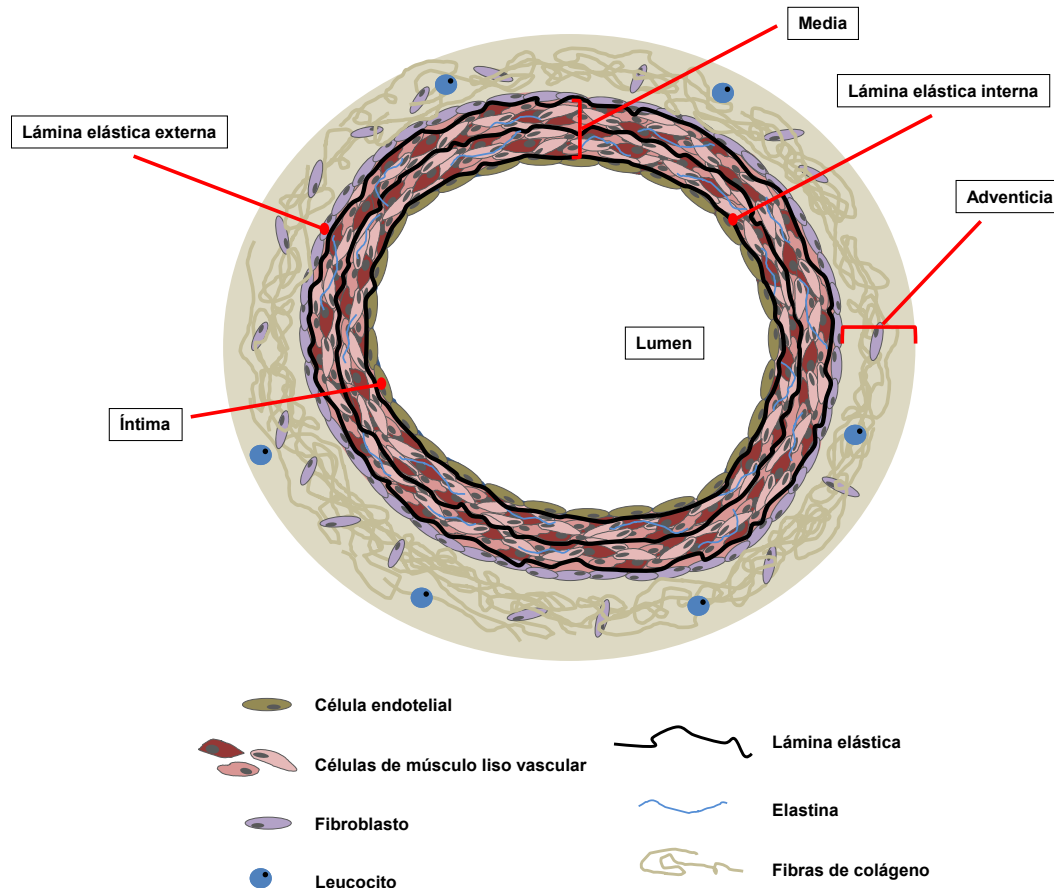
Las arterias están formadas por tres capas claramente diferenciadas denominadas, íntima, media y adventicia (**figura 2**) y cuyas características



**Figura 1. Esquema general de la circulación sanguínea.** Se representa el circuito que sigue la sangre desde el corazón a los pulmones para su oxigenación y posterior distribución a los tejidos.

definen la funcionalidad del vaso (OpenStax-College, 2013). La capa íntima, también denominada túnica íntima o simplemente “íntima”, consiste en una monocapa de células endoteliales que se encuentran en contacto directo con la sangre y cuya función abarca multitud de procesos, desde el control de la coagulación sanguínea hasta el transporte de moléculas a los tejidos. La función del endotelio vascular se explica con más detalle en el apartado 1.3 de la *Introducción*.

Bajo esta capa se encuentra la capa media o túnica media, que se subdivide en tres partes. La más externa se denomina capa elástica interna, compuesta por una gran cantidad de fibras elásticas a las que se fijan las células endoteliales. Por debajo de esta existen “olas” concéntricas de células de músculo liso vascular (CMLVs) mezcladas con fibras elásticas que se encuentran embebidas en una matriz rica en proteoglicanos (disacáridos unidos a proteínas que realizan



**Figura 2. Estructura de la pared arterial.** Esquema de la organización en capas de la pared arterial. Se observan desde el interior (lumen) hacia el exterior las capas íntima, media (incluyendo las láminas elásticas interna y externa) y adventicia, así como los principales componentes celulares y proteicos.

una función de unión en los espacios intersticiales). Por último, entre la capa de CMLVs y la adventicia existe otra capa de fibras elásticas conocida como “elástica externa” que confiere resistencia al vaso. La capa más exterior de la media es penetrada por ramas del denominado *vasa vasorum* encargado del mantenimiento biológico de dicha estructura.

Finalmente la capa más externa de la arteria es conocida como adventicia y está compuesta por fibras de colágeno dispuestas en haces dispersos, fibroblastos, fibras elásticas y, en algunos casos, por el *vasa vasorum*.

Esta descripción de la estructura arterial se ajusta muy fielmente a la existente en arterias de gran tamaño como la aorta, diseñada para actuar como reservorio de sangre y con capacidad para amortiguar la acción mecánica del bombeo

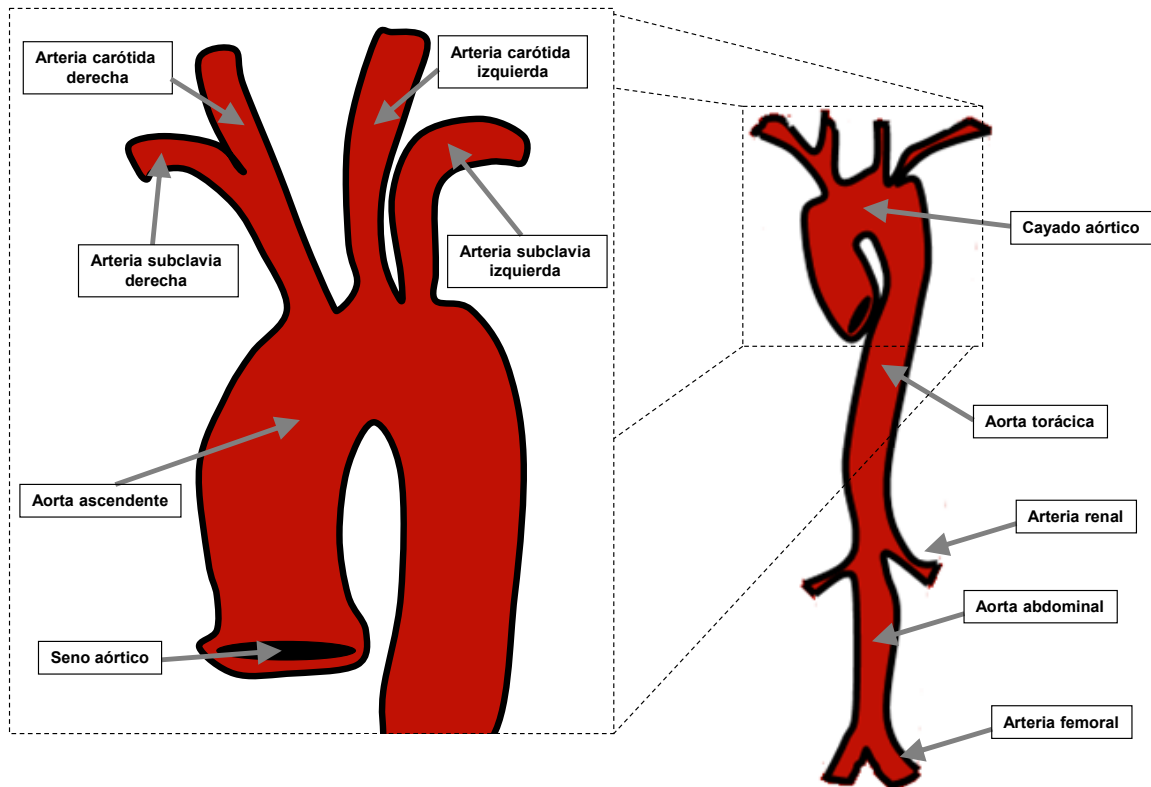
cardiaco mediante estiramiento y retroceso. Sin embargo el espesor de cada una de estas capas, así como su estructura, varía dependiendo del calibre del mismo y de la función específica que desempeñe el vaso. Por ejemplo, y a diferencia de la aorta, la pared de las arteriolas contiene menos fibras elásticas y más CMLVs, lo que les confiere una mayor capacidad contráctil, siendo las principales responsables de la resistencia periférica al flujo. Por su parte, los capilares son estructuras de muy pequeño tamaño, hasta el extremo de ser capaces de disponer a los glóbulos rojos en hileras sencillas. Como ocurre con la capa íntima arterial, la pared capilar está formada por una monocapa de células endoteliales apoyada en una membrana de soporte. La principal función de los capilares es permitir el intercambio de nutrientes y metabolitos entre la sangre y los tejidos intersticiales.

## 1.2 La aorta. Estructura anatómica

La aorta es la arteria de mayor tamaño del organismo y, debido a sus características anatómicas y estructurales, es susceptible de sufrir un importante número de procesos fisiopatológicos, algunos de los cuales son objeto de estudio en este trabajo. La aorta se divide anatómicamente en las siguientes partes (Baliga, 2014) (**figura 3**):

**Aorta ascendente**: Comprende el recorrido de la arteria desde la base del ventrículo izquierdo del corazón hasta el inicio del cayado aórtico. Esta sección contiene las denominadas válvulas aórticas, cuya función es asegurar que la sangre no vuelva al corazón tras ser expulsada.

**Cayado aórtico**: Es el segmento de la aorta que discurre entre la aorta ascendente y la aorta descendente. Posee forma de “u” invertida y es origen de tres ramificaciones fundamentales: el tronco braquicefálico, las arterias carótidas y la arteria subclavia.



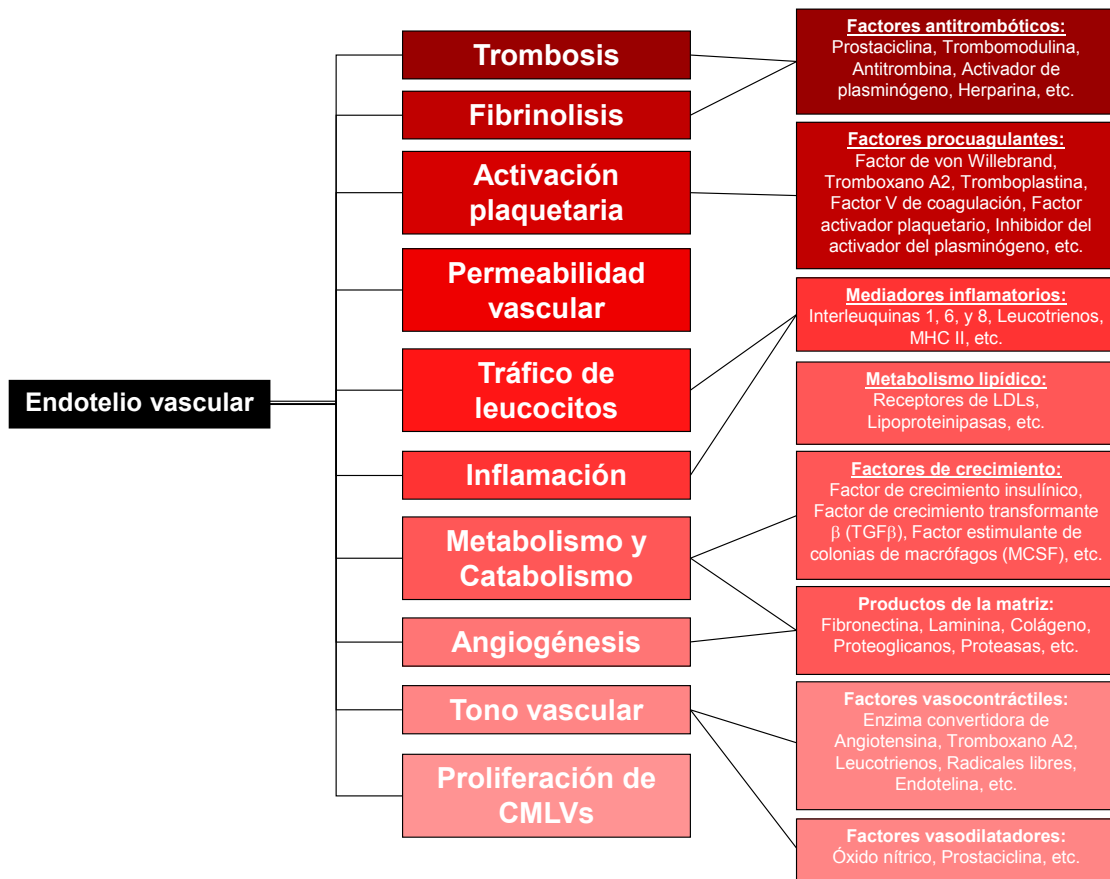
**Figura 3. Estructura anatómica de la aorta.** Esquema en el que se pueden observar las diferentes regiones a lo largo de la aorta.

**Aorta descendente:** Abarca desde el cayado aórtico a la bifurcación de las arterias femorales, y se subdivide en aorta torácica (hasta la altura del diafragma) y aorta abdominal (desde el diafragma hasta el inicio de las arterias femorales).

Igual que sucede al comparar la estructura de las arterias de distinto tamaño, la composición celular y proteica varía a lo largo de la aorta. Esto, sumado a la resistencia que debe soportar durante el ciclo cardiaco, confiere a la aorta una sensibilidad particular para desarrollar procesos patológicos (Raghavan, 2006).

### 1.3 El endotelio vascular

El endotelio vascular es el componente principal de la capa íntima y uno de los principales reguladores de la homeostasis arterial y del sistema cardiovascular en su conjunto.



**Figura 4. Función endotelial.** Resumen de los procesos regulados por el endotelio y algunas de las principales moléculas producidas por este tipo celular.

Desde su descubrimiento y hasta la década de los 70 del siglo XX, se le consideró como un elemento pasivo del vaso que simplemente ejercía de barrera de difusión para las distintas moléculas presentes en la sangre e impedía el paso de las células sanguíneas hacia la matriz vascular y los órganos. Actualmente se sabe que el endotelio juega un papel activo fundamental en el correcto funcionamiento vascular, regulando procesos tan diversos como el control de la fluidez de la sangre, la agregación plaquetaria y la coagulación sanguínea, el tono y la capacidad reactiva vascular, el control de los procesos inmunológicos e inflamatorios, o la angiogénesis. Estas funciones endoteliales son consecuencia de una notable actividad metabólica que supone la producción de una gran cantidad de moléculas con función biológica. Las principales funciones y moléculas producidas por el endotelio están resumidas en la **figura 4**.

A continuación se detallan dos de los principales procesos regulados por el endotelio vascular y que son objeto de estudio en este trabajo: la regulación del tráfico y el reclutamiento leucocitario a los tejidos y el control del tono y la capacidad reactiva del vaso.

### **1.3.1 Tráfico de leucocitos y control inflamatorio. Reclutamiento leucocitario**

La migración leucocitaria hacia los tejidos, extravasación leucocitaria o reclutamiento leucocitario, es el proceso por el que los leucocitos migran fuera del sistema circulatorio en respuesta a daños tisulares, procesos infecciosos o ante un estímulo quimiotáctico. Es por tanto un mecanismo desencadenado en respuesta a un estado patológico. Este proceso está altamente regulado y consta de una serie de etapas bien diferenciadas (**figura 5**).

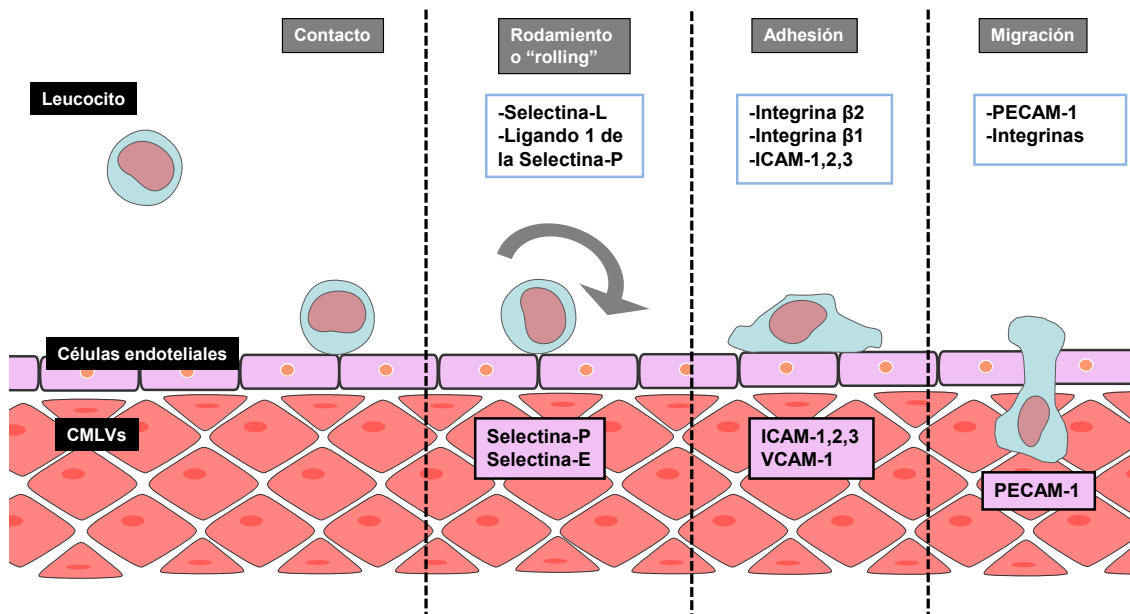
#### **1.3.1.1 Captura y rodamiento**

En condiciones fisiológicas normales (estados no inflamatorios) los leucocitos no interactúan con las células endoteliales. Para que esto ocurra se necesita previamente una activación endotelial que viene precedida por un daño local o un estado inflamatorio sistémico. Es entonces cuando el leucocito contacta íntimamente con la superficie endotelial y comienza un proceso denominado “rodamiento leucocitario”. Este fenómeno depende de la activación del endotelio y de leucocitos, proceso basado en la expresión de moléculas de adhesión pertenecientes a la familia de las selectinas. Las selectinas son glicoproteínas transmembrana de tipo I con alta homología estructural (>50%) encargadas de la interacción leucocito-endotelio y que se encuentran tanto en células sanguíneas como vasculares. En la actualidad se conocen tres tipos de selectinas: selectina-E (Sel-E), presente en el endotelio, selectina-L (Sel-L), expresada principalmente en granulocitos, monocitos y linfocitos, y selectina-P (Sel-P) descrita por primera vez en plaquetas. Las selectinas poseen un dominio extracelular responsable de

la interacción con los leucocitos y un dominio citoplasmático con funciones de señalización mediado por quinasas como ERK o MAPK.

En estado basal, las células endoteliales almacenan las Sel-P en los cuerpos de *Weibel-Palade* y solo son translocadas a la superficie celular tras su activación. Por su parte, el gen de Sel-E se mantiene constitutivamente silente y su expresión está restringida a las células endoteliales activadas. Tanto Sel-P como Sel-E median en los procesos de adhesión y rodamiento leucocitario en la zona de inflamación, lo que supone cierta redundancia funcional. Esto se ha demostrado en estudio con ratones modificados genéticamente, de modo que una deficiencia en Sel-E o en Sel-P apenas altera la adhesión leucocitaria (Kunkel, 1996), mientras que los animales dobles deficientes presentan una adhesión leucocitaria muy restringida (Bullard, 1996). El principal ligando leucocitario que interacciona con ambas selectinas es PSGL-1 (Hirata, 2000; Norman, 1995).

El rodamiento de leucocitos en la superficie endotelial establece un contacto próximo entre los dos tipos celulares y es el primer paso hacia la adhesión y parada, procesos regulados por integrinas, proteínas pertenecientes a otra



**Figura 5. Esquema de las distintas etapas involucradas en la migración transendotelial del leucocito. Se muestran las principales moléculas expresadas en cada una de las fases tanto en leucocitos como en células endoteliales.**



superfamilia de receptores de adhesión leucocitaria (Hood, 2002).

### **1.3.1.2 Adhesión firme y parada**

Los leucocitos en rodamiento son activados por quimioquinas endoteliales, lo que desencadena importantes cambios conformacionales en sus integrinas. Las integrinas interaccionan con sus ligandos endoteliales, pertenecientes a la familia de las inmunoglobulinas. Entre estas destacan la molécula de adhesión plaqueta-célula endotelial (PECAM-1), la molécula de adhesión de célula vascular (VCAM-1, o CD-106), la molécula de adhesión intracelular (ICAM-1, o CD-45) o la molécula de adhesión de unión JAM. ICAM-1 se expresa constitutivamente en células endoteliales en estado basal y media tanto el rodamiento como la adhesión de leucocitos, procesos en los que interacciona preferentemente con los antígenos LFA-1 y el antígeno de diferenciación de macrófagos 1 (Mac-1). Por su parte VCAM-1 tiene una baja expresión en células endoteliales en condiciones basales, pero se induce rápidamente por acción de mediadores inflamatorios. VCAM-1 interacciona principalmente con el ligando VLA-4 y media tanto en el rodamiento leucocitario como en la adhesión, lo que evidencia un solapamiento parcial de ambos procesos (Alon, 1995; Ley, 2001; Sans, 1999).

### **1.3.1.3 Diapédesis**

También denominada migración trans-endotelial, la diapédesis es el último paso en la migración leucocitaria hacia la matriz vascular. Ocurre preferentemente a través de las uniones entre las células endoteliales (Muller, 2003), aunque también se ha visto que los leucocitos adheridos pueden migrar a través de la propia célula endotelial (migración transcelular) (Carman, 2008). El fenómeno de la diapédesis también está controlado por moléculas de adhesión, algunas de las cuales se expresan entre las uniones inter-endoteliales. Por tanto, las integrinas leucocitarias juegan un papel no solo en la migración a través del endotelio sino también en la infiltración a través de la membrana basal subendotelial (Ley, 2006).

La migración a través las uniones entre células endoteliales implica la ruptura de los enlaces de las selectinas en la superficie endotelial y el establecimiento de nuevos enlaces en los márgenes de las células endoteliales. La activación de leucocitos produce un debilitamiento de la unión mediada por selectinas y favorece las asociaciones mediadas por integrinas. PECAM-1, CD-99 y JAM se localizan sobre todo en las uniones inter-endoteliales y contribuyen a la migración paracelular. Por su parte, ICAM-1 y VCAM-1 se expresan en altas cantidades en unas estructuras denominadas “tazas transmigratorias” (del inglés “*transmigratory cups*”), lugar específico donde se da la migración transcelular de leucocitos (Carman, 2004).

La migración leucocitaria es esencial a nivel fisiológico tanto para la respuesta inmune como para la homeostasis hematopoyética. No obstante la desregulación de este mecanismo es un elemento clave en el inicio y desarrollo de procesos fisiopatológicos vasculares, entre los que se incluye la aterosclerosis, donde el reclutamiento de leucocitos en la pared vascular es fundamental en los primeros estadios del desarrollo de la enfermedad (Mestas, 2008).

### **1.3.2 Regulación del tono vascular mediada por el endotelio**

Otro de los procesos regulados por el endotelio es el control del tono vascular. Las células endoteliales poseen gran influencia en el comportamiento de las CMLVs, alterando su capacidad contráctil por medio de la liberación de factores relajantes y contráctiles, mediante la interacción directa con dichas células o modificando la actividad proliferativa de las CMLVs (Feletou, 2008). Tradicionalmente se ha considerado que la acción del endotelio genera respuestas esencialmente vasorrelajadoras, sin embargo el endotelio es responsable de la producción de un gran número de moléculas vasoactivas con funciones dispares. A continuación se detallan las principales moléculas liberadas por el endotelio implicadas en el control del tono vascular.

### 1.3.2.1 Factores reguladores de la contractilidad vascular liberados por el endotelio

#### -Óxido nítrico (NO)

Inicialmente denominado EDRF (del inglés *Endothelium-derived relaxing factor* – Factor relajante derivado de endotelio) (Furchgott, 1980), el NO es un radical libre gaseoso con una potente acción vasodilatadora. El NO es sintetizado a partir de L-arginina por acción de la NO-sintasa de la que se conocen tres isoformas, la NO-sintasa I (o neuronal, nNOS o NOS-1) (Bredt, 1991; Bredt, 1990), la NO-sintasa II (inducible, iNOS, NOS-2) (Lyons, 1992; Yui, 1991) y la NO-sintasa III (o endotelial, eNOS, NOS-3) (Pollock, 1991; Sessa, 1992), presentes todas ellas en la pared vascular. La expresión de estas enzimas está muy extendida a nivel cardiovascular. Por ejemplo, se sabe que nNOS se expresa en los nervios perivascuales, en células endoteliales y en CMLVs (Boulanger, 1998; Gonzalez, 1997; Papapetropoulos, 1997), mientras que iNOS está presente en todas las células nucleadas del sistema cardiovascular, como células endoteliales, CMLVs, fibroblastos, leucocitos o mastocitos (Papapetropoulos, 1999). Por su parte, eNOS se expresa en todos estos tipos celulares además de miocitos cardiacos y plaquetas (Balligand, 1993; Sase, 1995). No obstante, a pesar de la importancia de todas ellas, la regulación epigenética propia del endotelio vascular hace que eNOS sea la isoforma de NO-sintasa predominante en las células endoteliales sanas (Matouk, 2008).

Debido a su naturaleza gaseosa, la acumulación celular de NO es muy complicada, por lo que su síntesis está altamente regulada para ser liberado en el momento, lugar y cantidad adecuada. La mayoría de los efectos fisiológicos del NO se asocian con la activación de la guanilil ciclasa soluble en las CMLVs (Hofmann, 2006) a través de GMPc (Surks, 2007), el cual regula la miosina-fosfatasa y la consecuente defosforilación de la cadena ligera de la miosina (Torrecillas, 2000), mecanismo responsable de la dilatación vascular.

eNOS es la isoforma de NO-sintasa predominante en el control del tono vascular. Ratones eNOS<sup>-/-</sup> carentes de esta enzima presentan una elevada presión arterial sistémica y pulmonar, además de mostrar deficiencias en la

relajación inducida por acetilcolina dependiente de endotelio (Brandes, 2000; Chataigneau, 1999; Huang, 1995). En este mismo sentido, la sobreexpresión de eNOS en ratones produce una importante hipotensión (Ohashi, 1998). Por otra parte, iNOS es la isoforma menos estudiada de la NO-sintasa, pero también juega un papel muy relevante en la vasodilatación, especialmente en estados patológicos, cuando se induce de manera muy importante (Shah, 2000).

### **-Derivados del ácido araquidónico (prostanoides)**

Un gran número de factores reguladores del tono vascular proceden del metabolismo del ácido araquidónico, del que se obtienen moléculas como prostaglandinas, prostaciclina o tromboxanos. La ruta de síntesis de los principales agentes vasoactivos derivados del ácido araquidónico se resume en la **figura 6**.

### **Prostaglandinas**

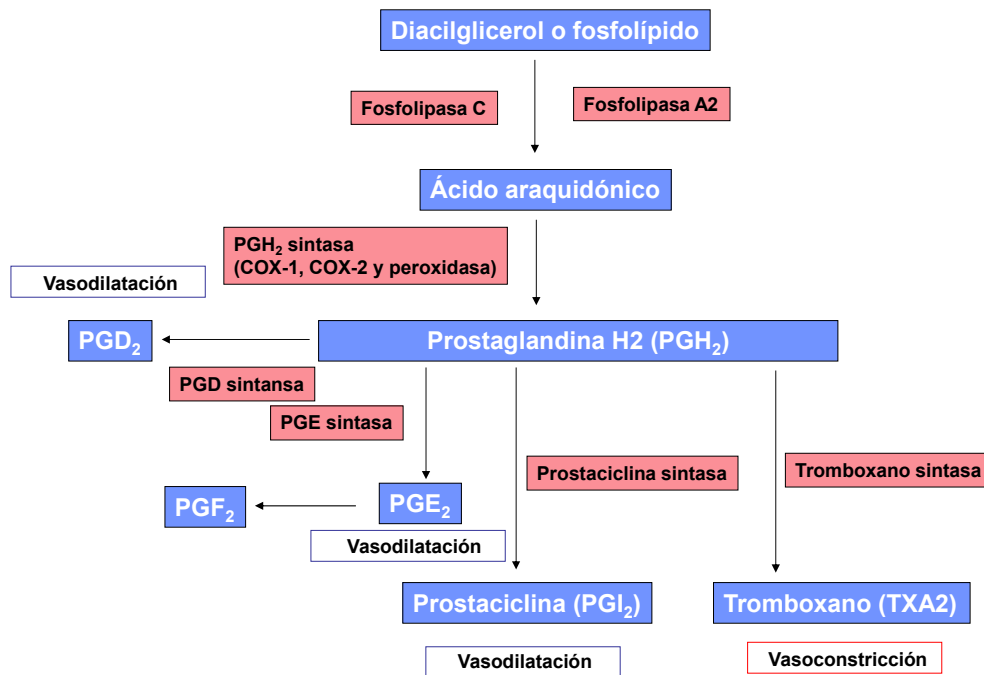
Las prostaglandinas son un conjunto de moléculas con un anillo ciclopentano en su estructura que ejercen una gran variedad de efectos (incluso contrapuestos) de gran relevancia en el control del tono y la reactividad vascular.

#### Prostaglandina D<sub>2</sub>

La prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) es una de las principales prostaglandinas presentes en el sistema nervioso central y en las células del sistema inmune. También se encuentra en la pared vascular ya que las dos clases de PGD-sintasas responsables de su síntesis se hayan en células endoteliales, donde se sobreexpresan en respuesta al estrés de cizallamiento (Taba, 2000). A nivel vascular la PGD<sub>2</sub> interacciona con los receptores DP1 y DP2 lo que provoca vasodilatación y promueve la permeabilidad vascular.

#### Prostaglandina E<sub>2</sub>

La prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) es la prostaglandina más abundante en el cuerpo humano y posee múltiples efectos fisiológicos, entre los que destacan la secreción y la motilidad gástrica, la formación ósea, la generación de dolor, la



**Figura 6. Esquema de la ruta de producción de los principales agentes vasoactivos derivados del ácido araquidónico. Se muestran tanto las moléculas activas (azul) como las enzimas encargadas de su producción (rosa).**

inflamación, la función reproductora femenina, el control de la temperatura corporal, el control del estado vigilia-sueño y la regulación de las funciones renales y de presión arterial. A nivel vascular,  $PGE_2$  posee efectos contrapuestos ya que provoca tanto relajación como contracción del músculo liso vascular. Este fenómeno puede ser atribuido a la existencia de al menos cuatro subtipos de receptores acoplados a diferentes rutas de señalización con los que interacciona  $PGE_2$  (EP – receptores de prostaglandina E; EP1, EP2, EP3 y EP4 (Hata, 2004; Legler, 2010; Park, 2006; Sugimoto, 2007)). La  $PGE_2$  es producida por acción de las ciclooxigenasas (COXs) y por tres PGE-sintasas que se expresan de manera constitutiva en multitud de tejidos y tipos celulares, una citosólica (cPGES) y dos unidas a membrana plasmática (mPGES1 y mPGES2). cPGES se asocia prioritariamente con la actividad de COX-1. Por su parte mPGES-1 se localiza en la membrana perinuclear y muestra homología significativa con la superfamilia de las proteínas asociadas a membrana responsables del metabolismo de eicosanoides y glutatión (superfamilia MAPEG). A nivel vascular, se ha descrito que esta isoforma se expresa tanto en endotelio como en músculo liso y su nivel de expresión aumenta en respuesta a estímulos que inducen la actividad de

COX-2 (Murakami, 2002). Por su parte, mPGES-2 es una proteína constitutiva asociada a la membrana de Golgi que puede acoplarse tanto a COX-1 y COX-2 (Kudo, 2005).

PGE<sub>2</sub> es ligando común de los cuatro subtipos de receptores (EP1, EP2, EP3 y EP4). La estimulación del receptor EP1 produce un incremento de la concentración de calcio intracelular y se relaciona con procesos de contracción vascular, mientras que la activación de EP2 y EP4 aumenta la cantidad de AMPc intracelular y provoca vasodilatación.

### Prostaglandina F<sub>2</sub>

Las isoformas de la prostaglandina F<sub>2</sub> (PGF<sub>2</sub>) se sintetizan a partir de la prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) por la 9-11 endoperoxidasa-reductasa asociada a membrana y a partir de PGD<sub>2</sub> por la 11-ketoreductasa citosólica y la 9-ketoreductasa (Helliwell, 2004; Watanabe, 2002). La interacción de la prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  con el receptor FP genera un aumento de la concentración intracelular de calcio. Esta prostaglandina, producida en la pared vascular (incluido el endotelio) es un potente vasoconstrictor, no solo por su acción sobre los receptores FP sino también por su interacción con los receptores TP (receptores de tromboxano).

### Prostaglandina I<sub>2</sub> (prostaciclina)

La prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) es una sustancia inestable formada por la prostaciclina sintasa, un miembro de la superfamilia de enzimas del citocromo p450. La prostaciclina sintasa se expresa en altas cantidades en células endoteliales (Tang, 2008) y está íntimamente asociada con COX-1 (Kawka, 2007) y COX-2 (Norata, 2004).

La prostaciclina es un potente vasodilatador dependiente de endotelio (Moncada, 1976; Moncada, 1977; Moncada, 1978; Radomski, 1987a, b). Se ha demostrado que la ausencia de la prostaciclina sintasa en ratones genera hipertensión con engrosamiento y esclerosis de la pared arterial (Smyth, 2002; Wu, 2005). Al contrario, su sobreexpresión, individualmente o en asociación con COX-1,

previene la hiperplasia de la íntima inducida por daño, la hipertensión pulmonar y el remodelado vascular (Geraci, 1999; Todaka, 1999).

La prostaciclina es ligando preferencial de los receptores IP, cuyo principal sistema de señalización ocurre a través de las quinasas dependientes del AMPc. La ablación genética de los receptores IP está asociada a un incremento de la restenosis inducida por daño vascular (Cheng, 2002), al incremento de episodios trombóticos (Murata, 1997), al desarrollo de aterosclerosis (Egan, 2004; Kobayashi, 2004) y al aumento de daño por reperfusión (Xiao, 2001). De igual modo, la inhibición farmacológica específica de los receptores IP bloquea la respuesta inducida por agentes vasodilatadores (Gluais, 2005; Gomez, 2008).

La prostaciclina juega un importante papel en la vasodilatación mediada por flujo (Duffy, 1998; Koller, 1993). Sin embargo, su contribución a la relajación aguda dependiente de endotelio en respuesta a mediadores neurohumorales es a veces considerada mínima, ya que los inhibidores de COX, particularmente la indometacina, no alteran estas respuestas. Por ello, el papel de la prostaciclina como un mediador endógeno responsable de la relajación dependiente de endotelio queda a veces en un segundo plano, solo evidenciándose cuando otras rutas líderes en la respuesta dependiente de endotelio son inhibidas (Corriu, 1996; Zygmunt, 1998). Un ejemplo de esto es la aumentada contribución de PGI<sub>2</sub> a las respuestas dependientes de endotelio en ratones deficientes de eNOS (Chataigneau, 1999; Sun, 1999).

La relajación en respuesta a PGI<sub>2</sub> o sus análogos sintéticos está frecuentemente asociada con una hiperpolarización concomitante de las CMLVs, proceso que puede provocar la apertura de distintos subtipos de canales de potasio contribuyendo decisivamente a la hiperpolarización en algunos tejidos (Clapp, 1998; Corriu, 2001; Li, 1997; Olschewski, 2006; Orié, 2006; Parkington, 2004).

Por último, en numerosos lechos vasculares, PGI<sub>2</sub> puede actuar no solo como un factor relajante derivado de endotelio sino como una sustancia vasoconstrictora, bien promoviendo la liberación de factores vasoconstrictores derivados del endotelio, o, a altas concentraciones, activando directamente los receptores TP del tromboxano.

### Tromboxano A<sub>2</sub>

El tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) fue descrito originalmente en plaquetas (Hamberg, 1975) como un compuesto activo intermediario en la conversión de prostaglandina G<sub>2</sub> a tromboxano B<sub>2</sub>. El TXA<sub>2</sub> es un compuesto inestable derivado de la actividad de COX-1 (Funk, 2007) y, en menor medida, de COX-2 (Grandel, 2000). Tanto las células endoteliales como las CMLVs de la pared vascular sintetizan TXA<sub>2</sub> (Feletou, 2009). El TXA<sub>2</sub> es producido enzimáticamente a partir de PGH<sub>2</sub> por la tromboxano sintasa, enzima perteneciente a la superfamilia del citocromo p450 y expresada en gran número de tejidos en mamíferos, incluyendo plaquetas, CMLVs y células endoteliales (Shen, 1998; Shiokoshi, 2002; Tang, 2008; Wang, 2002). El TXA<sub>2</sub> es ligando preferencial del receptor TP cuya transducción de señales involucra preferentemente dos tipos de proteínas G, la familia G<sub>q</sub> y la familia G<sub>α12/13</sub>.

Además de ejercer acción vasoconstrictora, el TXA<sub>2</sub> está implicado en los mecanismos reguladores de la agregación plaquetaria y de la contracción y proliferación de CMLVs, en el desarrollo de alergias, en la modulación de la inmunidad adquirida, la aterogénesis, la neovascularización y la metástasis de células cancerígenas (Nakahata, 2008).

### **-Especies reactivas de oxígeno**

Las especies reactivas de oxígeno engloban una serie de moléculas de pequeño tamaño derivadas del metabolismo del oxígeno, entre las que se encuentran peróxidos, radicales libres e iones de oxígeno. Estas moléculas ejercen una importante función en la señalización celular. En el sistema vascular, potencian la estabilidad e incrementan la densidad de receptores TP en la membrana celular de células endoteliales. La generación de eicosanoides, la estabilización post-trascricional de los receptores TP y la producción de NO son fenómenos dependientes de estas especies reactivas de oxígeno, lo que las convierte en reguladores críticos de la homeostasis vascular.



## **1.4 Remodelado patológico de la pared vascular**

Debido a la importancia del sistema cardiovascular en el mantenimiento de la vida, existen multitud de mecanismos que garantizan su correcto funcionamiento. Sin embargo estos mecanismos pueden ser sobrepasados como consecuencia de llevar hábitos de vida poco saludables o del gradual envejecimiento del organismo, lo que promueve el establecimiento de procesos fisiopatológicos desencadenantes de la enfermedad cardiovascular.

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte a nivel global. Se estima que en 2008, 17.3 millones de personas murieron debido a ellas, 7.3 millones a causa de una cardiopatía isquémica y 6.2 como consecuencia de un accidente cerebrovascular (Alwan, 2011). Lejos de reducirse, se calcula que el número de personas que morirán por alguna enfermedad cardiovascular podría superar los 23 millones en 2030 (Mathers, 2006). En términos generales, la situación en España es similar al resto del mundo. Datos de 2006 tasan en 120.000 el número de personas fallecidas en nuestro país a causa de estas enfermedades (Bertomeu, 2008), aunque la prevalencia de algunas de ellas está por debajo de la media mundial (Banegasa, 2006), en parte atribuible a ciertos hábitos de vida saludables propios de la cuenca mediterránea.

Entre las enfermedades cardiovasculares más comunes caben destacar la hipertensión, el accidente cerebrovascular, la aterosclerosis, el aneurisma o el fallo cardíaco. Muchas de ellas son consecuencia de un remodelado vascular patológico (Pasterkamp, 2000; Pasterkamp, 2004; Touyz, 2005; Ward, 2000) debido a un proceso inflamatorio local y la posterior modificación de la composición del vaso, lo que afecta negativamente a la funcionalidad del mismo (Berk, 2001).

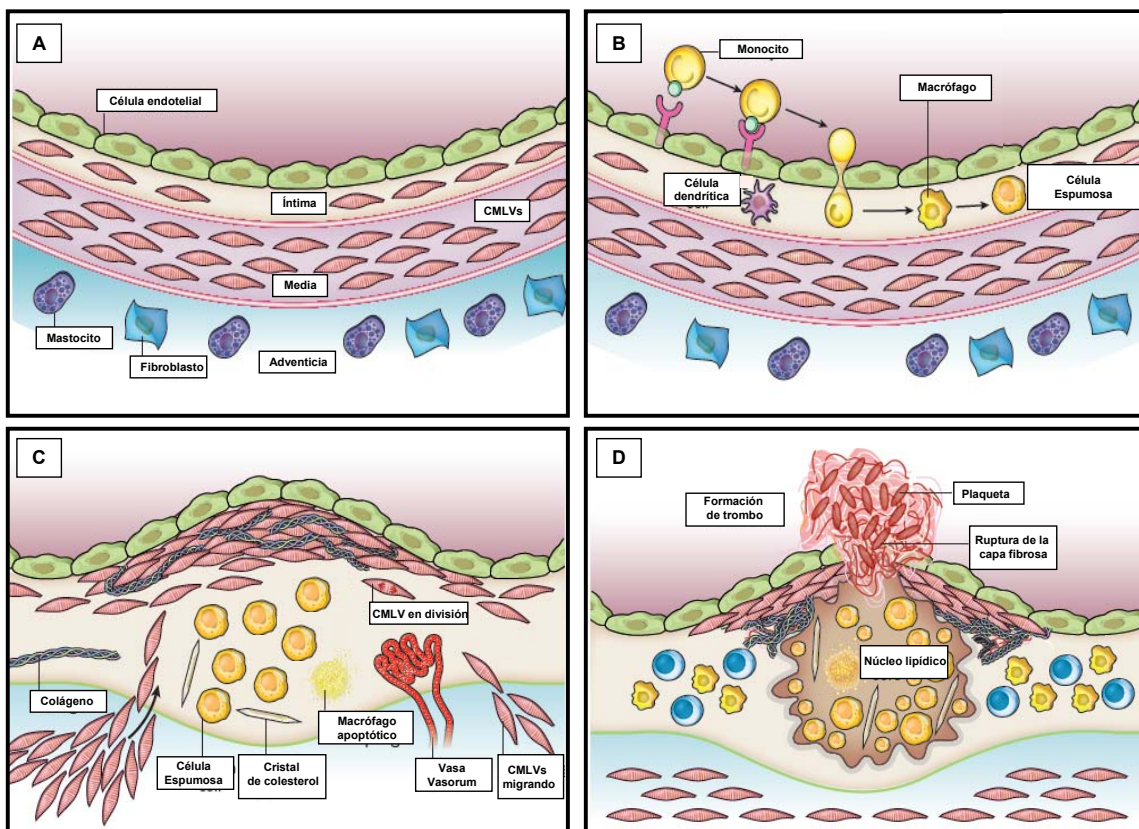
### **1.4.1 Aterosclerosis**

La aterosclerosis es una enfermedad vascular progresiva caracterizada por la acumulación de lípidos y elementos fibrosos en arterias de medio y gran tamaño.

La generación de placas ateroscleróticas conlleva la estenosis del vaso afectado y en último término, como consecuencia de su rotura, la formación de un trombo oclusivo. El proceso aterosclerótico está favorecido por una serie de factores de riesgo, entre los que se incluyen la hipertensión, el tabaquismo, la hipercolesterolemia y ciertos factores genéticos. A continuación se detallan los distintos procesos celulares y fisiopatológicos involucrados en el desarrollo de esta enfermedad.

#### 1.4.1.1 Fisiopatología de la aterosclerosis

Se considera que la presencia de altos niveles en sangre de lipoproteínas de baja densidad (LDLs - del inglés *Low-Density Lipoprotein*) es el factor desencadenante de la formación de placa de ateroma. Las LDLs atraviesan



**Figura 7. Esquema de las principales etapas en la formación de la placa aterosclerótica.** (A) Arteria en condiciones fisiológicas (B) Activación endotelial, migración leucocitaria al espacio subendotelial y formación de células espumosas (C) Crecimiento de la placa aterosclerótica como consecuencia de la migración de células de músculo liso vascular, la acumulación de células espumosas y la formación del *vasa vasorum*. (D) Rotura de la placa aterosclerótica y formación del trombo. Adaptado de "Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis" Libby P et al. Nature 2011.

pasivamente la barrera endotelial y se acumulan en la matriz vascular donde sufren procesos de modificación como lipólisis, proteólisis y oxidación. Estas LDLs modificadas poseen un importante carácter inflamatorio y son fundamentales en los procesos de activación endotelial previo al reclutamiento de leucocitos en la matriz vascular (Skalen, 2002). Como consecuencia de la acumulación de LDLs modificadas, el endotelio expresa moléculas de adhesión y libera factores de crecimiento como el factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF), lo que estimula el reclutamiento leucocitario (proceso detallado en el apartado 1.3.1 de la *Introducción*) y la actividad de monocitos y macrófagos. La producción de MCSF promueve la proliferación de los monocitos extravasados y su diferenciación a macrófagos (Smith, 1995) y favorece la expresión de receptores “basurero” encargados de retirar las LDLs oxidadas mediante su procesamiento lisosomal. El colesterol libre generado como consecuencia de este proceso es incorporado a la membrana celular de los macrófagos o bien es devuelto a la circulación sanguínea asociado a moléculas de HDL (transporte reverso de colesterol) (Tall, 2000). Cuando el macrófago no es capaz de metabolizar todas las LDLs oxidadas, el colesterol se acumula en su citosol en forma de gotas lipídicas, formando las denominadas células espumosas. Estos macrófagos poseen un comportamiento aberrante caracterizado por la liberación de un mayor número de citoquinas proinflamatorias, lo que potencia los fenómenos descritos previamente en este párrafo y favorece la progresión de la lesión (Glass, 2001; Li, 2002). Estos primeros acontecimientos conducen a la formación de placas ateroscleróticas de pequeño tamaño ricas en macrófagos, denominadas “estrías grasas” (del inglés *fatty streaks*).

La transición desde una lesión relativamente pequeña a una más compleja y de mayor tamaño se caracteriza por la proliferación de CMLVs y su migración desde la capa media de la arteria, a través de la lámina elástica interna, hasta la neóitima subendotelial. Esto sucede como consecuencia de una importante producción de mediadores inflamatorios y quimiotácticos (IL-6, IL-8, MCP-1 etc.) por parte de los leucocitos extravasados (principalmente de los macrófagos disfuncionantes). Por último, las CMLVs proliferan y captan LDLs modificadas

contribuyendo a la formación de nuevas células espumosas y a la síntesis de proteínas de matriz extracelular (Paulsson, 2000; Ross, 1999).

El principal riesgo que conlleva la formación de placa de ateroma es su posible rotura. Cuando esto ocurre se liberan al torrente circulatorio factores procoagulantes que desencadenan la formación de un trombo y la obstrucción del flujo sanguíneo. El hecho de que la placa aterosclerótica se rompa depende de su vulnerabilidad, la cual viene determinada en gran medida por la presencia de una gruesa capa de tejido conectivo denominada “capa fibrosa”. Por lo general las lesiones más vulnerables son las que tiene una capa fibrosa pequeña y un alto contenido en células inflamatorias. Sin embargo, existen placas de gran tamaño que provocan un importante grado de estenosis vascular pero son muy resistentes a la rotura (Finn, 2010). En lesiones avanzadas, la muerte de los macrófagos presentes en el núcleo aterosclerótico produce la liberación del factor tisular, desencadenante de la activación de la cascada de coagulación (Mallat, 1999; Toschi, 1997) y la liberación de distintas metaloproteinasas (Galis, 1994; Shah, 2001) que degradan la capa fibrosa y desestabilizan la placa. Otro factor que afecta a la estabilidad de la lesión es el grado de neovascularización de la misma. La formación del *vasa vasorum* no solo incrementa el tamaño de la placa aterosclerótica facilitando la llegada de nuevas células inflamatorias (Moulton, 2003) si no que, dada su baja celularidad, debilita a la placa (Jeziorska, 1999; Virmani, 1998). La formación del trombo como consecuencia de la rotura de la placa aterosclerótica es el causante final del evento isquémico asociado a la aterosclerosis (infarto de miocardio o cerebral). Las principales etapas de la aterogénesis se han resumido en la **figura 7**.

#### **1.4.1.2. Modelos de estudio de aterosclerosis. El ratón apoE<sup>-/-</sup>**

En la actualidad existen multitud de modelos animales empleados para el estudio de la aterosclerosis (Getz, 2012), pero gracias a su fácil manejo y bajo coste de mantenimiento, los modelos murinos son los más ampliamente utilizados. Pese a ello, existen claras diferencias en las características de las lesiones ateroscleróticas presentes en ratones y en humanos. Por ejemplo, los ratones suelen presentar placas de tamaño variable pero de gran estabilidad, lo que

dificulta la realización de estudios de vulnerabilidad. Además los ratones son muy resistentes a la formación de placa aterosclerótica tanto en condiciones basales como en estados hipercolesterolémicos inducidos con dieta rica en grasa. Para solventar este problema se suelen utilizar modelos modificados genéticamente basados en la alteración del metabolismo lipídico que incrementan la susceptibilidad a padecer la enfermedad. Uno de estos modelos es el ratón deficiente en apolipoproteína E (ratón apoE<sup>-/-</sup>).

La apoE es una glicoproteína sintetizada principalmente en hígado y cerebro, que se encuentra presente en todas las lipoproteínas circulantes (a excepción de las LDLs). Su función es ser ligando de receptores que eliminan los remanentes de quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLs – del inglés *Very-Low Density Lipoproteins*) en sangre. Sin embargo también se ha observado que la apoE se sintetiza en monocitos y macrófagos vasculares, lo que les confiere una importante función en la homeostasis del colesterol y en la reacción inflamatoria específica de las arterias ateroscleróticas (Curtiss, 2000).

El ratón apoE<sup>-/-</sup> fue generado independientemente por dos laboratorios mediante inactivación del gen *apoE* endógeno (Plump, 1992; Zhang, 1992). El ratón apoE<sup>-/-</sup> presenta niveles de colesterol muy superiores a los de animales silvestres ( $\cong 500$  mg/dL frente a  $\cong 100$  mg/dL, respectivamente). Este incremento de colesterol se acumula sobre todo en la fracción de VLDLs y de quilomicrones, a diferencia de lo que ocurre en ratones silvestres, cuya principal lipoproteína en sangre es la HDL. La alimentación con dieta grasa produce en ratones apoE<sup>-/-</sup> un importante incremento de colesterol sérico, pudiéndose alcanzar concentraciones de hasta 2000 mg/dL (Plump, 1992; Zhang, 1992). Como resultado de esta hipercolesterolemia, los ratones apoE<sup>-/-</sup> desarrollan de manera acelerada, placas de ateroma con características similares a las observadas en humanos (Reddick, 1994).

### **1.4.2. Aneurisma Aórtico Abdominal (AAA)**

Otra de las enfermedades asociadas a un remodelado vascular es el AAA. Un aneurisma arterial se define como una dilatación focal y definida del vaso. Los AAA son dilataciones que se generan en la aorta abdominal y que suponen un aumento de más del 50% del diámetro original (Johnston, 1991). La formación de aneurismas es muy común en la aorta abdominal debido a su localización cerca de la mayor ramificación aórtica que la expone a importantes fuerzas hemodinámicas (Zatina, 1984). Normalmente los AAA se originan en la región diafragmática y se extienden hacia la bifurcación de las arterias ilíacas derecha e izquierda, pudiendo ser de tamaño muy restringido o, por lo general, ocupando gran parte de la aorta. A diferencia de lo que sucede con la aterosclerosis, la prevalencia de AAA es relativamente baja (entorno a un 4,5% de la población total), siendo 6 veces más común en hombres que en mujeres (Norman, 2007). El principal riesgo que conlleva la formación de AAA es la posible rotura del vaso, lo que supone la muerte del individuo en el 90% de los casos (Ernst, 1993).

#### **1.4.2.1 Fisiopatología del AAA**

El proceso fisiopatológico que subyace a la formación de AAA es más heterogéneo y menos conocido que el aterosclerótico. Las lesiones aneurismáticas poseen características muy variables aunque, por lo general, se caracterizan por un importante infiltrado inflamatorio, una disminución de la matriz de elastina vascular, la pérdida de CMLVs en la capa media y el aumento compensatorio de fibras de colágeno (Ailawadi, 2003; Lopez-Candales, 1997).

Se sabe que la predisposición a la formación de AAA puede tener un origen embrionario. La síntesis de elastina en la aorta abdominal prácticamente se detiene en el momento del nacimiento por lo que cualquier alteración en la elastogénesis fetal puede tener un efecto a largo término (Norman, 2010). No obstante, la formación de AAA se ha considerado históricamente como una

manifestación local de aterosclerosis avanzada (Tilson, 1992), opinión que genera cierta controversia. La presencia de alteraciones en todo el árbol vascular en pacientes con enfermedad aneurismática (Nordon, 2009) y la aparición de aneurismas en vasos no susceptibles a aterosclerosis estarían en contra de esta hipótesis. Argumentos a favor son el hecho de que la mayoría de factores de riesgo de AAA son comunes a la aterosclerosis (hipertensión, obesidad, altos niveles de colesterol o tabaquismo) (Reed, 1992; Xu, 2001) y que la estenosis provocada por la aterosclerosis puede conducir a la aparición de un flujo luminal alterado (Hoshina, 2003). Por regla general se piensa que la aterosclerosis no es la característica dominante en el desarrollo de AAA, ya que de ser así el tamaño del AAA iría en correlación con la gravedad de la aterosclerosis en la aorta, cosa que no sucede (Johnsen, 2010).

A pesar de que una de las principales características del tejido aneurismático es el marcado infiltrado inflamatorio, aún está por determinar si la inflamación representa el primer evento de la formación del AAA o es una mera respuesta a cambios en el vaso. Existen hipótesis que consideran que el inicio del reclutamiento leucocitario vendría dado por el desarrollo de anticuerpos autoinmunes contra componentes de la pared vascular, como sugieren distintos estudios que demuestran una asociación entre la enfermedad autoinmune y la generación de aneurisma aórtico (Duftner, 2014; Haug, 2003), aunque esta posibilidad está lejos de ser confirmada.

Los principales leucocitos presentes en la lesión son macrófagos, linfocitos y en menor grado neutrófilos. También, y a diferencia de la aterosclerosis, el infiltrado leucocitario del AAA posee un importante número de linfocitos B (Freestone, 1995; Koch, 1990). El lugar donde comúnmente se encuentran células inflamatorias es la capa adventicia de la pared arterial. La extensión de la infiltración es directamente proporcional al tamaño del tejido aneurismático, tanto en tejidos humanos como en modelos animales de la enfermedad (Anidjar, 1992; Freestone, 1995). Se presume que el reclutamiento de leucocitos en el tejido aneurismático está estimulado por la secreción de quimioquinas específicas. Se han detectado niveles elevados de IL-8 y MCP1 en lesiones humanas. La citoquina MCP1 es quimioatrayente tanto para monocitos como linfocitos, ambos

presentes en la infiltración leucocitaria del AAA. Otras citoquinas proinflamatorias que han sido descritas en AAA humanos son la IL-1 (Pearce, 1992), IL-6 (Szekanecz, 1994),  $TNF\alpha$  (Pearce, 1992) e Interferon- $\gamma$  (Szekanecz, 1994). En este mismo sentido, se ha observado un importante incremento de la concentración de citoquinas circulantes en individuos con AAA, incluidas IL-1 $\beta$ , IL-6,  $TNF\alpha$  e Interferón- $\gamma$  (Juvonen, 1997; Rohde, 1999). Todos estos datos sugieren que el proceso inflamatorio estaría íntimamente ligado a la formación de aneurismas.

Por otro lado, los componentes acelulares, encargados de la estructura y resistencia del vaso son determinantes a la hora del establecimiento de la dilatación. Las fibras de elastina son responsables de la correcta estructura y de la elasticidad de la aorta, mientras que las fibras de colágeno (tipo I y tipo III) son responsables de la resistencia a la tensión vascular. Se piensa que una disminución de las fibras de elastina en el vaso es el evento desencadenante del AAA y de su consecuente expansión, mientras que la degradación de colágeno es el factor responsable de la ruptura de vaso. La elastina y el colágeno son proteínas con un lento metabolismo en condiciones normales y con vidas medias que pueden extenderse durante décadas. Una baja cantidad de fibras de elastina y de colágeno en la capa media vascular puede deberse a defectos en su síntesis y/o degradación. Debido a estas semividas tan largas, parece probable que una acelerada degradación sea el principal causante de una drástica reducción de fibras. Además los datos existentes sugieren que la síntesis de matriz extracelular aumenta en el proceso aneurismático, particularmente el colágeno tipo I y III (Gargiulo, 1993).

La principal familia de enzimas que condiciona la matriz vascular y que por lo tanto es responsable del establecimiento de AAA, es la familia de las metalo y serin proteinasas. Las metaloproteiniasas de matriz (MMPs) son un gran grupo de enzimas con una importante función estructural. Estas enzimas se expresan en la mayoría de tipos celulares presentes en la pared arterial como respuesta a un remodelado vascular (Galis, 2002), aunque parece que son los macrófagos reclutados los principales encargados de su producción y secreción (Saito,



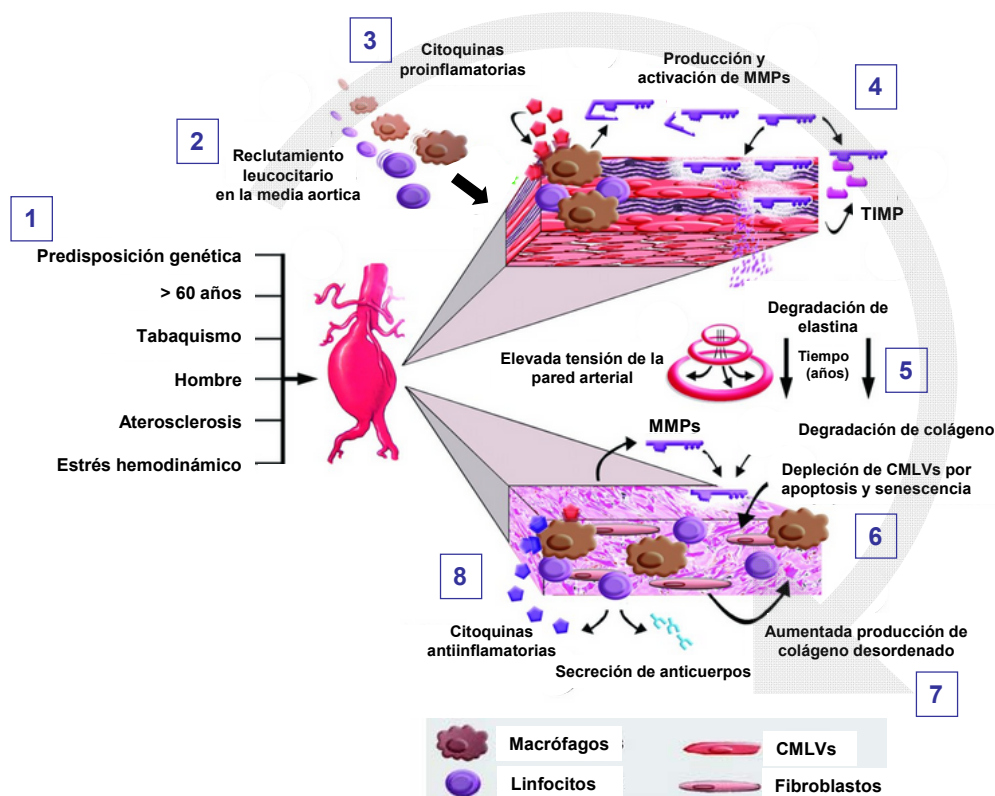
2002). Las metaloproteinasas más importantes en la degradación de la matriz vascular son MMP-2, MMP-9 y MMP-12, cuyo sustrato preferencial es la elastina. En este sentido, se ha descrito que estas tres enzimas están presentes en AAA humanos (Curci, 1998; Goodall, 2001; Thompson, 1995). Además se han detectado altas concentraciones de MMP-9 en el plasma sanguíneo de individuos afectados con AAA (McMillan, 1999). Sin embargo existen otras metaloproteinasas que, aunque menos estudiadas, también juegan un papel fundamental en el remodelado vascular asociado al AAA. Es el caso de MMP-1 (Irizarry, 1993), MMP-3 (Newman, 1994) o MMP-13 (Mao, 1999), las cuales se sobreexpresan en lesiones aneurismáticas. De igual modo, los agentes inhibidores de estas metaloproteinasas poseen un efecto protector frente a la enfermedad. Es el caso de la proteína TIMP1, cuya ausencia promueve la formación de AAA en modelos murinos (Eskandari, 2005). En la **figura 8** se muestran los principales procesos involucrados en el desarrollo de AAA.

#### **1.4.2.2 Modelos de estudio del AAA. El modelo de infusión de AngII en ratones apoE<sup>-/-</sup>**

Igual que ocurre en aterosclerosis, el estudio de AAA se ve facilitado por el uso de modelos animales. Se han empleado diversas especies animales para la generación de AAA experimentales, como perros (Wu, 2001), conejos (Bi, 2012), ratas (Tanaka, 2009) y ratones. Los modelos murinos de AAA se han desarrollado empleando gran variedad de aproximaciones metodológicas (Daugherty, 2004). Existen modelos basados en la modificación genética de importantes agentes moduladores de la integridad vascular, como los ratones deficientes en MMP-3 (Silence, 2001) o en TIMP1 (Silence, 2002) los cuales presentan espontáneamente degeneración de la capa media vascular. Sin embargo, los más empleados son aquellos que inducen la formación de AAA mediante sustancias químicas, bien in situ con tratamiento con elastasa (Pyo, 2000) o por infusión de agentes hipertensivos.

En este trabajo se ha empleado el modelo de infusión de angiotensina II (AngII) en ratones apoE<sup>-/-</sup> desarrollado en el laboratorio de Allan Daugherty. Este modelo se basa en la administración de 1000 ng/kg por minuto de AngII por vía

subcutánea durante 28 días (Daugherty, 2000), generando AAA similares a los humanos, caracterizados por una degeneración de la capa media vascular y un importante infiltrado leucocitario. El principal inconveniente de este modelo es que forma AAA a nivel suprarrenal, a diferencia de lo que suele suceder en humanos, donde la mayoría de AAAs aparecen por debajo de las bifurcaciones renales. Sin embargo, este método aporta importantes ventajas. Por un lado reproduce las diferencias observadas entre géneros, siendo los machos mucho más sensibles al tratamiento con AngII que las hembras. Además, genera lesiones con un patrón de expresión de mediadores inflamatorios y metaloproteinasas muy similar al de humanos (Rush, 2009). Todo esto, sumado a su fácil metodología, hace que sea el modelo más empleado en el estudio de AAA.



**Figura 8. Fisiopatología del aneurisma aórtico abdominal.** Diagrama ilustrativo de los principales eventos que contribuyen al desarrollo y progresión de AAA. (1) Factores de riesgo. (2) Reclutamiento leucocitario en la media aórtica. (3) Activación macrófagica y producción de moléculas proinflamatorias. (4) Producción de metaloproteinasas (MMPs) que son neutralizadas por TIMPs. (5) Degradación de elastina y colágeno y dilatación aórtica a lo largo de los años. (6) Reducción del número de CMLVs y de fibroblastos por apoptosis y senescencia celular. (7) Producción de colágeno desorganizado. (8) Infiltración linfocitaria que, a través de la interacción con macrófagos, produce la producción de citoquinas antiinflamatorias y la deposición local de inmunoglobulinas. Adaptado de "Adaptive cellular immunity in aortic aneurysms: cause, consequence, or context?". Curci JA et al. JCI 2004.

## **2. El supresor tumoral p27**

### **2.1 El ciclo celular en mamíferos: Conceptos generales**

La célula es la unidad estructural, funcional y biológica básica de cualquier organismo vivo. Esta sufre procesos de división destinados a la reproducción (organismos unicelulares) o la formación y renovación tisular (organismos pluricelulares). El proceso por el que una célula se divide en dos células hijas idénticas se denomina ciclo celular.

El ciclo celular en eucariotas consiste en cuatro procesos coordinados que son: crecimiento celular (fase G1), replicación del material genético (fase S), distribución de los cromosomas duplicados en las células hijas (fase G2) y división celular (fase M o mitosis). En condiciones normales, las células diferenciadas se encuentran en un estado quiescente o no proliferativo denominado fase G0 y solo tras la estimulación de la célula por factores mitogénicos, abandona este estado para entrar en fases activas del ciclo celular. Cuando la célula se encuentra en el proceso de división, comienza la denominada fase G1. En esta fase, la célula crece en tamaño y sintetiza y/o activa las proteínas necesarias para la replicación del ADN. A continuación la célula duplica su material genético con el objetivo de transmitirlo, entrando en la denominada fase S o de síntesis. Completada la síntesis del nuevo ADN, la célula entra en la mitosis (M), fase en la que el material genético se condensa y se reparte en las futuras células hijas. La mitosis está a su vez subdividida en 6 etapas:

-Profase: Comienza con la condensación del material genético en cromosomas y termina con la rotura de la envoltura nuclear.

-Prometáfase: En ella se da la unión entre los cromosomas y el huso mitótico.

-Metafase: Comprende la alineación de los cromosomas formando la placa metafásica y la separación de las cromátidas hermanas hacia los extremos del huso mitótico.

-Anafase: Consta de la segregación de las cromátidas y la elongación del huso mitótico.

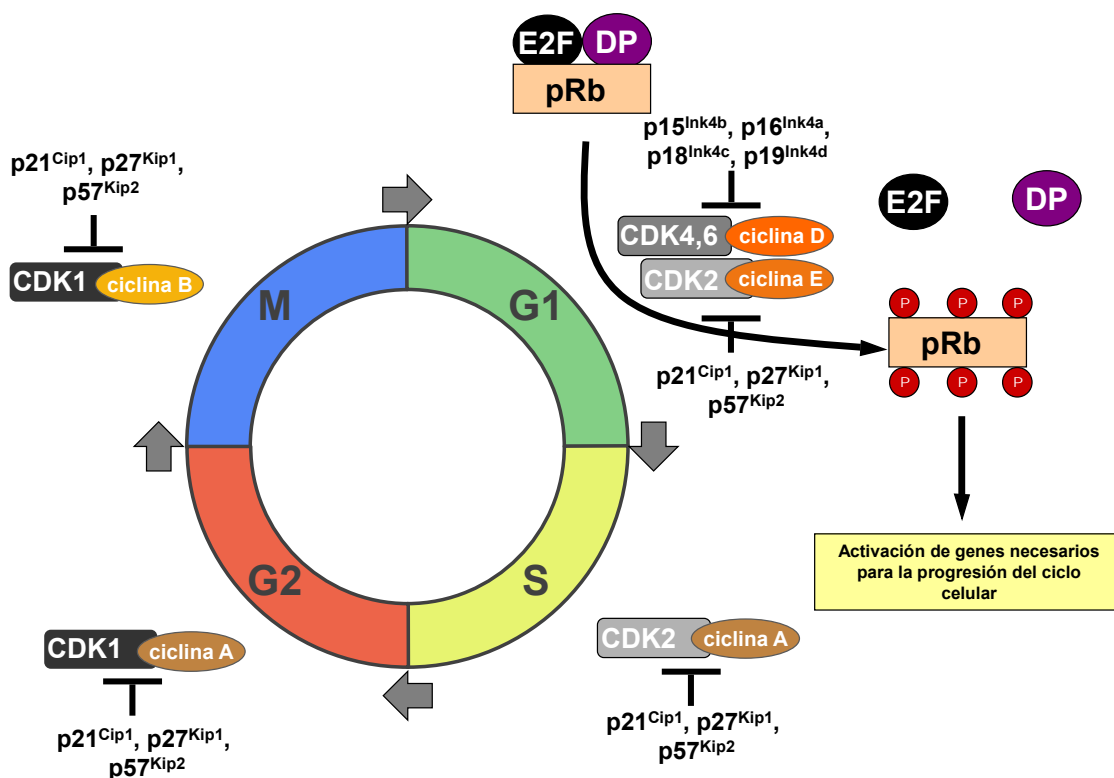
-Telofase: Se da la descondensación de las cromátidas a ambos extremos del huso y la reconstitución de la membrana nuclear.

-Citocinesis: Es la etapa final del proceso en la que se separan físicamente las dos células hijas fruto de la división.

Como resultado del ciclo celular se obtienen dos células hijas con idéntico material genético. Debido a que una división celular aberrante conlleva un desenlace fatal para la célula y en consecuencia para el organismo, el proceso está altamente regulado. En mamíferos, la transición a cada uno de estos estados diferenciados celulares está controlada por una maquinaria reguladora muy conservada, que coordina las diferentes etapas del ciclo celular y regula la respuesta a las señales extracelulares que inducen la proliferación celular.

## 2.2 Regulación del ciclo celular

La transición de una fase del ciclo celular a otra ocurre de manera ordenada y está regulada por diferentes proteínas celulares (**figura 9**). Se conocen como puntos de control o “*checkpoints*” (Malumbres, 2011) a una serie de rutas moleculares que controlan el orden y el *tempo* de la transición entre las diferentes fases del ciclo celular. Existen tres puntos de control de vital importancia para la correcta división celular: un *checkpoint* entre la transición G1 y S que garantiza que la replicación del ADN solo se da una vez (Hunt, 2011), otro en la fase S que asegura la correcta replicación del material genético (Labib, 2011), y un último en la fase M para garantizar la adecuada unión de los microtúbulos al huso mitótico necesaria para la correcta separación de las cromátidas en la división celular (Musacchio, 2011). Cualquier alteración de los mecanismos responsables de este control lleva a la célula a una incorrecta división y a una excesiva proliferación celular.



**Figura 9. Regulación del ciclo celular en mamíferos.** Esquema de los principales componentes y procesos involucrados en el control del ciclo celular.

La transición entre las distintas etapas del ciclo celular está regulada por las denominadas quinasas dependientes de ciclina o CDK (del inglés *Cyclin-dependent kinases*) (**tabla 1**). Estas son unas proteínas de la familia de las serin/treonin quinasas que se activan específicamente en distintos momentos del ciclo celular y que permiten la transición entre las fases del mismo. Para su actividad es necesario que estas quinasas interactúen con un componente regulador denominado ciclina, sin el cual permanecen inactivas. La actividad de los complejos CDK-ciclina está fuertemente regulada a lo largo del ciclo celular gracias a procesos de síntesis y degradación periódica que modifican la cantidad de ciclina en la célula (Morgan, 1997). En mamíferos se conocen más de 20 CDKs distintas que pueden ser activadas por un número variable de ciclinas (**tabla 1**). Las principales CDKs activas en la mayoría de células de mamíferos son, en orden de descubrimiento, CDK1, 2, 4 y 6. Aunque también se ha aislado ADNc de las CDK3 y CDK5, sus proteínas codificantes no se hallan en la mayoría de tipos celulares en cantidad suficiente para regular el ciclo celular.

Los complejos CDK/ciclina modulan la expresión de los genes encargados del control del ciclo celular y de la síntesis de ADN mediante la regulación de los factores de transcripción E2F/DP y pRb. Al inicio de la fase G1 los niveles de ciclina D aumentan en la célula, lo que favorece la formación de complejos CDK4/6-ciclina D que fosforilan la proteína del retinoblastoma (pRB). En su estado defosforilado, pRb se une a e inactiva al factor E2F. Los complejos CDK4/6-ciclina D son capaces de fosforilar pRB, lo que supone la liberación de E2F/DP y la activación transcripcional de los genes necesarios para la progresión del ciclo celular, entre los que están las ciclinas A y E (Fuster, 2010). La expresión de estas ciclinas genera un proceso de retroalimentación, ya que la formación de complejos CDK2-ciclina A/E también fosforila pRB, incrementando la actividad de E2F y promoviendo la transcripción de genes implicados en el metabolismo de nucleótidos y en la replicación del material genético (Harbour, 2000). Por su parte, E2F promueve su propia expresión lo que conduce finalmente a la superación del punto de restricción y a la entrada en la fase S del ciclo celular. Una vez finalizada la replicación del material genético, se entra en la fase G2 donde se sintetiza la ciclina B, la cual forma complejos con CDK1. Los complejos formados entre CDK1 y ciclina A y B son fundamentales para el inicio y desarrollo de la mitosis (O'Farrell, 2001). Esta concatenación de eventos se resume en la **figura 9**.

En las últimas décadas se han llevado a cabo numerosos estudios con el objetivo de demostrar el papel exacto que juegan cada uno de los diferentes complejos CDK-ciclina en el control del ciclo celular en mamíferos. Analizando ratones genéticamente modificados en los que se ha eliminado la expresión de ciertas CDKs y ciclinas se ha demostrado que muchas de ellas no son indispensables para la formación y el desarrollo del animal, lo que sugiere cierto carácter redundante en la funcionalidad de dichos complejos (Santamaria, 2006). No obstante, algunos de estos animales presentaron defectos en la formación y funcionalidad en órganos y tejidos, lo que invita a pensar que cada uno de los diferentes complejos pueden tener más o menos importancia según el tipo celular (Malumbres, 2005).

Con el propósito de asegurar la progresión monodireccional del ciclo, existe un férreo control de los niveles proteicos y la actividad de estas moléculas. Con este propósito, la célula es capaz de eliminar específicamente las CDKs y las ciclinas necesarias en cada momento, mediante marcaje por ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma (Reed, 2003).

Otro mecanismo fundamental en la regulación del ciclo celular es la síntesis de “inhibidores de CDKs” o CKIs (del inglés *Cyclin-dependent kinase inhibitor*), una familia de proteínas encargadas de inhibir la actividad de las CDKs por interacción directa o con los complejos CDK-ciclina (**figura 9**).

Las distintas CKIs se han clasificado en dos familias según su similitud secuencial y su especificidad de acción (Vidal, 2000): la familia INK4 y la familia Cip/Kip. La familia INK4 incluye las proteínas p15 (*INK4b*), p16 (*INK4a*), p18 (*INK4c*) y p19 (*INK4d*) que inactivan específicamente las CDKs que participan en G1 (CDK4 y CDK6). Estas CKIs forman complejos estables con las CDKs antes de que se unan con la ciclina (Carnero, 1998). La segunda familia de inhibidores

CDK/ciclina	Función
<b>CDK1</b>	Control de la fase M del ciclo celular formando complejos con la ciclina A y la ciclina B
<b>CDK2</b>	Control de la fase G1-S del ciclo celular formando complejos con la ciclina E y la ciclina A; Transcripción de Rb/E2F
<b>CDK4</b>	Control de la fase G1 del ciclo celular formando complejos con la ciclina D; Transcripción de Rb/E2F
<b>CDK6</b>	Control de la fase G1 del ciclo celular formando complejos con la ciclina D. Transcripción de Rb/E2F
<b>CDK7</b>	Quinasa activadora de CDKs (CAK del inglés <i>CDK-activating kinase</i> ) y transcripción de RNAPII formando complejos con la ciclina H
<b>CDK8</b>	Transcripción de RNAPII formando complejos con la ciclina C
<b>CDK9</b>	Transcripción de RNAPII formando complejos con la ciclina T
<b>CDK10</b>	Transcripción de Ets2
<b>CDK11</b>	Splicing de ARN formando complejos con ciclina L
<b>ciclina A</b>	Control de la fase S del ciclo celular formando complejos con CDK2 o CDK1
<b>ciclina B</b>	Control de la fase M del ciclo celular formando complejos con CDK1
<b>ciclina C</b>	Transcripción de RNAPII formando complejos con CDK8
<b>ciclina D</b>	Control de la fase G1 del ciclo celular formando complejos con CDK4 o CDK6; Transcripción de Rb/E2F
<b>ciclina E</b>	Control de la fase G1-S del ciclo celular formando complejos con CDK2; Transcripción de Rb/E2F
<b>ciclina H</b>	Quinasa activadora de CDKs (CAK del inglés <i>CDK-activating kinase</i> ) y transcripción de RNAPII formando complejos con la CDK7
<b>ciclina L</b>	Splicing de ARN formando complejos con CDK11
<b>ciclina T</b>	Transcripción de RNAPII formando complejos con la CDK9

Tabla 1. Principales CDKs y ciclinas en mamíferos y su función en el ciclo celular.

la forman las proteínas p21 (*Waf1*, *Cip1*), p27 (*Kip1*) y p57 (*Kip2*), cuya actividad es menos específica, ya que inactivan complejos CDK-ciclina en fase G1 y también complejos CDK1-ciclina B. En general, cada uno de los miembros de esta familia suele expresarse con más intensidad en una fase concreta del ciclo celular, aunque todos pueden ejercer su función a lo largo todo el ciclo (Fuster, 2010).

### 2.3 p27: Generalidades y función

El inhibidor del ciclo celular p27, y particularmente su fosforilación en la S10, es el principal objeto de estudio de esta tesis. Como ya se dijo en el apartado anterior, p27 es una CKI de la familia de los inhibidores Cip/Kip. En humanos la proteína p27 está codificada por el gen *CDK1B* que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 12 (12.87-12.88 Mb), mientras que en ratones (modelo animal ampliamente utilizado en este trabajo), este gen se encuentra en el cromosoma 6 (134.92-134.93 Mb). Las secuencias de ADNc de ambos genes poseen una similitud superior al 90%, y codifican para proteínas de 198 (22.073 Da) y 197 aminoácidos (22.193 Da), respectivamente, siendo sus secuencias proteicas similares en un 90% (**figura 10**).

p27 es una proteína intrínsecamente desestructurada. Se han descrito al menos estructuras secundarias de  $\alpha$ -hélice,  $\beta$ -horquilla,  $\beta$ -lámina, y 310-hélice en su interacción con el complejo CDK2-ciclina A (Russo, 1996), aunque debido a su naturaleza “laxa”, su estructura terciaria viene determinada por la proteína con la que interacciona en cada momento.

p27 se expresa en la mayoría de tejidos y tipos celulares estudiados, actuando como inhibidor de la progresión del ciclo celular principalmente en la fase G0, donde se expresa en importantes cantidades (Coats, 1996; Rivard, 1996). En este sentido, p27 juega un papel relevante en los procesos iniciales de la división celular al impedir la superación del punto de restricción y la entrada en la fase S del ciclo, bloqueando la actividad quinasa de los complejos CDK2-ciclina E frente a un estímulo mitogénico (Coats, 1996; Rivard, 1996). Tras la superación del



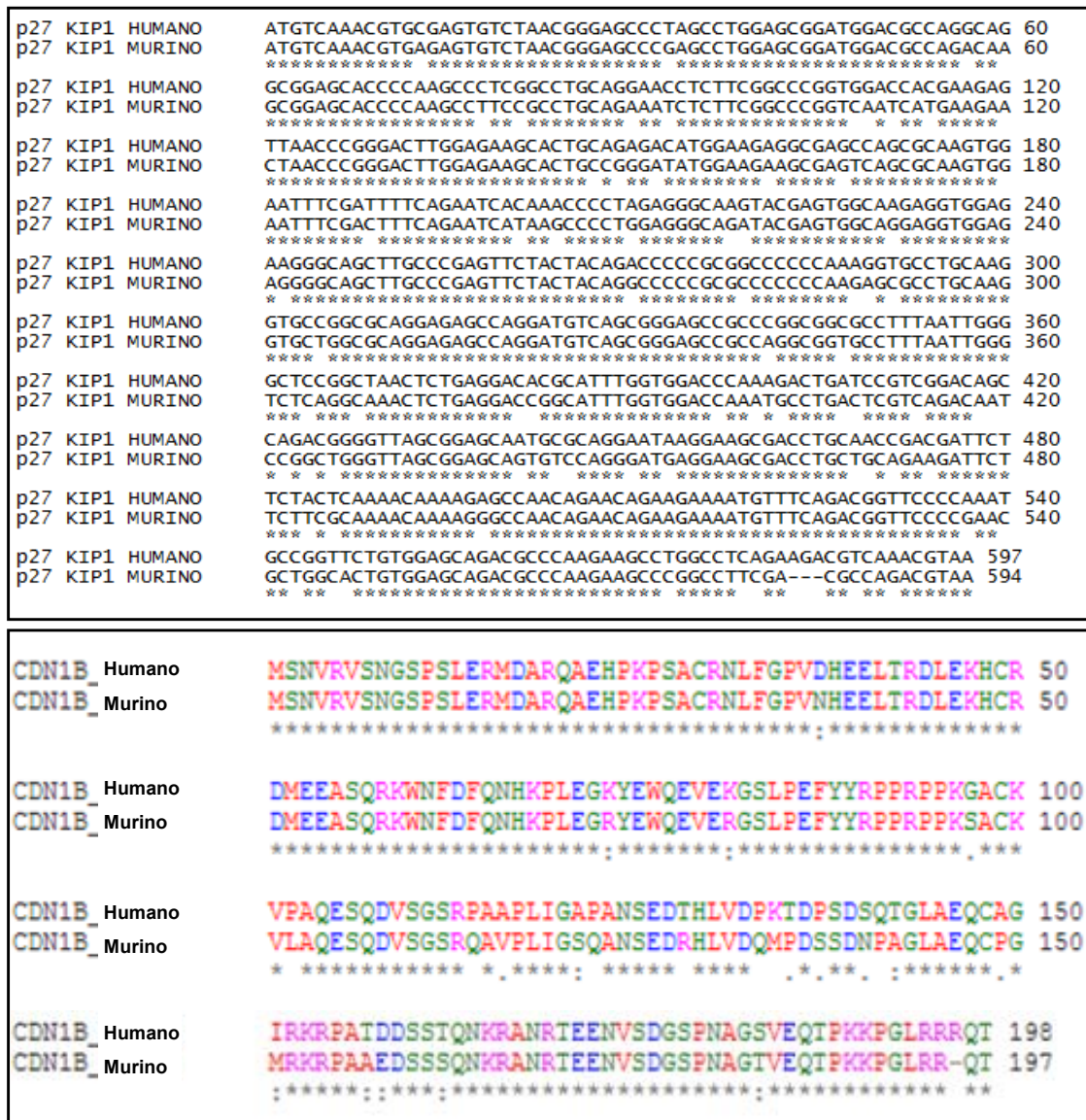


Figura 10. Alineamiento de las secuencias de ADNc (arriba) y proteicas (abajo) de p27 en humano y en ratón

punto de restricción, la célula entra en fase G1, momento en que se reduce significativamente la inhibición de los complejos CDK2-ciclina E dependiente de p27. Esta pérdida de función es debida a la degradación proteolítica de p27 y a la fosforilación de su dominio de unión a CDKs (Chu, 2007; Grimmier, 2007).

La disminución de los niveles de p27 y su menor interacción con los complejos CDK2/ciclina E es esencial para la superación del punto de restricción y la transición G1/S en gran número de tipos celulares (Bloom, 2003; Coats, 1996; Ho, 2002; Kossatz, 2004). Sin embargo p27 puede también ejercer su función antiproliferativa actuando sobre otros complejos CDK/ciclina (Toyoshima, 1994),

como ocurre en la transición G2/M, durante la cual su degradación es fundamental para la activación de CDK1 y el comienzo de la mitosis (Nakayama, 2004).

### **2.3.1 Otras funciones de p27**

Además de su papel principal como regulador del ciclo celular, en los últimos años se ha visto que p27 también está involucrada en otros numerosos procesos celulares. Posiblemente su participación en el fenómeno de la migración celular sea el más conocido de ellos. Trabajos recientes han demostrado que la ausencia de p27 provoca importantes defectos en la reorganización de las fibras de actina en el citoplasma y en el establecimiento de adhesiones focales, disminuyendo la capacidad migratoria de fibroblastos mediante un mecanismo molecular independiente del control del ciclo celular (Besson, 2004). Esta función vendría dada por la secuencia de aminoácidos en su extremo C-terminal, todo lo contrario que su papel inhibidor de complejos CDK-ciclina, el cual se asocia al extremo N-terminal de la proteína (McAllister, 2003). Aunque también se ha descrito p27 podría limitar la migración celular a nivel vascular, en parte por su capacidad para regular la actividad de Rho (Castro, 2003; Diez-Juan, 2003). Las implicaciones de p27 en la reorganización del citoesqueleto también afectan a otros procesos celulares como la respuesta apoptótica (Drexler, 2003; Eymin, 1999a; Eymin, 1999b) o la autofagia (Liang, 2007).

Más recientemente se ha visto que mediante interacción con el complejo p130/E2F4, p27 regula el control de genes involucrados en el procesamiento de ARN y en la organización y respiración mitocondrial (Pippa, 2012).

Esta versatilidad funcional de la proteína se debe a diversos motivos. Por un lado, p27 se ha considerado tradicionalmente una proteína nuclear, limitándose su presencia citoplasmática a su síntesis o su translocación previa a la degradación. Sin embargo, su participación en muchos de estos procesos dependería de la cantidad de p27 en el citoplasma (Gui, 2014). Además, como ya dijimos, p27 posee una estructura desorganizada lo que facilita su interacción con gran número de proteínas. Se sabe que p27 interacciona no solo con distinto

grupo de CDKs y ciclinas, sino también con proteínas de muy diversa índole, como estatmina (Baldassarre, 2005), Grb2 (Moeller, 2003; Sugiyama, 2001), varios miembros de la familia de proteínas 14-3-3 (Fujita, 2002; Fujita, 2003; Sekimoto, 2004), RhoA (Besson, 2004), o los factores de transcripción MCM7 (Nallamshetty, 2005) y p130/E2F4 (Pippa, 2012).

### **2.3.2 Modificaciones postraduccionales de p27. Fosforilación de p27 en la S10**

La actividad biológica de p27 viene determinada en gran medida por sus modificaciones postraduccionales. De todas las posibles modificaciones que puede sufrir p27, la fosforilación es la más frecuente. Hasta el momento se han identificado 7 posiciones sensibles a la fosforilación (**figura 11**), siendo la serina en posición 10 (S10) el residuo más abundantemente fosforilado (Ishida, 2000).

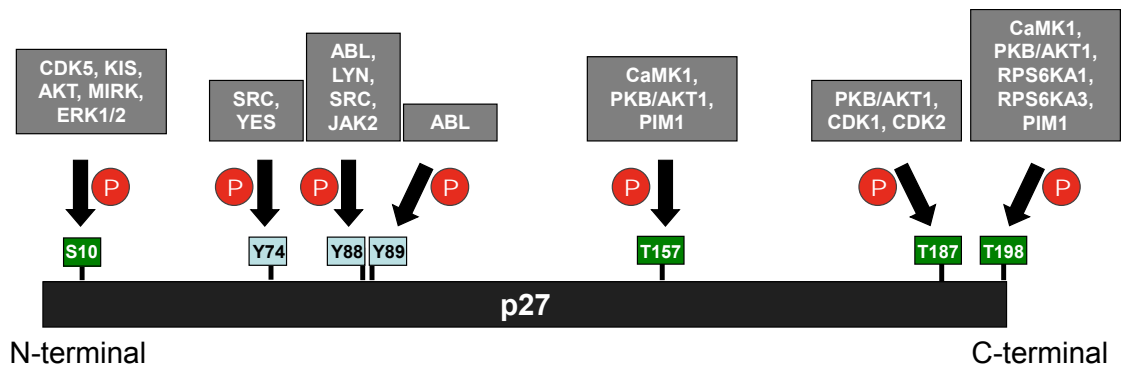
La fosforilación en la serina 10 (S10) está relacionada con diversos fenómenos celulares. Por un lado, favorece la estabilidad de la proteína como se ha demostrado en estudios en ratones, que demuestran que la sustitución de esta serina por el aminoácido no fosforilable alanina (p27S10A) conlleva una importante reducción de los niveles de p27 en diversos tejidos (Besson, 2006; Kotake, 2005). Del mismo modo, experimentos de vida media *in vitro* llevados a cabo en distintos tipos celulares han demostrado que la forma mutante p27S10A no fosforilable es menos estable que la forma silvestre, y esta a su vez menos que la forma mutante fosfomimética (obtenida por sustitución de la serina por ácido aspártico – p27S10D) (Boehm, 2002; Deng, 2004; Ishida, 2002). En este mismo sentido, trabajos llevados a cabo en células procedentes de ratones deficientes para esta fosforilación, mostraron una reducida estabilidad de p27 tanto en fibroblastos (Besson, 2006; Kotake, 2005) como en linfocitos (Kotake, 2005).

Otra de las funciones atribuidas a la fosforilación de p27 en la serina 10 es el control de la localización subcelular de p27. Estudios en células en cultivo

transfectadas con plásmidos de sobreexpresión de las formas no fosforilable (p27S10A) y fosfomimética (p27S10D) de p27 demostraron que dicha fosforilación es necesaria para la translocación de p27 del núcleo al citosol durante la fase G1 del ciclo celular (Ishida, 2002). También se ha descrito una translocación citosólica deficiente de p27 en fibroblastos embrionarios de ratones p27S10A tras ser estimulados con mitógenos (Besson, 2006). No obstante estos resultados son bastante controvertidos ya que otras investigaciones muestran que fibroblastos de estos mismos ratones no presentan ninguna alteración en la translocación núcleo-citosol de p27 (Kotake, 2005).

También se sabe que durante la fase G1 del ciclo celular la degradación citoplasmática de p27 es rápida (Carrano, 1999; Connor, 2003; Ishida, 2002; Tomoda, 1999) por lo que, si la fosforilación en la serina 10 promueve la salida citosólica de p27, lo lógico es pensar que la fosforilación favorece la degradación de la proteína. Sin embargo estudios en células obtenidas de ratones p27S10A (Besson, 2006; Kotake, 2005) y en células transfectadas con plásmidos de expresión de p27S10D y p27S10A (Boehm, 2002; Rodier, 2001) demuestran que esto no sucede. Estas investigaciones sugieren la implicación de la fosforilación de la S10 en los procesos que determinan la localización subcelular de p27; sin embargo el efecto de esta fosforilación en la función de p27 es motivo de discusión todavía.

A pesar de la importancia de esta modificación postraduccional en la regulación de la función de p27, no son del todo conocidos los procesos por los que se regula. Por ejemplo, no se sabe si la defosforilación de p27-S10 observada en respuesta a diferentes estímulos es debida a la acción concreta de una fosfatasa o al bloqueo de las quinasas encargadas de la fosforilación de este residuo. En la actualidad no se conoce ninguna fosfatasa que actúe sobre la serina 10, pero se han identificado hasta 6 quinasas que la fosforilan: KIS, HMK1, CDK5, AKT, MIRK y ERK1/2. Todas estas quinasas poseen patrones de expresión y actividad muy diferentes según el tejido o el estímulo celular al que respondan, siendo verdaderamente complicado conocer que quinasa fosforila p27-S10 en cada supuesto.



**Figura 11. Residuos susceptibles de fosforilación en p27. Se indican las distintas fosforilaciones descritas en p27 así como sus quinasas responsables.**

Se ha demostrado que KIS fosforila p27-S10 *in vitro* y en cultivos celulares, aunque solo lo hace en fase G1 del ciclo celular y no en G0, cuando el estado fosforilado de p27 es máximo (Ishida, 2000). Por su parte, CDK5 fosforila la S10 de p27 tanto *in vitro* como *in vivo* en neuronas (Kawauchi, 2006), modificando la capacidad migratoria de este tipo celular. Sin embargo, a pesar de que CDK5 presenta una expresión ubicua, necesita interactuar con diferentes moléculas activadoras como p35, cuya expresión solo se ha observado en tejido nervioso (Chen, 2000b; Cho, 2010). Por otro lado, Akt fosforila p27 en la S10 tanto *in-vitro* como *in-vivo* en respuesta a estrés oxidativo y en condiciones de privación de estímulos proliferativos (Nacusi, 2006), aunque se piensa que modula preferentemente la fosforilación de otros residuos de p27 como las treoninas 157 o 198 (Liang, 2002; Shin, 2002; Viglietto, 2002). Por último Mirk/Dirk1B y Erk1/2 también fosforilan la S10 de p27 pero lo hacen en condiciones muy restringidas. Mirk/Dirk1B se expresa principalmente en tejido muscular (Deng, 2004), mientras que ERK1/2, que se expresa ampliamente en multitud de tejidos, solo ha demostrado su capacidad fosforilativa de p27-S10 *in vitro* pero no *in vivo* (Ishida, 2000).

En resumen, los datos conocidos confirman la existencia de un importante número de quinasas que fosforilan la S10 de p27 pero aún estamos lejos de conocer el mecanismo exacto por el que se regula esta fosforilación, en parte

debido a que la mayoría de estas enzimas se regulan de manera distinta según el tipo celular en el que se expresen o el estímulo al que responden.

### **2.3.3 p27 y enfermedad cardiovascular**

Al ser un importante regulador del ciclo celular, p27 ha sido ampliamente estudiado en aquellos procesos fisiopatológicos caracterizados por una excesiva proliferación celular. Un claro ejemplo es el desarrollo tumoral, proceso patológico en el que los niveles de p27 pueden llegar a ser un importante marcador pronóstico de la enfermedad. La expresión de p27 está reducida en procesos cancerígenos en diversos órganos, como mama (Florenes, 1998), próstata (Yang, 1998), estómago (Nitti, 2002) u ovario (Newcomb, 1999), entre otros. Asimismo, estudios en ratones modificados genéticamente muestran que la depleción de esta CKI está asociada con fenómenos hiperplásicos en gran número de tejidos (Fero, 1996; Kiyokawa, 1996; Nakayama, 1996), así como a una mayor susceptibilidad para sufrir procesos cancerígenos tras un estímulo neoplásico (Fero, 1998). Pero el efecto de p27 no solo se limita a estas enfermedades.

Como se señaló anteriormente, el remodelado patológico de la pared arterial está asociado, en un gran número de casos, a fenómenos hiperproliferativos. De acuerdo con esto, p27 ejerce un papel protector a nivel cardiovascular. Nuestro laboratorio ha demostrado que la ablación genética de p27 en ratones apoE<sup>-/-</sup> incrementa el desarrollo de aterosclerosis debido a un aumento de la proliferación de macrófagos y CMLVs (Diez-Juan, 2001), y que la inactivación de p27 restringida a células hematopoyéticas es suficiente para incrementar la formación de placa aterosclerótica en ratones apoE<sup>-/-</sup> como consecuencia de una excesiva proliferación leucocitaria (Diez-Juan, 2004). Algo similar se ha visto en estudios de daño vascular inducido por AngII en ratones, en los que la supresión de p27 favorece el engrosamiento de la capa media vascular como consecuencia de una proliferación celular exacerbada (Kanda, 2005).

Las modificaciones postraduccionales de p27 también han sido objeto de estudio en el contexto del remodelado patológico vascular. Estudios previos elaborados en el laboratorio donde se ha desarrollado este trabajo, han demostrado que la fosforilación en T187, una de las principales modificaciones de p27, no altera el desarrollo aterosclerótico ni los procesos asociados a esta enfermedad (proliferación y apoptosis) en placa aterosclerótica (Sanz-Gonzalez, 2006). Sin embargo, más recientemente se ha visto que la fosforilación de p27 en la S10 protege frente a la formación de lesiones ateroscleróticas avanzadas (Fuster, 2011). Al estudiar el desarrollo aterosclerótico en ratones carentes de dicha fosforilación (ratones apoE<sup>-/-</sup> p27S10A) se observó que estos animales tenían una mayor susceptibilidad para desarrollar esta enfermedad, incluso cuando la ausencia de fosforilación de p27 en S10 se limitó exclusivamente a las células hematopoyéticas. Profundizando en los mecanismos por los que dicha fosforilación protege frente al desarrollo aterosclerótico se observó que los macrófagos que expresaban la versión no fosforilable de p27 tenían una mayor capacidad para captar LDLs modificadas, lo que promovía la formación de células espumosas.

Estos antecedentes confirmaron que la fosforilación en la S10 le confiere a p27 nuevas funciones alejadas del control del ciclo celular, las cuales pueden estar implicadas en los procesos desencadenantes de la enfermedad vascular. En definitiva y como objetivo general de este trabajo, quisimos profundizar en los mecanismos por los que la fosforilación de p27 en la S10 regula los fenómenos iniciadores de la enfermedad aterosclerótica, la homeostasis endotelial y el desarrollo de otras enfermedades vasculares, como el AAA.





**Objetivos**



El objetivo general de esta tesis ha sido profundizar en el papel de la fosforilación de p27 en la S10 en la regulación de la función endotelial y su implicación en el remodelado patológico vascular. Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos en la *Introducción*, los objetivos concretos fueron:

- Investigar el papel de la fosforilación de p27 en la S10 en los eventos iniciadores del proceso aterosclerótico a nivel endotelial.
  
- Investigar el papel de la fosforilación de p27 en la S10 en los procesos de contractilidad vascular dependientes de endotelio.
  
- Estudiar el papel que juega la fosforilación de p27 en la S10 en el desarrollo de AAA.



**Materiales y Métodos**



## 1. Reactivos de uso común y fármacos utilizados

- PBS (del inglés *Phosphate Buffered Saline*) o tampón fosfato salino: NaCl (8 g/l), KCl (0,2 g/l), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,44 g/l), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,24 g/l) en ddH<sub>2</sub>O.
- T-PBS (Tween-20 PBS): PBS, con 0.05% Tween 20.
- Suero salino: NaCl (9 g/L) en ddH<sub>2</sub>O.
- Tampón de digestión para colas de ratón: Tris 1M pH 8.5 100 ml/l, EDTA 0.5 M 10 mL/l, SDS 20% 10 ml/l, NaCl 5 M pH 3.5 40ml/l, en 1L de ddH<sub>2</sub>O y 2,5 µl de proteinasa K (Proteinase K 20 mg/ml QIAGEN).
- Tampón de lisis para la obtención de extractos proteicos: 50 mM Tris·Cl, pH 7.2, 1% (p/v) Triton X-100, 0.1% (p/v) SDS, 500 mM, NaCl y 10 mM MgCl<sub>2</sub>, suplementado con inhibidores de fosfatasas y proteasas (Complete®, Roche).
- Tampón de lisis “suave” para obtención de extractos proteicos citoplasmáticos: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5% Triton X-100, 137.5 mM NaCl, 10% glicerol, 1mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 50 mM NaF, 10 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 5 mM EDTA e inhibidores de proteasas (Complete®, Roche).
- Solución Krebs-Henseleit: 115 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 4.6 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 11.1 mM glucosa, 0.01 mM EDTA.
- Solución saturada de KCl: KCl (4.61 M) en ddH<sub>2</sub>O.
- Medio de cultivo para células endoteliales: DMEM:F12 (12-719F Lonza) enriquecido con 100 U/ml de penicilina, 0.1 mg/ml de estreptomina, 0.4 mM de L-glutamina, 10 mM de HEPES, 10 mM de heparina (H3393, Sigma-Aldrich) y 50 µg/ml de ECGF (factor de crecimiento para células

endoteliales - del inglés *Endothelial-cell growth factor* – ECGS, 354006-BD).

- Tampón para lisar eritrocitos:  $\text{KH}_4\text{Cl}$  0.15 M,  $\text{KHCO}_3$  0.01 M,  $\text{EDTA.N}_2$  0.01 M, pH 7.4.
- Tampón citrato para exposición de antígenos en cortes histológicos: 10 mM de citrato sódico y 0.05% de Tween 20 ajustado a pH 6.0.

Salvo que se indique lo contrario, todos los reactivos se adquirieron de la casa comercial Sigma-Aldrich. En la **tabla 2** se incluyen los fármacos y moduladores de la función celular empleados en la realización de este trabajo.

Molécula	Referencia	Empleo
Hidroxifasudil (Fasudil)	390602, Calbiochem	Bloqueo de la actividad quinasa ROCK.
Hidrocloruro de Fenilefrina (Fenilefrina)	P1250000, Sigma-Aldrich	Activación $\alpha$ -adrenérgica. Vasoconstricción
NS-398	70590, Cayman Chemical	Inhibición selectiva de COX-2
DuP-697	70645, Cayman Chemical	Inhibición selectiva de COX-2
Angiotensina II	A9525, Sigma-Aldrich	Activación de los receptores AT1R. Generación de AAA

**Tabla 2. Fármacos empleados en los experimentos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*.**

## 2. Líneas de ratones

El objetivo principal de esta tesis ha sido evaluar el papel de la fosforilación de p27 en la S10 en la enfermedad vascular. Para ello se han utilizado ratones denominados “p27S10A”. Estos ratones, desarrollados en el laboratorio del doctor Nakayama (Kotake, 2005), son ratones “*knock-in*” en los que se ha sustituido el gen endógeno de p27 (*Kip1*) por una versión mutada, la cual codifica para una forma no fosforilable de p27 en su posición 10, por sustitución de la serina endógena por una alanina. Con estos animales se han llevado a cabo la mayoría de estudios *in vitro* y *ex vivo* de este trabajo.



Para los estudios de aterosclerosis y AAA se ha empleado el ratón apoE<sup>-/-</sup>. El análisis del efecto de la fosforilación de p27 en la S10 en los modelos patológicos se realizó con ratones dobles mutantes apoE<sup>-/-</sup> p27S10A que se obtuvieron mediante cruce de ratones apoE<sup>-/-</sup> y ratones p27S10A.

Por último, para los estudios de aterosclerosis temprana y de extravasación leucocitaria se utilizaron ratones apoE<sup>-/-</sup> Mafia que expresan la proteína fluorescente verde (EGFP) en leucocitos de linaje mieloide. Los ratones transgénicos Mafia (del inglés *Macrophage Fas-Induced Apoptosis*) poseen un sistema de apoptosis inducible por Fas (miembro de la familia de TNF) así como la secuencia del gen de la EGFP bajo control del promotor del gen murino *Csf1r* (del inglés *Colony stimulating factor 1r*), cuya expresión está restringida a células sanguíneas del linaje mieloide. Este animal expresa EGFP en monocitos circulantes, macrófagos y células dendríticas, las cuales pueden ser eliminadas al ser tratadas con ligandos que activen el receptor Fas (Burnett, 2004). Se obtuvieron ratones apoE<sup>-/-</sup> Mafia y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A Mafia mediante cruce de ratones Mafia con apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A respectivamente.

## 2.1 Genotipaje, mantenimiento y sacrificio

Los ratones se destetaron a las 4 semanas de edad y se estabularon por sexos. El genotipo de los animales se determinó por PCR a partir de ADN genómico obtenido de una muestra de la cola. El ADN se extrajo incubando las muestras con 500 µl de “tampón de digestión para colas” a 55°C durante 8-12 horas. Tras la digestión, las muestras se centrifugaron 10 minutos a 16000 g y se recogieron los sobrenadantes, a los que se le añadió 500 µl de isopropanol para la precipitación del ADN. Finalmente el ADN genómico se disolvió en ddH<sub>2</sub>O.

Los cebadores empleados en las distintas reacciones de PCR destinadas al genotipaje se detallan en la **tabla 3**.

La reacción de PCR empleada para genotipar la línea de ratones p27S10A genera un fragmento de 155 pares al amplificar el alelo silvestre y un fragmento

Línea de ratón	Oligonucleótidos cebadores (5'-3')
p27S10A	-GCCTAGCCGAGGGAGAGCCG- -TGTGACTTGGGAGCTCTGCAGC- -GCCGCCCCGACTGCATCT-
apoE <sup>-/-</sup>	-TGTCTGTCTGTCTGTCTCCGTA- -GAGGAGGCAGTTGGTAAACATCCG-

**Tabla 3. Cebadores empleados en el genotipaje de las distintas líneas de ratón.**

de 245 al amplificar el alelo mutante. Por su parte, la reacción de PCR empleada para genotipar la línea apoE<sup>-/-</sup> genera un fragmento de 270 pares de bases al amplificar el alelo silvestre y un fragmento de 400 pares de bases al amplificar el alelo mutante.

Los ratones Mafia se caracterizaron mediante la detección de su fenotipo. Se extrajo sangre de dichos animales (véase *Mat. y Met.* 3.4) y se detectó la expresión de EGFP en leucocitos circulantes por citometría de flujo.

Todos los ratones utilizados fueron de la cepa C57BL/6J y se criaron en un ambiente libre de patógenos con adecuadas condiciones de temperatura, humedad y luminosidad siguiendo las premisas e indicaciones establecidas por el ICLAS (*International Council of laboratory Animal Science*) en las instalaciones del animalario del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC).

El sacrificio de los animales se llevó a cabo mediante procedimientos aceptados en la legislación vigente: inhalación de dióxido de carbono o dislocación cervical. Salvo que se especifique otra cosa, todos los experimentos se realizaron con machos adultos de 8 semanas de edad.

### **3. Obtención de tejidos y células primarias de ratón**

#### **3.1 Obtención de corazón y aorta de ratón**

Para determinar la aterosclerosis presente en los modelos animales empleados, fue necesaria la obtención de los corazones de los animales experimentales.

Para ello, se sacrificaron los ratones (véase *Mat. y Mét. 2.1*) y se colocaron en posición decúbito supino. Empleando el material de cirugía adecuado, se abrieron desde el abdomen hasta la base la cabeza, retirando los órganos colindantes. Para eliminar la sangre, se seccionó la arteria femoral derecha de cada uno de ellos y se perfundieron inyectando 20 ml de suero salino a través del ventrículo izquierdo. Una vez aislados, los corazones se sumergieron en una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% durante  $\approx 12$  horas y se deshidrataron en alcoholes de concentración creciente (3 x 10 minutos en EtOH 70%, 3 x 10 minutos en EtOH 90%, 3 x 10 minutos en EtOH 96% y 3 x 10 minutos en EtOH 100%) para posterior inclusión en bloques de parafina.

Se obtuvieron aortas de ratón para hacer estudios de expresión génica (*Mat. y Mét. 5*), expresión proteica (*Mat. y Mét. 4*), estudios histológicos (*Mat. y Mét. 19*), para la detección de la producción de moléculas vasoactivas (*Mat. y Mét. 15*), para la evaluación de la reactividad vascular (*Mat. y Mét. 13*) y para el aislamiento de células endoteliales (*Mat. y Mét. 3.2*). En todos los casos la obtención de las aortas siguió el mismo procedimiento. Los animales se sacrificaron (*Mat. y Mét. 2.1*) y se colocaron en posición decúbito supino. Con ayuda del material de cirugía adecuado, se abrieron desde el final del abdomen hasta la base la cabeza, retirando los órganos colindantes. Las aortas se extrajeron pinzándolas desde la bifurcación de las arterias ilíacas, separándolas del tejido conectivo hasta alcanzar su inserción en el corazón. A continuación se sumergieron en suero salino y se eliminó el tejido adiposo colindante. Para los estudios de expresión génica y proteica, los animales fueron previamente perfundidos con suero salino para eliminar los restos de sangre.

### **3.2 Obtención y cultivo de células endoteliales**

Las células endoteliales vasculares son uno de los principales objetos de estudio de este trabajo. Para su obtención se extrajeron aortas (*Mat. y Mét. 3.1*) de al menos 5-7 ratones de unos 20-25 gramos de peso. Una vez obtenidas, las aortas se mantuvieron en PBS frío y en condiciones de esterilidad en cabina de flujo laminar. Se limpiaron las aortas, eliminando el tejido adiposo adyacente y la

capa adventicia, incubándolas durante 20 minutos a 37°C con una solución compuesta de medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*-D5796, Sigma-Aldrich) suplementado con 100 U/ml de penicilina, 0.1 mg/ml de estreptomicina y 0.65 mg/ml de colagenasa tipo 2 (300 U/mg CLS-2 LS004176-Worthington Biochemical Corporation). Las aortas se trocearon en pequeños anillos de 2 mm de longitud y se incubaron a 37°C durante 40 minutos con una solución de DMEM con 4 mg/ml de colagenasa tipo 2. A continuación se detuvo la reacción proteolítica de la colagenasa añadiendo DMEM enriquecido con 10% de suero bovino fetal (FBS – del inglés *Fetal Bovine Serum* 1020-098 Gibco). Los anillos aórticos, tras ser lavados al menos dos veces con DMEM enriquecido con 10% de FBS, se cultivaron en placas p60 previamente recubiertas con una solución de 0.5% de gelatina (G9382, Sigma-Aldrich) y 0.1 mg/ml de colágeno (C8919, Sigma-Aldrich).

Tras varios días en cultivo se observó la formación de colonias celulares alrededor de los anillos aórticos. La selección de las células endoteliales se llevó a cabo por incubación durante 30 minutos a 4°C con una solución compuesta de medio de cultivo para células endoteliales suplementado con 3.5 µl/ml del anticuerpo anti-CD102 (553326, BD Pharmigen). Después de esta primera incubación, se lavaron las células y se incubaron durante 30 minutos a 4°C con un anticuerpo secundario asociado a perlas magnéticas (Dynabeads®110.35, Invitrogen) en medio de cultivo para células endoteliales. Las células se lavaron tres veces con PBS y se levantaron con tripsina. Se detuvo la acción de la tripsina diluyéndola con medio rico en suero (DMEM enriquecido con 10% de FBS) y se recogieron las células en suspensión. Por último, se expuso la solución celular a un campo magnético que retuvo las células que expresan el antígeno CD-102. Las células seleccionadas se crecieron con “medio de cultivo para células endoteliales” enriquecido con 10% de FBS en placas recubiertas de gelatina.

Para la obtención y el mantenimiento de los cultivos celulares se trabajó siempre en condiciones de máxima esterilidad en campanas de flujo laminar del tipo II-A. Los cultivos se mantuvieron siempre a 37°C en atmosfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Las

células se emplearon para experimentos *in-vitro* hasta que alcanzaron un máximo de 8 pases.

### **3.3 Obtención de leucocitos de médula ósea**

Para la realización de estudios de adhesión leucocitaria *in vitro* (*Mat. y Mét. 6.1*) y de reclutamiento leucocitario *in vivo* (*Mat. y Mét. 8*) se emplearon leucocitos procedentes de médula ósea de ratón. Para su obtención, se sacrificaron ratones (*Mat. y Mét. 2.2*) y se obtuvieron sus tibias y fémures. Los huesos se limpiaron de grasa y de tejido muscular con ayuda de un bisturí. A continuación se cortaron los extremos de cada hueso para mostrar la médula ósea, la cual se extrajo inyectando una solución de *Hanks* con una jeringa de insulina de 1 ml y una aguja de 27G. La médula ósea obtenida se disgregó por pipeteo suave y se incubó durante 5 minutos a 4°C con una tampón hipotónico (*Mat. y Mét. 1*) que eliminó los eritrocitos. Las células aisladas se mantuvieron en PBS frío hasta su utilización.

### **3.4 Obtención de sangre, suero y determinación de niveles de colesterol**

Se obtuvo sangre de ratones experimentales para la caracterización de las poblaciones leucocitarias y la determinación de los niveles séricos de colesterol. La extracción se realizó mediante punción submandibular, recogiendo no más de 100 µl de sangre en tubos tratados con EDTA (20.1288, Sarstedt).

La obtención de suero se hizo recogiendo 100 µl de sangre en tubos de polipropileno. A continuación se dejó que la sangre coagulara a temperatura ambiente durante 30 minutos. El coágulo se eliminó centrifugando 15 minutos a 2000 g y 4°C. El suero recogido se almacenó a -80°C hasta su análisis.

Los niveles de colesterol total y libre se estimaron usando el analizador automático Dimension RxL Max Clinical System (Siemens) a partir del método enzimático descrito por Allain y colaboradores (Allain, 1974), el cual se basa en la detección espectrofotométrica a 500 nm de la molécula quinonamina, obtenida a partir del peróxido de hidrógeno producido en las reacciones sucesivas de los ésteres de colesterol con la colesterol esterasa y la colesterol oxidasa.

## 4. Análisis de extractos proteicos

### 4.1 Obtención de extractos proteicos

Se obtuvieron extractos proteicos tanto de aorta como de cultivos celulares para posteriormente analizar la presencia de ciertas proteínas en diferentes condiciones experimentales. Los extractos proteicos de células endoteliales en cultivo se obtuvieron añadiendo 50  $\mu$ l de “tampón de lisis” (*Mat. y Mét. 1*) por cada  $10^6$  células. Para asegurar la correcta rotura de las células, se frotó la placa con un rascador y tras recoger la solución proteica, se congeló en nieve carbónica, se descongeló rápidamente en un baño termostático a 37°C y se agitó vigorosamente con un “vortex” durante 30 segundos, repitiendo este procedimiento al menos 3 veces. Las membranas celulares de la solución se eliminaron centrifugando a 16000 rpm durante 30 minutos.

Para la obtención de extractos proteicos citoplasmáticos se incubaron las células durante 15 minutos con un tampón de lisis suave (*Mat. y Mét. 1*). Los extractos se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante.

Debido a las características resistentes y elásticas de las arterias, la obtención de extractos proteicos de aortas siguió un procedimiento ligeramente distinto. En este caso, cada aorta se sumergió en 100  $\mu$ l de tampón de lisis y se disgregó utilizando el sistema TissueLyser (QUIAGEN), el cual rompe el tejido golpeándolo con esferas metálicas a gran velocidad. Una vez homogeneizada la muestra, se centrifugó a 16000 rpm para descartar los restos tisulares y las membranas celulares. El sobrenadante se recuperó y se congeló a -80°C para su posterior uso.

En todos los casos la extracción se llevó a cabo manteniendo las muestras a 4°C durante todo el procedimiento para prevenir la degradación proteica.

### 4.2 Análisis de extractos proteicos (SDS-PAGE y *Western-Blot*)

El análisis de la composición de los extractos proteicos se realizó mediante *SDS-PAGE* e inmunodetección por *Western-Blot*. Como primera paso se cuantificó la

concentración total de proteínas en los extractos empleando el método descrito por Bradford (Bradford 1976), el cual se basa en la capacidad que tiene el compuesto químico “azul brillante de Coomassie” para unirse a las proteínas de manera inespecífica. Esta unión produce una coloración en la solución que puede ser detectada a 595 nm y cuya intensidad es proporcional a la concentración proteica de la muestra. La determinación de la concentración de las muestras se hizo por extrapolación a partir de una recta patrón realizada con soluciones de concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA - del inglés *Bovine serum albumin* - A7906-100G SIGMA) de entre 0 y 10 µg/µl. Para ello se prepararon cubetas de espectrometría a las que se añadieron 1 ml de la solución comercial Bio-Rad Protein Assay (500-0006-Bio-Rad) y 1 µl de cada una de las muestra patrón. Del mismo modo y en paralelo se prepararon tantas cubetas como muestras experimentales a analizar. Tras agitar, se dejó que se desarrollara la reacción colorimétrica durante al menos 20 minutos y se midió la absorbancia en todas las cubetas empleando un espectrofotómetro (UV-1603, Shimadzu).

### **Electroforesis en SDS-PAGE**

La electroforesis permite la separación de las proteínas de una mezcla según distintos parámetros. La electroforesis en *SDS-PAGE* consiste en la separación de proteínas tratadas con dodecilsulfato sódico (SDS - del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate*) mediante migración por acción de un campo eléctrico a través de una matriz de poliacrilamida (*PAGE* - *Polyacrylamide Gel* Electrophoresis).

Los extractos proteicos fueron tratados con una solución de 0.1% de SDS, confiriéndoles una carga negativa homogénea por unidad de masa. Posteriormente, para cargar las muestras en los geles electroforéticos se trataron con una solución de 0.2 mg/ml de azul de bromofenol, 20% de glicerol y 10% de 2-mercaptoetanol. El azul de bromofenol permite visualizar el frente electroforético durante la carrera mientras que el mercaptoetanol rompe los puentes disulfuro y asegura la desnaturalización proteica. Por último las proteínas se calentaron a 95°C durante 5 minutos para provocar su

desnaturalización. Estos tratamientos permitieron que la separación final dependiera del tamaño proteico y no de la carga endógena o de la conformación de la proteína.

Los geles para la electroforesis se prepararon partir de una solución comercial de acrilamida-bis-acrilamida al 30% (161-0156 Bio-Rad). Los geles se dividieron en dos partes, una superior denominada *stacking* o “concentradora” preparada con 5% de acrilamida y pensada para concentrar la muestra antes de la separación por pesos moleculares (disolución de acrilamida-bis-acrilamida, tampón 1M TRIS 1M-pH 6.8, 10% SDS, 10%  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  y TEMED) y otra denominada *resolving* o “separadora”, encargada de la separación de las proteínas (disolución de acrilamida-bis-acrilamida al porcentaje deseado, tampón 1.5 M Tris-Base pH 8.8, 10% SDS, 10% persulfato amónico y TEMED). El porcentaje de acrilamida empleado dependió del peso molecular de las proteínas a separar, siendo de 8-10% para proteínas de alto peso molecular y de 12-14% para proteínas de bajo peso molecular.

Se cargaron entre 10 y 25  $\mu\text{g}$  de proteína por condición y se realizó la migración proteica en tampón de electroforesis (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS) a una intensidad de 100 voltios en un sistema MiniProtean II (Bio-Rad) equipado con una fuente de voltaje hasta que el frente hubo recorrido todo el gel. Junto con las muestras de interés se corrió un marcador de pesos moleculares (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards 161-0374, Biorad) que se empleó para la posterior identificación proteica.

### **Western-Blot**

Las proteínas separadas por pesos moleculares se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF, del inglés *Polyvinylidene fluoride*). Para ello, los geles de poli(acrilamida) se pusieron en contacto con la membrana de PVDF y se aplicó una corriente eléctrica de 100 V durante 90 minutos en tampón de transferencia (25 mM Tris pH 8.3, 192 mM glicina y 20% metanol) gracias al sistema MiniProtean (Bio-Rad). Una vez transferidas a la membrana, se procedió



a la inmunodetección de las proteínas de interés incubando la membrana con anticuerpos específicos. Previamente y para minimizar interacciones inespecíficas del anticuerpo con las zonas sin proteína, la membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de bloqueo al 5% de BSA en TBS-T. A continuación la membrana se incubó durante 12 horas a 4°C con una solución de bloqueo a la que se le añadió el anticuerpo primario. Para poder hacer visible la interacción antígeno-anticuerpo, las membranas se incubaron tras 3 lavados de 5 minutos con TBS-T, con una solución de TBS-T y 5% de BSA que contenía un anticuerpo secundario frente al anticuerpo primario. Este anticuerpo secundario está ligado a la peroxidasa del rábano (HRP- del inglés *Horseradish Peroxidase*) de tal manera que en contacto con el reactivo revelador ECL-Plus (Amersham Biosciences) genera una reacción luminiscente que fue registrada por el sistema de detección (Fujifilm LAS-3000) y posteriormente analizada con el software ImageQuant (GE Healthcare) para su cuantificación. En la **tabla 4** se incluyen las referencias de los anticuerpos primarios y secundarios empleados y las concentraciones usadas para la inmunodetección.

Anticuerpo	Casa comercial y referencia	Descripción	Dilución/ concentración de uso	Técnica
anti-p27	BD (610242)	Monoclonal de ratón	1/500	WB
anti- $\alpha$ -tubulina	Santa Cruz Biotechnology (sc-8035)	Monoclonal de ratón	1/1500	WB
anti- $\alpha$ -actina	Santa Cruz Biotechnology (sc-32251)	Monoclonal de ratón	1/1500	WB
anti-ERM	Cell Signaling Technology (3142)	Policlonal de conejo	1/1000	WB
anti-fosfo-ERM	Cell Signaling Technology (3149)	Monoclonal de conejo	1/1000	WB
anti-p27-fosfo-S10	Abcam (ab62364)	Monoclonal de conejo	1/1500	WB
anti- $\beta$ -actina	Santa Cruz Biotechnology (sc-47778)	Monoclonal de ratón	1/2000	WB
anti-VCAM-1	Santa Cruz Biotechnology (sc-1504)	Policlonal de cabra	1/1000	WB
			100 $\mu$ g/ratón	MI
IgG control	R&D Systems (AB-108-C)	Monoclonal de cabra	100 $\mu$ g/ratón	MI

Anticuerpo	Casa comercial y referencia	Descripción	Dilución/ concentración de uso	Técnica
anti-Sel-P	BioXcell (clon RB40.34)	Monoclonal de conejo	1/1000	WB
anti-ICAM-1	BioXcell (BE0020-1)	Monoclonal de rata	1/1000	WB
anti-iNOS	Santa Cruz Biotechnology (sc-650)	Policlonal de conejo	1/1000	WB
anti-eNOS	Santa Cruz Biotechnology (sc-650)	Policlonal de conejo	1/1500	WB
anti-COX-1	Cayman Chemical (160109)	Policlonal de conejo	1/1000	WB
anti-COX-2	Cayman Chemical (160112)	Monoclonal de ratón	1/1000	WB
			1/250	IHQ
anti-IgG-conejo (HRP)	Santa Cruz Biotechnology (sc-2004)	Hecho en cabra. Conjugado con HRP	1/5000	WB
anti-IgG-cabra (HRP)	Santa Cruz Biotechnology (sc-2020)	Hecho en burro. Conjugado con HRP	1/5000	WB
anti-IgG-ratón (HRP)	Santa Cruz Biotechnology (sc-2005)	Hecho en cabra. Conjugado con HRP	1/5000	WB
anti-Mac-3	Santa Cruz Biotechnology (sc-19991)	Monoclonal de rata	1/300	IHQ
anti-SM- $\alpha$ - actina (fosfatasa alcalina)	Sigma-Aldrich (A5691)	Monoclonal de ratón. Conjugado a fosfatasa alcalina	1/50	IHQ
anti-IgG de rata (biotinilado)	Vector Laboratories (BA-9400)	Producido en cabra. Conjugado a biotina.	1/400	IHQ
anti-F4/80 (Alexa Fluor 488)	Serotec (MCA497A488-AbD)	Monoclonal de cabra. Conjugado al fluoróforo Alexa 488	1/500	IF
anti-CD11b (APC)	Biologend (101211 Clon M1/70)	Monoclonal de rata. Conjugado al fluoróforo APC	1/200	Cit
anti-CD49d (biotinilado)	Biologend (103703)	Monoclonal de rata. Conjugado a biotina	1/200	Cit
anti-CD62L (APC)	BD (561919 Clon MEL- 14)	Monoclonal de rata. Conjugado al fluoróforo APC	1/200	Cit
anti-PSGL1 (PE)	BD (555306 Clon 2PH1)	Monoclonal de rata. Conjugado al fluoróforo PE	1/200	Cit
Estreptavidina (APC)	Ebioscience (17-4317-82)	Conjugada a APC	1/500	Cit

**Tabla 4. Lista de anticuerpos empleados.** WB= *Western-Blot*, IHQ= Inmunohistoquímica, IF= Inmunofluorescencia, MI= Microscopía intravital. Cit= Citometría de flujo.

## 5. Análisis de expresión génica. PCR cuantitativa en tiempo real

### 5.1 Extracción de ARN

El análisis de la expresión de los distintos genes estudiados en este trabajo se realizó por PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) a partir de ADNc obtenido por retrotranscripción del ARNm presente en células y tejidos.

La extracción se llevó a cabo tanto en células endoteliales como en aorta. En ambos casos el procedimiento fue similar. Las células en cultivo se trataron con el reactivo TRIzol (15596-026, Life Technologies) raspando con un rascador para facilitar la rotura celular. Para la extracción de ARNm de aortas, el tejido se sumergió en 200  $\mu$ l de Trizol y se disgregó empleando el aparato Tissuelyser de modo similar al expuesto en el apartado (*Mat. y Mét. 4.1*). Una vez homogeneizadas, las muestras se centrifugaron a 16000 rpm y a 4°C durante 15 minutos para eliminar los restos no solubles.

El ARNm se obtuvo por separación de fases y precipitación. Se añadieron 0.2 ml de cloroformo por cada 1 ml de TRIzol y se agitó la mezcla vigorosamente. Tras una breve incubación a temperatura ambiente, se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 4°C y se recuperó la fase acuosa. La precipitación se llevó a cabo añadiendo 1.5 volúmenes de isopropanol por cada volumen de fase acuosa recuperada. El ARNm se dejó precipitando durante un mínimo de 12 horas a -20°C. El precipitado se recuperó centrifugando 15 minutos a 12000 g y 4°C, descartando todo el sobrenadante para, a continuación, lavarlo con una solución de 70% de etanol. Por último se retiró el etanol y se resuspendió el ARNm en un pequeño volumen (20-30  $\mu$ l) de agua ultrapura (agua MiliQ).

El ARNm obtenido se cuantificó mediante absorbancia espectrofotométrica a 260 nm de longitud de onda con el sistema NanoDrop (Thermo Scientific). La pureza de los extractos obtenidos se determinó calculando el cociente de absorbancias a 260 y 280 nm, obteniéndose valores cercanos a 2 (pureza máxima).

## 5.2 PCR cuantitativa en tiempo real

Para la realización de la qPCR se retrotranscribieron a ADNc entre 0,5 y 2 µg de ARNm mediante el empleo de un *kit* comercial (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit 4368814, Applied biosystems) basado en la acción de una transcriptasa inversa y el uso de oligonucleótidos aleatorios. Cada reacción, llevada a cabo en un volumen final de 20 µl, se realizó con 200 unidades de la transcriptasa reversa MML-V (del inglés *Moloney murine leukemia virus*), 100 ng de oligonucleótidos aleatorios y 40 unidades de un inhibidor de ribonucleasas.

La qPCR se realizó utilizando el método de *SYBER Green* (SYBR Green PCR Master mix, 4472908, Applied Biosystems). Este método se basa en la interacción de un fluorocromo con la doble cadena de ADN lo que produce un complejo capaz de absorber longitudes de onda en torno a 497 nm y emitir a 520 nm, lo que permite el seguimiento de la reacción a tiempo real y la cuantificación de los amplificados mediante el uso del sistema ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Por cada reacción se amplificaron 10 ng de cDNA.

Para la cuantificación relativa de la expresión génica se siguió el método descrito por Livak y Schmittgen (Livak, 2001). Este método se basa en la determinación del denominado parámetro “Ct” que se define como el ciclo en el que la fluorescencia emitida durante la reacción supera un umbral fijado y que es menor cuanto mayor es la cantidad de ARNm del gen amplificado. La determinación de la expresión del gen estudiado es relativa a un gen endógeno denominado “*housekeeping*” cuya expresión es invariable en la condición experimental y se calcula mediante la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  :

$$\text{Ratio} = 2^{-[(Ct_{\text{Gen interés}} - Ct_{\text{Gen housekeeping}}) \text{ condición 2} - (Ct_{\text{Gen Interés}} - Ct_{\text{Gen housekeeping}}) \text{ condición 1}]}$$

Siendo  $\Delta Ct$  el Ct de nuestro gen de interés menos el Ct del gen endógeno y el  $\Delta\Delta Ct$  la diferencia entre el  $\Delta Ct$  de una condición problema (2) y la control (1).

Gen (proteína)	Cebador en sentido (5' a 3')	Cebador en antisentido (5' a 3')
<b>Sell</b> (Sel-L)	AAACGAAAGGCAGCTCTCTG	CCCCTAATACCCTGCATCAC
<b>Selp</b> (Sel-P)	GGTATCCGAAAGATCAACAATAAGTG	GTTACTCTTGATGTAGATCTCCACACA
<b>Icam1</b> (ICAM-1)	GGACCACGGAGCCAATTTTC	CTCGGAGACATTAGAGAACAATGC
<b>Vcam1</b> (VCAM-1)	GACCTGTTCCAGCGAGGGTCTA	CTTCCATCCTCATAGCAATTAAGGTG
<b>eGFP</b> (eGFP)	CGACGGCAACTACAAGAC	TAGTTGTA CTCCAGCTTGTGC
<b>Nos2</b> (iNOS)	GGCAGCCTGTGAGACCTTTG	GCATTGGAAGTGAAGCGTTTC
<b>Nos3</b> (eNOS)	TCAGCCATCACAGTGTTCCTC	ATAGCCCGCATAGCGTATCAG
<b>COX1</b> (COX-1)	TGGCCAAGGTCTACCCCG	CTCTGTACCCAAAGACTGCC
<b>COX2</b> (COX-2)	AGTCTCTCAATGAGTACCGGAAA	AAGTTCTTCAAATGATGTGTACGG
<b>mPges1</b> (mPGES1)	AGCACACTGCTGGTCAATCAA	TCCACATCTGGGTCACTCCT
<b>mPges2</b> (mPGES2)	ACTTCCACTCCCTGCCCTAT	GTTGCAAGCTGTCTCCTTCC
<b>cPges3</b> (cPGES)	GGCAAAGCTTAATTGGCTCA	ATCCTCATCACCACCCATGT
<b>Ptjis</b> (PTGIS)	TCCATCCCTATGCCATCTTC	ACTGCCTGCTTCTGTGGAGT
<b>Tbxas1</b> (TBXAS1)	GAGGTGCTGGGACAACGTAT	GCCTCTGCTGTGAACCTTTC
<b>Mmp2</b> (MMP-2)	GCACCACCGAGGACTATGAC	ACTTGTGCCAGGAAAGTG
<b>Mmp3</b> (MMP-3)	AGTGGATCTTGCAGTTGGAA	ATTAACCAGCTATTGCTTCAATATG
<b>Mmp9</b> (MMP-9)	CGTGTCTGGAGATTCGACTTGA	TGGAAGATGTCGTGTGAG
<b>Mmp12</b> (MMP-12)	GCTGTCAACAGTGGGAGA	ATACCAGATGGGATGCTTGG
<b>Mmp13</b> (MMP-13)	CCTTCTGGTCTTCTGGCACAC	GGCTGGTCTGTCACACTTCTCTGG
<b>Timp1</b> (TIMP1)	GCATCTCTGGCATCTGGCATC	GCGGTTCTGGGACTTGTGGGC
<b>Gapdh</b> (GAPDH)	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	CCTGCTTACCACCTTCTTGAT
<b>Hprt1</b> (HGPRT)	CCTAAGATGAGCGCAAGTTGAA	CCACAGGACTAGAACACCTGCTAA
<b>36b4</b> (RPLP0)	ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG	TCCCACCTGTCTCCAGTCT

**Tabla 5. Cebadores empleados para qPCR**

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del cDNA correspondiente a cada gen estudiado se obtuvo de la literatura o se diseñó *ex profeso* mediante el programa informático “*Primer3*” teniendo en cuenta los parámetros estándares resumidos en (Thornton, 2011). Para cada pareja de oligonucleótidos se comprobó la eficiencia de amplificación y la posibilidad de formar dímeros.

En la **tabla 5** se detalla la secuencia de los cebadores utilizados en los estudios de expresión génica de este trabajo.

## 6. Ensayos de adhesión leucocito-endotelio

Para la determinación de la capacidad de adhesión de las células leucocitarias al endotelio se llevaron a cabo aproximaciones *in vitro* e *in vivo*.

### 6.1 In vitro

El método consistió en la incubación de leucocitos marcados fluorescentemente con cultivos de células endoteliales. Se aislaron leucocitos de médula ósea de

ratón (*Mat. y Mét.* 3.3) y se incubaron 10 minutos a 37°C con 1  $\mu$ M del fluoróforo BCECF-AM (Molecular Probes, Inc.) en medio de cultivo DMEM con 0,1% de FBS. Las células se lavaron dos veces con medio DMEM suplementado con 10% de FBS y se resuspendieron en medio de cultivo para células endoteliales.

Por otro lado se cultivaron células endoteliales procedentes de aorta de ratón en placas de 96 pocillos hasta que alcanzaron confluencia. Antes de añadir los leucocitos a los pocillos para establecer contacto con las células endoteliales, estas se activaron con TNF $\alpha$  (2 ng/ml) durante 8 horas. Se añadieron  $5 \times 10^4$  leucocitos marcados por pocillo y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. A continuación se añadió medio de cultivo hasta el borde del pocillo, se selló la placa con una lámina de plástico y se invirtió durante 30 minutos, lo que permitió la eliminación por gravedad de aquellos leucocitos que no interaccionaron con el endotelio. La cantidad de leucocitos adheridos se evaluó lisando la células con una solución de 0.1% de SDS en 50 mM de Tris a pH 8.5 y midiendo la intensidad de fluorescencia emitida a una longitud de onda de 538 nm tras excitación a 485 nm en un lector de microplacas (Fluoroskan Ascent, Thermo Scientific). La fluorescencia recogida fue indicativa del número de leucocitos adheridos al endotelio en cada condición. Para asegurar que el marcaje fluorescente de los leucocitos fue similar en todas las condiciones, se comprobó dicho marcaje mediante citometría de flujo.

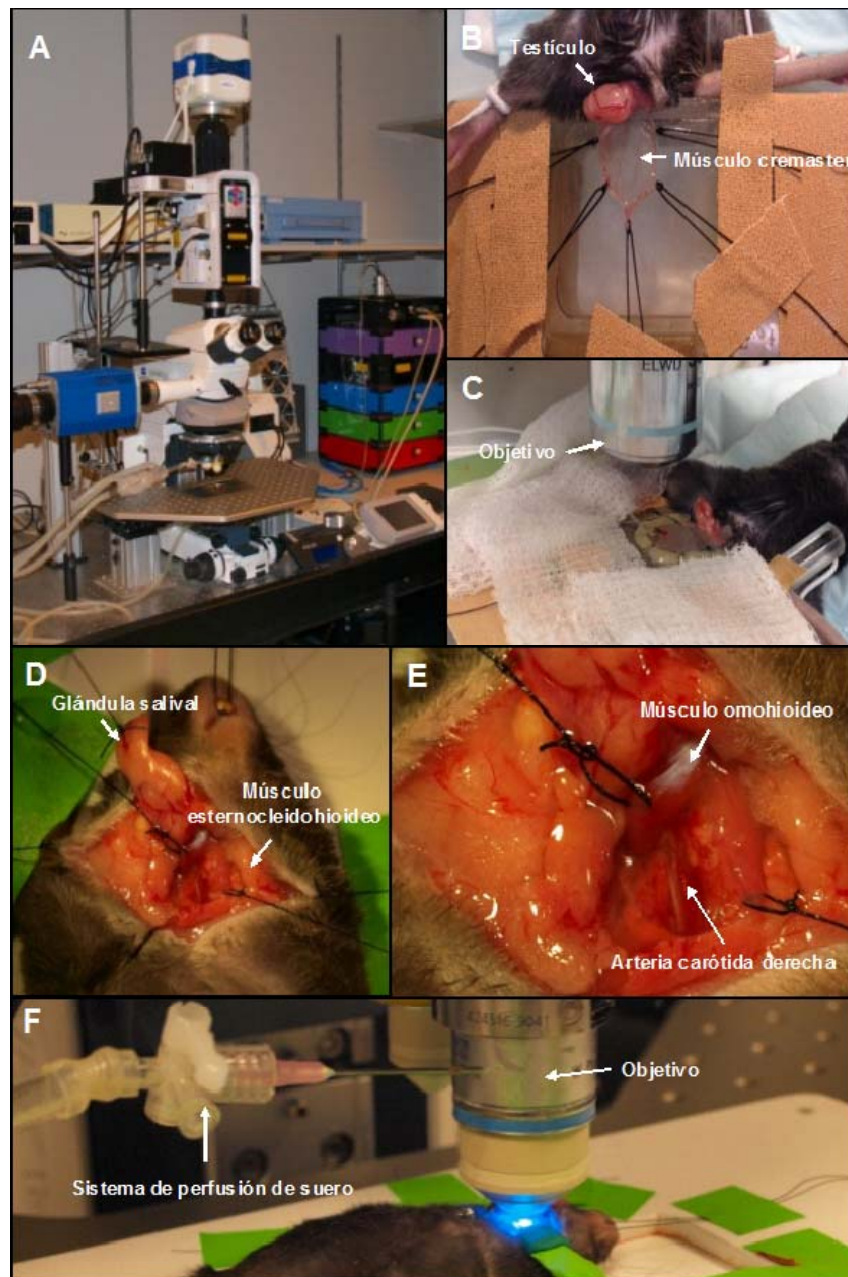
Este experimento se llevó a cabo en condiciones basales e inhibiendo la ruta de señalización RhoA/ROCK, para lo cual las células endoteliales fueron incubadas con medio de cultivo suplementado con fasudil ( $10^{-5}$  mM) durante las 24 horas previas a la realización del ensayo.

## **6.2 *In vivo*. Microscopía intravital en cremaster de ratón**

El estudio de la adhesión leucocitaria al endotelio *in vivo* se llevó a cabo mediante microscopía intravital de arteriolas de músculo de cremaster de ratón. Se trata de una técnica que permite la visualización de distintos procesos fisiológicos y celulares en organismos vivos en condiciones próximas a las naturales. Este método se ha establecido como una importante herramienta para

la caracterización de gran número de procesos biológicos gracias a los importantes avances en las técnicas de marcaje celular y al desarrollo de potentes microscopios (**figura 12-A**).

La preparación del músculo cremaster para su perfecta visualización requiere de una cuidada cirugía. Los ratones se anestesiaron con una dosis intraperitoneal



**Figura 12. Microscopía intravital.** A. Microscopio de epifluorescencia adaptado para microscopía intravital. B. Preparación del músculo cremaster de ratón para su visualización. C. Colocación del músculo cremaster bajo el objetivo. D y E. Exposición de la arteria carótida para su visualización. F. Colocación del animal bajo el objetivo para la observación de la carótida.

de ketamina (Imalgene 1000; Merial) y medetomidina (Medeson; Urano) de 50 y 0.5 mg/kg respectivamente. A continuación se inmovilizaron en posición decúbito supino y se les depiló la región púbica. Bajo lupa y empleando material de microcirugía, se diseccionó el músculo cremaster aislándolo de los tejidos adjuntos. El músculo fue cortado longitudinalmente con un cauterizador y se extendió sobre un pedestal transparente apropiado para la visualización (**figura 12-B**). Para mantener una correcta temperatura y unas condiciones fisiológicas adecuadas, el músculo se perfundió durante todo el procedimiento con suero salino a 37°C. La visualización de las arteriolas se llevó a cabo empleando un microscopio intravital (Leica DM6000-FS) con un objetivo de inmersión acuosa Apo 40X NA 1.0 equipado con una cámara DFC350-FX en condiciones de campo claro (**figura 12-C**). Para promover la interacción entre los leucocitos y el endotelio se inyectaron en los testículos 100 µl de TNF $\alpha$  (1,66 µg/ml) 4 horas antes de la cirugía. Para la adquisición y el procesamiento de las imágenes se utilizó el programa informático LAS-AF. La adhesión leucocitaria se analizó en 150 µm de arteriola durante un tiempo de 5 minutos.

Los experimentos de adhesión leucocitaria se llevaron a cabo en condiciones basales y bajo dos estados alternativos: inactivando la vía RhoA/ROCK y bloqueando la molécula de adhesión endotelial VCAM-1. Los primeros se realizaron tratando los animales con una dosis oral de 40 mg/kg/día de fasudil durante los cuatro días previos a la cirugía. Por su parte, el bloqueo de VCAM-se realizó inyectado una dosis intravenosa de 100 µg del anticuerpo  $\alpha$ -VCAM-1 inmediatamente después de realizar la cirugía.

## 7. Estudios de rodamiento leucocitario en carótida de ratón

Para estudiar el rodamiento leucocitario sobre el endotelio durante la aterogénesis se realizaron experimentos de visualización de carótida de ratón mediante microscopía intravital siguiendo el protocolo recientemente puesto a punto en nuestro laboratorio (Chevre, 2014). Los animales se anestesiaron e inmovilizaron en posición decúbito supino de manera similar al apartado *Mat. y Mét. 6.2*. Para exteriorizar la arteria carótida del animal se realizó una pequeña



incisión vertical a la altura del cuello. Con cuidado, se fijó la glándula salival sobre la preparación y se separaron los músculos que rodean la arteria carótida, fijándolos con suturas (**figura 12-D y 12-E**). A continuación se separó el nervio vago derecho de la arteria carótida y se colocó una pieza de metal plana por debajo de la arteria, la cual se sujetó a un soporte lateral. Finalmente, para evitar el excesivo movimiento arterial causado por el pulso cardíaco, se colocó sobre la arteria un cubreobjetos pulido, el cual se fijó a la parte superior del soporte utilizando plastilina. La región estabilizada se colocó bajo el objetivo del microscopio multicanal de epifluorescencia equipado con un escáner de resonancia (**figura 12-F**). La humedad y la temperatura del tejido se mantuvieron constantes mediante un goteo de suero salino a 37°C.

Para la visualización de los leucocitos se inyectaron por vía intravenosa 50 µg de rodamina 6G (Sigma), una molécula fluorescente con un máximo de emisión a 566 nm. Las imágenes se capturaron con un objetivo Apo 6X NA 0.9 de inmersión acuosa tanto en campo claro como con un filtro Cy3 para la rodamina. La cantidad de células en rodamiento se determinó contando el número de leucocitos que atravesaron una línea imaginaria perpendicular al vaso durante al menos 30 segundos de grabación. Para la visualización se eligieron las zonas sensibles a sufrir aterosclerosis, preferiblemente regiones cercanas a la bifurcación de la carótida. El número de células en rodamiento se normalizó por el número de capturas o “frames” grabados en cada ocasión.

## **8. Estudios de reclutamiento leucocitario en aorta *in vivo***

Los estudios de migración leucocitaria en aorta de ratón como consecuencia del proceso aterosclerótico se realizaron mediante transferencia adoptiva de leucocitos en ratones apoE<sup>-/-</sup>. El procedimiento consistió en la inyección intravenosa, durante dos días consecutivos, de 5 millones de leucocitos procedentes de médula ósea (*Mat. y Mét. 3.3*) de ratones apoE<sup>-/-</sup> Mafia en ratones apoE<sup>-/-</sup> que estuvieron alimentados 10 días con dieta rica en grasa (10.8% grasa total, 0.75% colesterol; S4892-E010, Ssniff). A continuación se sacrificaron los animales y se obtuvieron sus aortas torácicas (*Mat. y Mét. 2.1*).

Se extrajo el ARNm de dichas aortas (*Mat. y Mét. 5.1*) y se analizó por qPCR (*Mat. y Mét. 5.2*) la expresión de EGFP, la cual indicó el grado de extravasación leucocitaria.

Este experimento se llevó a cabo en condiciones basales e inactivando la vía de señalización RhoA/ROCK. Para esto se administró por vía oral una dosis de 40 mg/kg/día de fasudil durante los 4 días previos al sacrificio de los animales.

## **9. Estudios de formación de placa aterosclerótica temprana**

Para el estudio de aterosclerosis temprana se alimentaron durante 4 semanas animales apoE<sup>-/-</sup> Mafia y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A Mafia con una dieta rica en grasa (10.8% grasa total, 0.75% colesterol; S4892-E010, Ssniff). Estos animales fueron sacrificados a las 16 semanas de edad y se les extrajo el corazón para el estudio histológico del seno aórtico (*Mat. y Mét. 19.1*).

## **10. Análisis de poblaciones leucocitarias y moléculas de adhesión**

Para la caracterización de las poblaciones leucocitarias en sangre se emplearon técnicas de citometría de flujo. La citometría de flujo es una técnica biofísica basada en la utilización de luz láser, que permite el recuento y clasificación de células según sus características morfológicas y ópticas. El citómetro de flujo es un aparato con un sistema de fluidos capaz de adquirir muestras de células en suspensión y determinar distintos parámetros de la misma por el método de la impedancia o *Coulter*, el cual mide y cuenta células detectando los cambios de impedancia eléctrica que provoca una partícula cuando pasa por un líquido conductor a través de él. De este modo cada célula causa cambios en la impedancia de la conductividad eléctrica que son registrados como incrementos en el voltaje entre dos electrodos. El número de impulsos detectados es proporcional al número de partículas en la suspensión mientras que intensidad de los mismos es proporcional al volumen de cada partícula. Con esto se

obtienen diagramas de distribución de volúmenes que permiten identificar poblaciones celulares. Además, el empleo de láseres de emisión a diferentes longitudes de onda permite la excitación y posterior detección de fluoróforos, posibilitando la detección de proteínas específicas mediante inmunodetección.

La determinación de las principales subpoblaciones leucocitarias en sangre (monocitos, neutrófilos y linfocitos) se llevó a cabo de manera automática con el sistema Abacus Junior (Diatron) directamente en sangres extraídas de los ratones experimentales.

La cuantificación de la expresión de las moléculas de adhesión en leucocitos circulantes de ratón se llevó a cabo mediante inmunomarcaje con anticuerpos fluorescentes. Se extrajo sangre de los animales experimentales (*Mat. y Mét. 3.4*) y se incubó con 10 volúmenes de tampón de lisis para eritrocitos (*Mat. y Mét. 1*). Posteriormente los leucocitos se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente con los anticuerpos específicos frente a las moléculas de adhesión leucocitaria (Sel-L, PSGL1, CD11b CD49d) mostrados en la **tabla 4**. Para el marcaje con anticuerpos biotinilados los leucocitos se incubaron posteriormente durante 30 minutos con una solución de estreptavidina fluorescente. Una vez lavadas, las células se resuspendieron en una solución de 2 $\mu$ g/ml de DAPI (marcador de viabilidad celular) en PBS y se estudiaron con el sistema FACs Canto (BD Biosciences) equipado con el software DIVA (BD Biosciences).

## 11. Ensayos de proliferación en cultivos de células endoteliales

Se evaluó la proliferación de células endoteliales *in vitro* mediante experimentos de incorporación de un análogo fluorescente de la timidina (Click-iT® Plus EdU Alexa Fluor® 488 Flow Cytometry Kit, Life Technologies) al ADN de nueva síntesis. Las células endoteliales fueron ayunadas durante 24 horas con medio de cultivo sin FBS para sincronizar el cultivo en G<sub>0</sub>. Posteriormente se les cambió el medio por uno rico en mitógenos (10% de FBS) con una concentración de 10  $\mu$ M Click-iT® Plus como indica el fabricante. Las células fueron recogidas a distintos tiempos de incubación tras tripsinización. Se analizó la fluorescencia

de dichas células por citometría de flujo excitándolas con un láser de emisión a 488 nm y recogiendo la señal a emitida a 530/30 nm. Se detectó el número de células que habían incorporado dicho elemento (número de células en división) y la intensidad de fluorescencia de dichas células (número de divisiones que había sufrido la célula). El grado de proliferación células se determinó utilizando la herramienta “*Proliferation*” del programa informático *Flow-Jo*, la cual permitió establecer el índice de división celular, definido como el número promedio de divisiones que han sufrido las células de un cultivo en relación al cultivo original.

## **12. Ensayos de migración en células endoteliales en cultivo**

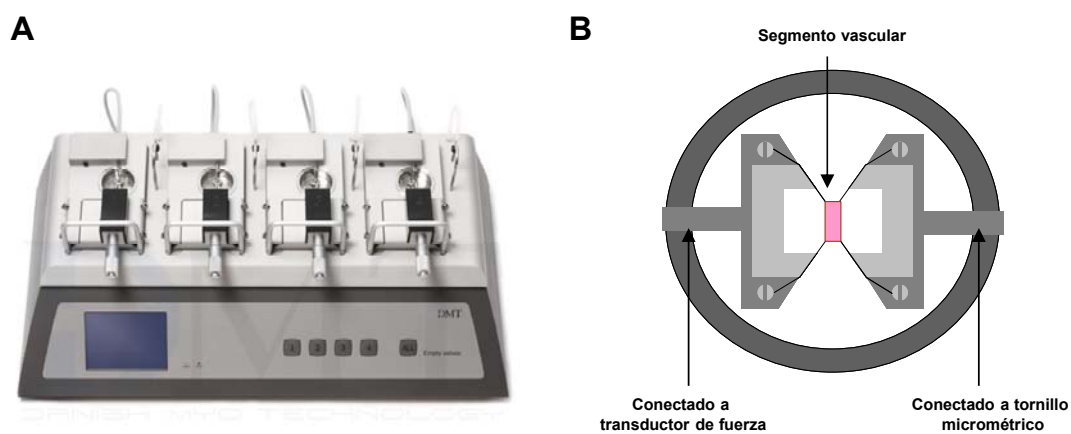
El estudio de la capacidad migratoria de células endoteliales se llevó a cabo mediante experimentos de migración celular en membrana porosa. Se cultivaron células endoteliales en pocillos “*transwell*” con una superficie porosa de tamaño de poro de 8  $\mu\text{m}$  (Corning) previamente recubiertos con gelatina. Las células se mantuvieron en cultivo durante 24 horas con medio para células endoteliales sin FBS. A continuación se cambió el medio de cultivo celular por uno rico en suero (10% de FBS) y se dejó que las células migraran a través de la membrana porosa durante 24 horas. Para cuantificar la migración celular, se recuperaron las membranas, se eliminaron mediante raspado las células que permanecieron en la cara superior de la membrana (células no migradas) y se fijaron sumergiéndolas en una solución de 4% de PFA durante 3 horas. A continuación las células se tiñeron tratando las membranas con una solución de 2  $\mu\text{g/ml}$  de DAPI en PBS durante 2 horas. Finalmente las membranas se montaron en un portaobjetos con medio de montaje (SlowFade – Life Technologies) y se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia.

## **13. Estudios de reactividad vascular *ex vivo*. Miógrafo de alambre**

Para evaluar la reactividad vascular y la capacidad contráctil de aortas de ratón *ex-vivo*, se empleó la miografía de alambre. Esta técnica desarrollada por Mulvany y Halpern (Mulvany, 1976) permite determinar la contractilidad y la

reactividad de un vaso tras un estímulo vasoconstrictor midiendo la tensión que ejerce dicho vaso anclado a un alambre. Para la realización de estos experimentos se sacrificaron los animales y se obtuvieron sus aortas (*Mat. y Mét.* 2.1), las cuales se sumergieron inmediatamente en tampón Krebs-Henseleit a 4°C. Con ayuda de una lupa, se diseccionó el vaso, eliminando todo el tejido conectivo y la grasa adyacente. Posteriormente las aortas se cortaron en segmentos de 2 mm y se montaron en las cámaras del sistema *DMT multi-chamber wire myograph* (DMT) (**figura 13-A**) con tampón Krebs-Henseleit a 37°C y con constante burbujeo de carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>). Los segmentos se montaron entre dos alambres uno fijo y otro móvil conectado a un transductor de fuerza que detecta el movimiento (**figura 13-B**). Tras 30 minutos, en los que se dejó que los segmentos de las aortas se estabilizasen, se realizó la normalización de las condiciones experimentales iniciales con el objetivo de establecer un estado basal de los vasos que imitase la distensión fisiológica.

La tensión inicial en reposo del vaso en el sistema determina su respuesta vasomotora, por lo que es crítico que todos los segmentos partan de la misma tensión inicial. El procedimiento para la normalización consiste en estirar el vaso montado y grabar la fuerza ejercida por la pared del vaso a cada punto de distensión. La fuerza es automáticamente grabada por el módulo de normalización de DMT, mientras que la distensión es registrada a través de la ruleta micrométrica y anotada manualmente. Este procedimiento permite el



**Figura 13. Miógrafo de alambre.** (A) Sistema para miografía de alambre *DMT multi-chamber wire myograph*. (B) Preparación del segmento vascular en la cámara del sistema.

cálculo del diámetro interno vascular, el cual se obtiene como la diferencia entre las medidas de la ruleta micrométrica y el diámetro conocido de 2 alambres montados.

Ya que la tensión de la pared es la fuerza medida dividida por la longitud de la pared (normalmente 2 mm) y el grosor del vaso es constante, la presión efectiva correspondiente a cada distensión se calcula automáticamente usando las ecuaciones de Laplace:

$$\text{Tensión} = (\text{Presión} \times \text{radio}) / \text{grosor}$$

$$\text{Presión efectiva} = \text{Tensión mural} / (\text{Circunferencia interna} / 2\pi)$$

En primer lugar, se verificó la integridad del vaso mediante la realización de una curva de contractilidad inespecífica en respuesta a KCl. El KCl activa los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  de las CMLVs, incrementando la concentración de calcio libre en el citosol e induciendo la contractilidad celular por activación de la quinasa de la cadena ligera de la miosina (Ratz, 2005). Se incubaron los segmentos con una concentración de KCl de 120mM en tampón Krebs-Henseleit y se dejó que contrajesen durante 5 minutos registrando su movimiento. Posteriormente se lavaron las aortas 4 veces con tampón Krebs-Henseleit a 37° C y se dejaron estabilizar. A continuación se estiraron los segmentos hasta alcanzar una presión efectiva de 100 mmHg.

Para determinar la capacidad contráctil del vaso se realizó una curva de contractilidad a distintas dosis de fenilefrina. Para esto se añadieron a las cámaras, soluciones madres crecientes de fenilefrina, obteniéndose concentraciones finales de 1nM, 10 nM, 0,1 $\mu$ M, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M. Se registró la respuesta contráctil a cada una de las concentraciones y la contractilidad se representó como el porcentaje de contracción de cada segmento con respecto a la contracción máxima inducida por KCl.

Se realizaron este tipo de curvas en segmentos aórticos en estado basal, denudados de endotelio y tratados con el inhibidor de COX-2 NS-398. Para

eliminar el endotelio, los segmentos de aorta fueron colocados sobre un papel, se aplastaron y se hicieron rodar para que las caras interiores del vaso se tocaran. Para el bloqueo de la enzima COX-2 se añadió NS-398 (1  $\mu$ M) al tampón Krebs-Henseleit durante todo el procedimiento.

#### **14. Ensayos de reactividad vascular *in vivo***

Se llevaron a cabo experimentos de reactividad vascular *in vivo* mediante microscopía intravital en arteriolas del músculo cremaster de ratón. La preparación de los animales y la adquisición de las imágenes fueron similares a la detallada en *Mat. y Mét.* 6.2. La contractilidad vascular se evaluó administrando por vía venosa una dosis de 50  $\mu$ l de fenilfreina a 1 mM. Las arteriolas se grabaron durante los 20 segundos previos a la administración del fármaco y durante los 5-10 minutos siguientes. La capacidad contráctil del vaso se determinó midiendo el diámetro del vaso antes y después de la administración del fármaco a diferentes tiempos hasta que recuperó su estado inicial. Para evitar las diferencias de contractilidad atribuibles al calibre arterial, se obtuvieron imágenes de arteriolas de diámetros similares.

Estos experimentos se realizaron en condiciones fisiológicas y tras inactivación de la enzima COX-2. Para ello los ratones fueron tratados con una dosis oral de 0.12 mg/día del inhibidor específico NS-398 los tres días anteriores a la cirugía.

#### **15. Determinación de moléculas vasoactivas liberadas por aorta de ratón**

Se determinó la liberación de tromboxano 2 (TXA<sub>2</sub>), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) y prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) mediante *kits* comerciales basados en el método de ELISA (del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). El sistema ELISA se basa en la detección de un antígeno en una solución, mediante su incubación

con una superficie tratada con un anticuerpo que lo reconoce específicamente y lo inmoviliza. A continuación se evidencia esta unión, empleando otro anticuerpo conjugado a una enzima que reconoce el antígeno inmovilizado y permite llevar a cabo una reacción colorimétrica que da una señal fácilmente detectable por espectrometría.

El producción de  $\text{TXA}_2$  se determinó con el *kit*  $\text{TXB}_2$  ELISA Kit (501020, Cayman Chemical) siguiendo las instrucciones del fabricante. La detección de  $\text{TXA}_2$  es difícil ya que se hidroliza rápidamente de manera no enzimática a tromboxano  $\text{B}_2$  ( $\text{TXB}_2$ ). El *kit* empleado detecta específicamente  $\text{TXB}_2$ , metabolito mucho más estable. El ensayo consta de unos pocillos recubiertos de un anticuerpo monoclonal específico para  $\text{TXB}_2$  y se basa en la competición entre  $\text{TXB}_2$  y  $\text{TXB}_2$  conjugado a acetilcolinesterasa ( $\text{TXB}_2$ -AChE trazador) por el número limitado de anticuerpos de  $\text{TXB}_2$  presentes en el pocillo. El trazador es incubado a una concentración conocida mientras que el  $\text{TXB}_2$  libre altera la unión del trazador al anticuerpo. De este modo, la cantidad de trazador que es capaz de unirse al anticuerpo es inversamente proporcional a la cantidad de  $\text{TXB}_2$  libre en el pocillo. La detección del trazador inmovilizado en cada pocillo se lleva a cabo a partir de una reacción mediada por la acetilcolinesterasa a la que va conjugada. Esta enzima en presencia de tiocolina (o reactivo de Ellman) produce la síntesis de ácido 5-tio-2-nitrobenzoico que posee una coloración amarilla y que puede ser detectada por espectrofotometría a 412 nm. La absorbancia a esta longitud de onda fue proporcional a la cantidad de trazador unido e inversamente proporcional al  $\text{TXB}_2$  libre de la muestra. A partir de concentraciones conocidas de  $\text{TXB}_2$  suministradas por el fabricante se realizaron curvas de absorbancia-concentración que se emplearon para la determinación exacta de la concentración de  $\text{TXA}_2$  de las muestras por extrapolación.

Para la determinación de la liberación de  $\text{PGE}_2$  y  $\text{PGI}_2$  se utilizaron los *kits*  $\text{PGE}_2$  ELISA Kit – Monoclonal (514010, Cayman Chemical) y 6-keto  $\text{PGF}_{1\alpha}$  ELISA Kit (515211, Cayman Chemical) basados en el mismo principio que el kit empleado para medir el  $\text{TXB}_2$ .  $\text{PGI}_2$  se hidroliza espontáneamente a 6 keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ . El ensayo se basa en la competición de 6 keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  y de 6 keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$



conjugados a AChE. Por su parte la detección de PGE<sub>2</sub> se basa en la competición entre PGE<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub> conjugado con AChE.

Las muestras se obtuvieron sumergiendo segmentos aórticos de 2 mm de longitud en tampón Krebs-Henseleit a 37°C con constante burbujeo de carbógeno durante 20 minutos. La medida de la reacción colorimétrica se llevó a cabo empleando un espectrofotómetro de microplacas (xMark Microplate Absorbance Spectrophotometer – Biorad). La determinación de la liberación de TXA<sub>2</sub> también se realizó en condiciones de bloqueo de la actividad de COX-2, para lo cual se siguió exactamente este mismo procedimiento, suplementando el tampón Krebs-Henseleit con NS-398 para una concentración final de 1 μM.

## **16. Análisis de la actividad COX en células endoteliales en cultivo**

El estudio de la actividad COX en cultivos celulares se llevó a cabo mediante el empleo de un *kit* comercial (760151 –Cayman) basado en la detección colorimétrica a 590 nm del compuesto N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenediamina (TMPD) obtenido a partir de la actividad peroxidasa de COX. La actividad en las muestras se calculó por extrapolación a partir de una recta patrón realizada con soluciones de COX de concentración conocida. Las muestras consistieron en un homogeneizado proteico obtenido a partir de 10<sup>6</sup> células en 90 μl de tampón de lisis (0.1 M Tris-HCl, pH 7.8 con 1 mM de EDTA). Para la determinación específica de la actividad de COX-2, las muestras se trataron con el inhibidor DUP-697 como indicó el fabricante. El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos y la señal colorimétrica se detectó en un lector de microplacas (xMark Microplate Absorbance Spectrophotometer– Biorad).

## **17. Medidas de presión arterial**

La presión arterial de los ratones se registró utilizando el sistema BP-2000 (Visitech Systems), el cual se compone de un esfigmomanómetro que se coloca

en la cola del ratón, un emisor de luz y un detector. Este sistema se basa en el fenómeno de la transmisión fotopleletismográfica, de modo que la variación en la cantidad de luz transmitida a través de la cola es la señal básica que se analiza para determinar la presión arterial y el pulso cardíaco. Cada vez que el corazón late, una onda de presión viaja a través del sistema vascular. Cuando alcanza la cola, los vasos se dilatan ligeramente lo que dispersa más la luz incidente (momento correspondiente a la sístole). A medida que la ola de presión pasa, los vasos en la cola se hacen más pequeños como consecuencia de la bajada de presión, dándose una menor dispersión de la luz (momento correspondiente a la diástole). El sistema BP-2000 detecta la variación en la luz transmitida a través de la cola del ratón y calcula automáticamente los valores de presión sistólica y diastólica en ratones conscientes.

Los datos de presión arterial se calcularon como el promedio de 10 mediciones consecutivas. Para obtener valores fiables de presión arterial, los ratones fueron adaptados al sistema haciendo medidas diarias de presión arterial durante al menos una semana.

## **18. Estudios de formación de AAA**

Para el estudio del AAA se utilizó el modelo descrito por Daugherty y colaboradores (Daugherty, 2000) basado en la infusión de AngII en ratones apoE<sup>-/-</sup>. El procedimiento consistió en la implantación subcutánea de una bomba osmótica (2004, Alzet) de liberación de AngII para la administración de una dosis de 1µg/kg/min durante 28 días. Para la colocación del dispositivo liberador de angiotensina, se anestesiaron los animales con isoflurano inhalado (2% en oxígeno) y se les practico una pequeña incisión en la espalda a escasos milímetros del cuello, por la que se introdujo la bomba osmótica. La bomba se activó previamente sumergiéndola en suero salino a 37°C durante un mínimo de 48 horas. La herida se cerró con sutura y se aplicó desinfectante. Tras 28 días de tratamiento con AngII se sacrificaron los animales y se obtuvieron las aortas para su análisis histológico (*Mat. y Mét. 19.2*).

Para estudiar la progresión de la enfermedad durante el modelo se llevó a cabo la visualización de la aorta abdominal mediante ecografía de ultrasonidos (sistema VEVO770). Para esto, los ratones fueron depilados en su zona abdominal y se anestesiaron con isofluorano inhalado. Posteriormente fueron colocados en posición decúbito supino y con una sonda abdominal se visualizó la aorta desde su inicio de la aorta torácica hasta la bifurcación de las arterias renales. Se midió el tamaño de la aorta en aquella posición donde el diámetro era máximo (normalmente justo por encima de las suprarrenales). Para el cálculo final del diámetro de la aorta abdominal, se hizo un promedio midiendo un mínimo de dos imágenes por ratón y un mínimo de dos diámetros por imagen. Se tomaron imágenes de ecografía antes de implantar las bombas (día 0) y durante el transcurso del modelo (día 2, 5, 12, 18, 24 y 28).

Este modelo patológico se llevó a cabo en condiciones control y en condiciones de bloqueo de la enzima COX-2. Para esto se administró a los ratones una dosis intraperitoneal de 5 mg/ kg del inhibidor NS-398 en días alternos, empezando tres días antes de la implantación de las bombas osmóticas y hasta el final del modelo tras 28 días de infusión de AngII.

## **19. Estudios histológicos**

### **19.1 Caracterización de las lesiones ateroscleróticas**

Para la cuantificación de la formación de placa aterosclerótica se obtuvieron cortes histológicos de 3 micras de grosor de tres regiones distintas de la válvula aórtica a partir de los corazones obtenidos de los animales experimentales. Los cortes histológicos se desparafinaron y rehidrataron mediante lavados con xileno (tres lavados de 4 minutos), etanol al 95% (dos lavados de 4 minutos), etanol al 70% (dos lavados de 2 minutos), etanol al 50% (dos lavados de 2 minutos) y agua ultrapura MilliQ (un lavado de 5 minutos).

Para la correcta visualización del tejido se realizó una tinción de hematoxilina-eosina (H/E). Los cortes histológicos se sumergieron durante 30 segundos en una solución de hematoxilina de Harris (Sigma) que tiñó los núcleos celulares de color violeta intenso, posteriormente se aclaró la tinción mediante lavados rápidos en una solución de diferenciación (0,25% (v/v) de HCl en etanol al 70%) y a continuación se tiñeron los citoplasmas celulares sumergiendo las muestras durante 20 segundos en una solución hidroalcohólica de eosina al 50%. Por último se realizó la deshidratación de los cortes histológicos mediante un tratamiento inverso al anteriormente expuesto y se montaron con medio comercial Eukitt (O. Kindler GmbH & Co).

Se obtuvieron imágenes de 3 cortes por cada una de las 3 regiones analizadas (desde el inicio de la aorta torácica hasta la zona de las válvulas) empleando un microscopio (Olympus BX41) con un objetivo de 20X acoplado a una cámara (Olympus UC30). Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el software de imagen *Image J* (NIH), cuantificándose el área de la lesión aterosclerótica para cada una de las muestras.

Para analizar el contenido en macrófagos de las placas ateroscleróticas se empleó la inmunofluorescencia de tejido. Esta técnica permite en muestras histológicas la localización de un antígeno mediante la incubación con anticuerpos específicos y la detección de esta unión a partir de anticuerpos secundarios fluorescentes. La composición en macrófagos de las placas ateroscleróticas se llevó a cabo mediante la detección del antígeno F4/80. Para ello se obtuvieron cortes histológicos de seno aórtico de manera similar a la ya expuesta (*Mat. y Mét. 19.1*). Después de su hidratación (*Mat. y Mét. 19.1*), los cortes histológicos fueron tratados con tampón de citrato de sodio a 100°C durante 20 minutos, lo que expuso el antígeno. A continuación, se realizó un bloqueo de uniones inespecíficas mediante tratamiento con medio de bloqueo (suero de caballo al 5 % en PBS) durante 45 minutos y se incubaron las muestras 12 horas a 4°C con el anticuerpo anti-F4/80 (dilución 1/500) conjugado al fluoróforo Alexa Fluor 488. Tras varios lavados con PBS, los cortes fueron tratados con una solución de 2 µg/ml de DAPI en PBS para marcar los núcleos y

se montaron en medio de montaje (SlowFade – Life Technologies). Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal Leica TCS/SP2 con un objetivo 40X de inmersión en aceite.

## 19.2 Caracterización de las lesiones aneurismáticas

Para determinar las características de los AAA en el modelo de infusión de AngII en ratón se realizaron estudios histológicos. Una vez administrada la AngII, las aortas fueron fijadas con PFA al 4%, deshidratadas, incluidas en parafina y cortadas a 3 micras de grosor. Se realizaron estudios inmunohistológicos para detectar el contenido en macrófagos y CMLVs así como de expresión de COX-2 de dichas lesiones.

Para la detección de macrófagos se empleó un anticuerpo específico frente al antígeno Mac-3 expresado en macrófagos. El tejido se desparafinó y se hidrató de siguiendo los mismos pasos ya expuestos en *Mat. y Mét. 19.1*. Los cortes histológicos fueron tratados con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en PBS durante 30 minutos, lo que bloqueó la actividad peroxidasa endógena. A continuación se bloquearon las interacciones inespecíficas que pudiera dar nuestro anticuerpo, incubando los cortes con una solución al 3% en suero de cabra durante 90 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron los cortes con el anticuerpo primario anti-Mac-3 en la propia solución de bloqueo (dilución 1/250) durante 12 horas a 4°C. Las secciones fueron lavadas 3 veces con PBS para eliminar el anticuerpo sobrante y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de rata conjugado a biotina (diluido 1/400 en medio de bloqueo). Por último se realizaron 3 nuevos lavados con PBS y se realizó una incubación de 7 minutos con estreptavidina conjugada a HRP (dilución 1/2 labvision). Tras 3 nuevos lavados con PBS se procedió al revelado, para lo cual se incubaron los cortes con el reactivo DAB (Serotec) que en presencia de la enzima HRP forma un precipitado de color marrón. Se procedió a su montaje tras deshidratación en alcoholes de gradación creciente con el medio de montaje comercial Eukitt como se explica en *Mat. y Mét. 19.1*.

La detección de COX-2 se llevó a cabo siguiendo exactamente el mismo procedimiento, incubando los cortes histológicos con el anticuerpo primario anti-COX-2 (dilución 1/250).

Para detectar la presencia de CMLVs en la lesión aterosclerótica se empleó un anticuerpo frente a  $\alpha$ -actina específica de músculo liso, conjugado a fosfatasa alcalina (**tabla 4**). El procedimiento fue similar al descrito para la detección de macrófagos y COX-2. Se desparafinaron los cortes histológicos y se incubaron con solución de bloqueo para evitar las interacciones inespecíficas. Posteriormente los cortes fueron incubados con una solución diluida 1/50 del anticuerpo en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Finalmente se lavaron las muestras con PBS al menos 3 veces y se reveló la interacción utilizando el sustrato comercial Fast Red (Sigma) que por acción de la fosfatasa alcalina produce un precipitado de color rojo. Los cortes se montaron en medio de montaje glicerol-gelatina (Sigma) sin deshidratar.

Para la detección de colágeno en ateroma se realizó la tinción tricrómico de Masson, compuesta por la hematoxilina de Weigert, el rojo fucsina y el colorante verde luz, que tiñen núcleos celulares, fibras musculares y colágeno, respectivamente. Para llevar a cabo esta tinción previamente se deben preparar dos soluciones de trabajo, una solución A compuesta por hematoxilina de Weigert al 1% en etanol absoluto y que se prepara al menos una semana antes de su uso manteniéndose siempre en oscuridad y una solución B formada por 0,4% (v/v) de cloruro férrico al 30% y 0,1 % (v/v) de ácido clorhídrico en agua destilada. En el momento de realizar la tinción ambas soluciones se mezclaron vertiendo la solución B sobre la A. Los cortes ya desparafinados (*Mat. y Mét. 19.1*) se sumergieron en la mezcla durante 4 minutos y posteriormente se lavaron con agua corriente al menos 10 minutos. A continuación se incubaron con una solución de fucsina al 0,1% y ácido acético al 10% en agua destilada, y seguidamente se sumergieron en una solución formada por ácido fosfotúngstico al 10% durante 4 minutos. Posteriormente los cortes histológicos se sumergieron en ácido acético al 10% en agua destilada durante 5 minutos, lo que provocó la desdiferenciación de la muestra. Por último los cortes se sumergieron en una

solución de verde luz al 1% (Fisher Scientific) y ácido acético al 0,5 % en agua destilada durante 50 segundos. Los cortes teñidos se lavaron en ácido acético al 10% durante 2 minutos y se deshidrataron sumergiéndolos rápidamente en alcohol del 95% (1 minuto), alcohol absoluto (1 minuto) y xileno (1 minuto). Finalmente las muestras se montaron con medio de montaje Eukitt.

Tanto para la cuantificación de los marcajes inmunohistoquímicos como para la cuantificación del contenido en colágeno, se realizó un promedio de un mínimo de 3 cortes histológicos por cada aorta a partir de 3 regiones distintas del aneurisma. La toma de imágenes se llevó a cabo utilizando un microscopio (Olympus BX41) con un objetivo de 20X acoplado a una cámara (Olympus UC30) y el análisis de la señal positiva se determinó utilizando el programa informático *ImageJ* (NIH). Los datos se representaron como el porcentaje de lesión positiva para dicho componente con respecto al área total de la lesión.

### **19.3 Estudios estructurales en aorta torácica**

Para determinar las características estructurales de la aorta torácica se emplearon dos técnicas histológicas. Por un lado se hizo una visualización general de las aortas mediante tinción de H/E, siguiendo el mismo procedimiento descrito en *Mat. y Mét. 19.1*. Por otro lado, se determinó el número de capas de elastina en aorta torácica aprovechando las características autofluorescentes de estas estructuras. Los cortes histológicos se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito en el apartado *Mat. y Mét. 19.1* y tras su hidratación se montaron directamente con medio de montaje (SlowFade – Life Technologies). Se determinó la cantidad de capas de láminas elásticas en secciones de aorta torácica en imágenes obtenidas en un microscopio confocal Leica TCS/SP2 con un objetivo de 40X recogiendo la señal emitida tras excitar la muestra con un láser de Argón emisor a 488 nm. Se analizaron por cada animal un mínimo de 3 cortes procedentes de 3 regiones distintas de la aorta.

## 20. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se representaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media. En los experimentos con dos grupos, la existencia de diferencias estadísticamente significativas se evaluó mediante un test de Student no pareado de una cola. Cuando se compararon más de dos grupos, se empleó un ANOVA de dos factores y el test post-hoc de Bonferroni. En ambos casos los test estadísticos se hicieron empleando el programa informático *GraphPad Prism*. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para valores de  $p < 0.05$ .







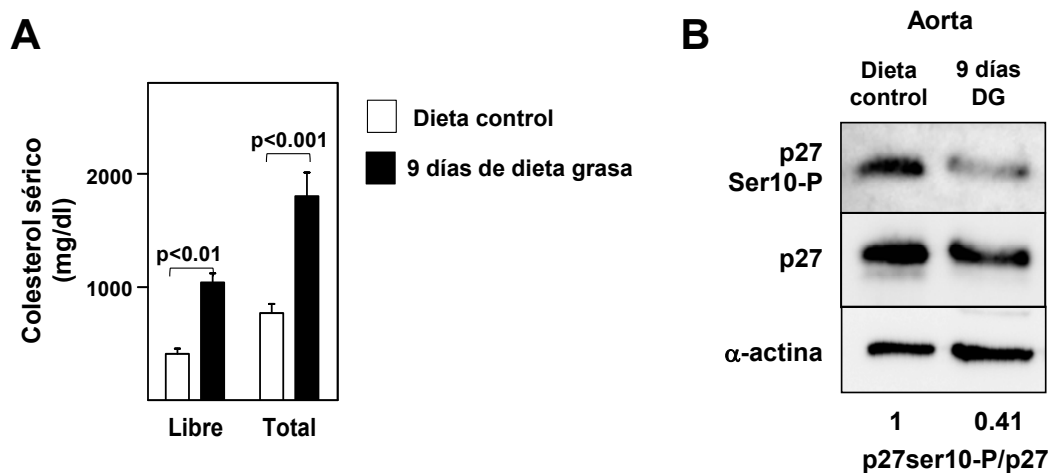
**Resultados**



## 1. Papel de la fosforilación de p27-S10 en la activación endotelial y en la formación de placa aterosclerótica temprana

### 1.1 La hipercolesterolemia inducida por dieta grasa reduce rápidamente la fosforilación de p27 en la S10 y promueve la expresión de moléculas de adhesión en aorta de ratón

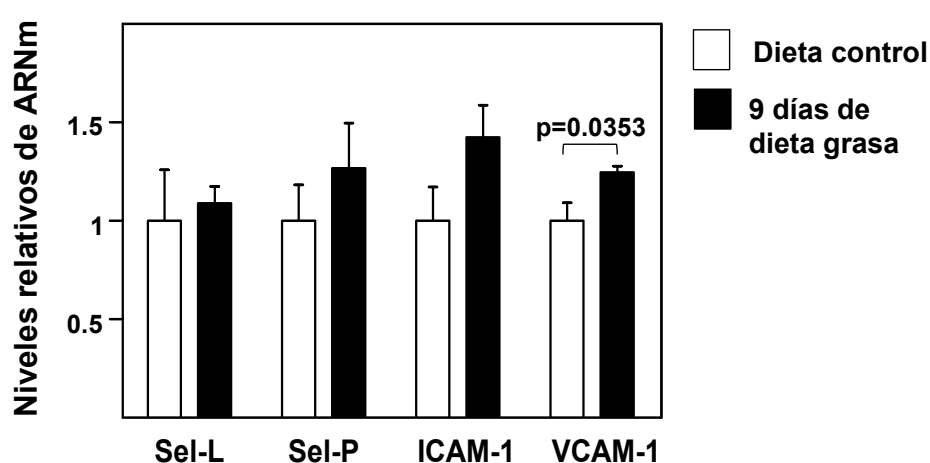
Estudios previos llevados a cabo en el laboratorio donde se ha desarrollado esta tesis han demostrado que la fosforilación de p27 en la S10 juega un papel fundamental en el desarrollo de placa aterosclerótica avanzada modulando la captación de LDLs modificadas por parte de los macrófagos (Fuster, 2011). Dado que la implicación de p27 en este proceso supone una función más allá de la clásica actividad antiproliferativa de la proteína, quisimos averiguar si esta modificación postraduccional también interviene en otros procesos relevantes en la aterogénesis, particularmente en las primeras etapas de la enfermedad.



**Figura 14. La hipercolesterolemia inducida por dieta grasa reduce rápidamente la fosforilación de p27 en la S10 en aorta de ratones apoE<sup>-/-</sup>.** (A) Niveles de coolesterol libre y coolesterol total en sueros de ratones apoE<sup>-/-</sup> alimentados con dieta control (n=5) o con dieta rica en grasa durante 9 días (n=5). (B) Análisis por *Western-Blot* de extractos proteicos procedentes de aortas de ratón apoE<sup>-/-</sup> alimentados con dieta control o con dieta rica en grasa (DG) durante 9 días. Se indica debajo la relación entre los niveles de p27 fosforilado en S10 y la cantidad total de p27 (p27ser10-P/p27) (relativo a control=1). Se detectó la cantidad de  $\alpha$ -actina en ambas condiciones como control de carga. Se muestra un *Western-Blot* representativo y el valor promedio de tres experimentos independientes realizados con una muestra de 6 aortas por condición.

Como primer paso, estudiamos si el grado de fosforilación de p27 en la S10 se ve regulado por la presencia de altos niveles de colesterol en sangre, ya que la hipercolesterolemia es uno de los principales causantes de la activación endotelial y del inicio del proceso aterosclerótico. Para esto, se alimentaron ratones apoE<sup>-/-</sup> con dieta grasa durante 9 días, tratamiento que no genera placas ateroscleróticas pero produce altos niveles de colesterol en sangre, como se pudo comprobar al analizar el colesterol total y libre en el suero (**figura 14-A**). Mediante *Western-Blot* se analizó la cantidad total de p27 y de su forma fosforilada en la S10 en extractos proteicos obtenidos de las aortas de estos mismos animales. El ensayo mostró que las aortas obtenidas de los ratones hipercolesterolemicos presentaban unos niveles de fosforilación en la S10 reducidos cuando se comparaban con los de las aortas de ratones alimentados con dieta control (**figura 14-B**). Estos resultados sugieren que la hipercolesterolemia promueve la defosforilación de p27 en la S10 a nivel aórtico antes de la aparición de placa aterosclerótica.

Dado que la activación endotelial es el primer fenómeno derivado de la acumulación lipídica en el espacio subendotelial, decidimos estudiar si la hipercolesterolemia generada tras sólo 9 días de dieta grasa era suficiente para inducir la expresión de moléculas de adhesión a nivel vascular. Se analizó

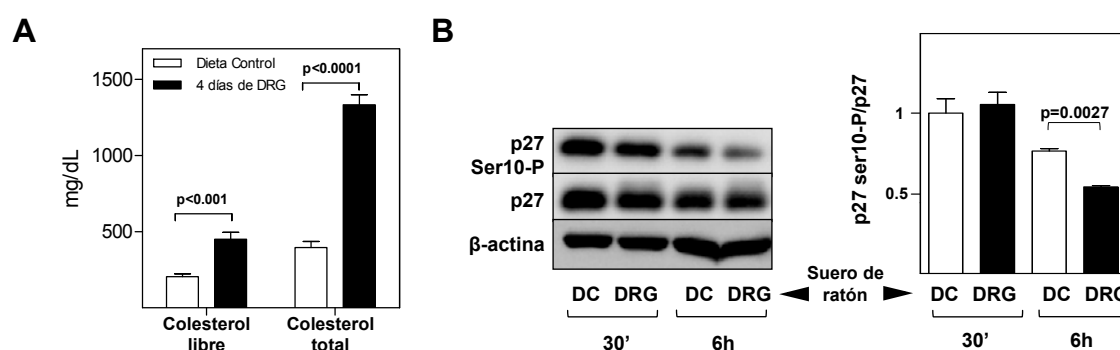


**Figura 15.** La hipercolesterolemia incrementa rápidamente la expresión de moléculas de adhesión en aorta de ratones apoE<sup>-/-</sup>. Análisis de los niveles de expresión génica de L-Sel, P-Sel, ICAM-1 y VCAM-1 en arco aórtico de ratones apoE<sup>-/-</sup> alimentados con dieta control (n=6) o con dieta grasa durante 9 días (n=5). Los datos son representados como expresión relativa de cada uno de los genes con respecto a la condición de dieta control.

mediante qPCR la expresión génica de Sel-L, Sel-P, I-CAM y VCAM-1 en el arco aórtico de ratones apoE<sup>-/-</sup> alimentados con dieta control o dieta grasa. El análisis mostró una ligera sobreexpresión de la mayoría de estas moléculas de adhesión en aorta de ratones apoE<sup>-/-</sup> sometidos a dieta grasa, que alcanzó significatividad estadística para VCAM-1 (**figura 15**).

## 1.2 La hipercolesterolemia induce la defosforilación de p27 en la S10 en células endoteliales de aorta de ratón *in vitro*

Los resultados anteriores mostraron una rápida defosforilación de p27 en la S10 y la sobreexpresión de VCAM-1 en aortas de ratón tras un breve periodo de hipercolesterolemia inducida por dieta grasa. Puesto que el endotelio vascular es el tipo celular donde se expresan preferentemente la mayoría de moléculas de adhesión, quisimos determinar si la hipercolesterolemia modifica el estado fosforilado de p27 en este tipo celular. Se trataron células endoteliales en cultivo con sueros de ratones alimentados con dieta estándar o alimentados durante 4 días con dieta grasa, que ya presentaban niveles altos de colesterol (**figura 16-A**). Tras analizar por *Western-Blot* los extractos proteicos se observó una clara reducción de los niveles de fosforilación de p27-S10 tras una incubación de 6 horas con sueros hipercolesterolémicos (**figura 16-B**). Estos resultados confirman que la hipercolesterolemia se asocia con un descenso en el grado de



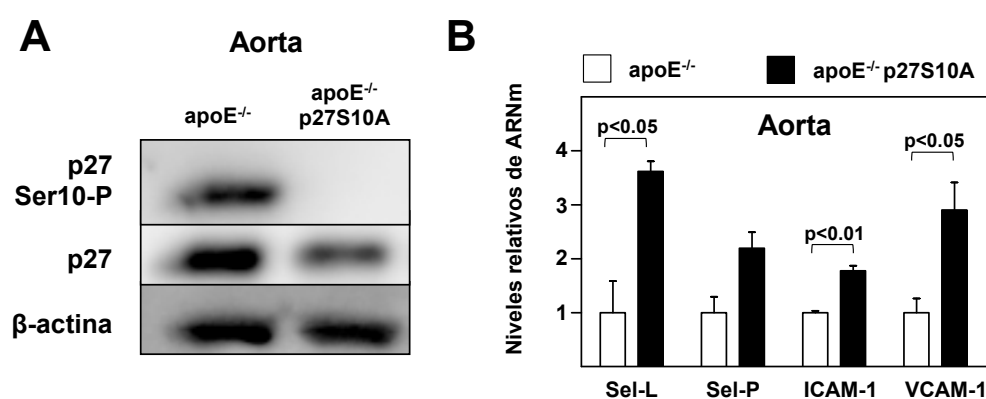
**Figura 16. La hipercolesterolemia induce la defosforilación de p27-S10 en células endoteliales de aorta de ratón.** (A) Niveles de colesterol libre y colesterol total en sueros de ratones apoE<sup>-/-</sup> alimentados con dieta control (n=4) o tras 4 días de dieta grasa (n=5). (B) Izquierda. Análisis por *Western-Blot* de los niveles de fosforilación de p27 en células endoteliales de aorta de ratón incubadas durante 30 minutos y 6 horas con sueros de ratón alimentados con dieta control (DC) o con dieta rica en grasa (DRG). Se analizó la cantidad de  $\beta$ -actina como control de carga. Derecha. Representación de la cuantificación de los niveles de p27 fosforilado relativizados a los niveles totales de p27 (p27ser10-P/p27) en dichas condiciones. Los datos muestran el promedio de dos experimentos independientes.

fosforilación de p27 en S10 en células endoteliales.

### 1.3 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 promueve la expresión de moléculas de adhesión en aorta de ratón

A continuación quisimos determinar si la sobreexpresión de moléculas de adhesión observada en aortas de ratones alimentados con dieta grasa durante 9 días (**figura 16**) era consecuencia de la defosforilación de p27 (**figura 15-B**) o por el contrario se debía al estado inflamatorio provocado por la hipercolesterolemia. Para responder a esta cuestión empleamos el ratón transgénico apoE<sup>-/-</sup> p27S10A, el cual expresa una versión mutada de p27 que no puede ser fosforilada en su décimo residuo. El estado defosforilado de p27 en estos ratones se confirmó en extractos proteicos procedentes de aorta, en los que se pudo comprobar como la forma fosforilada de p27-S10 es indetectable por *Western-Blot* con un anticuerpo específico para reconocer esta modificación (**figura 17-A**).

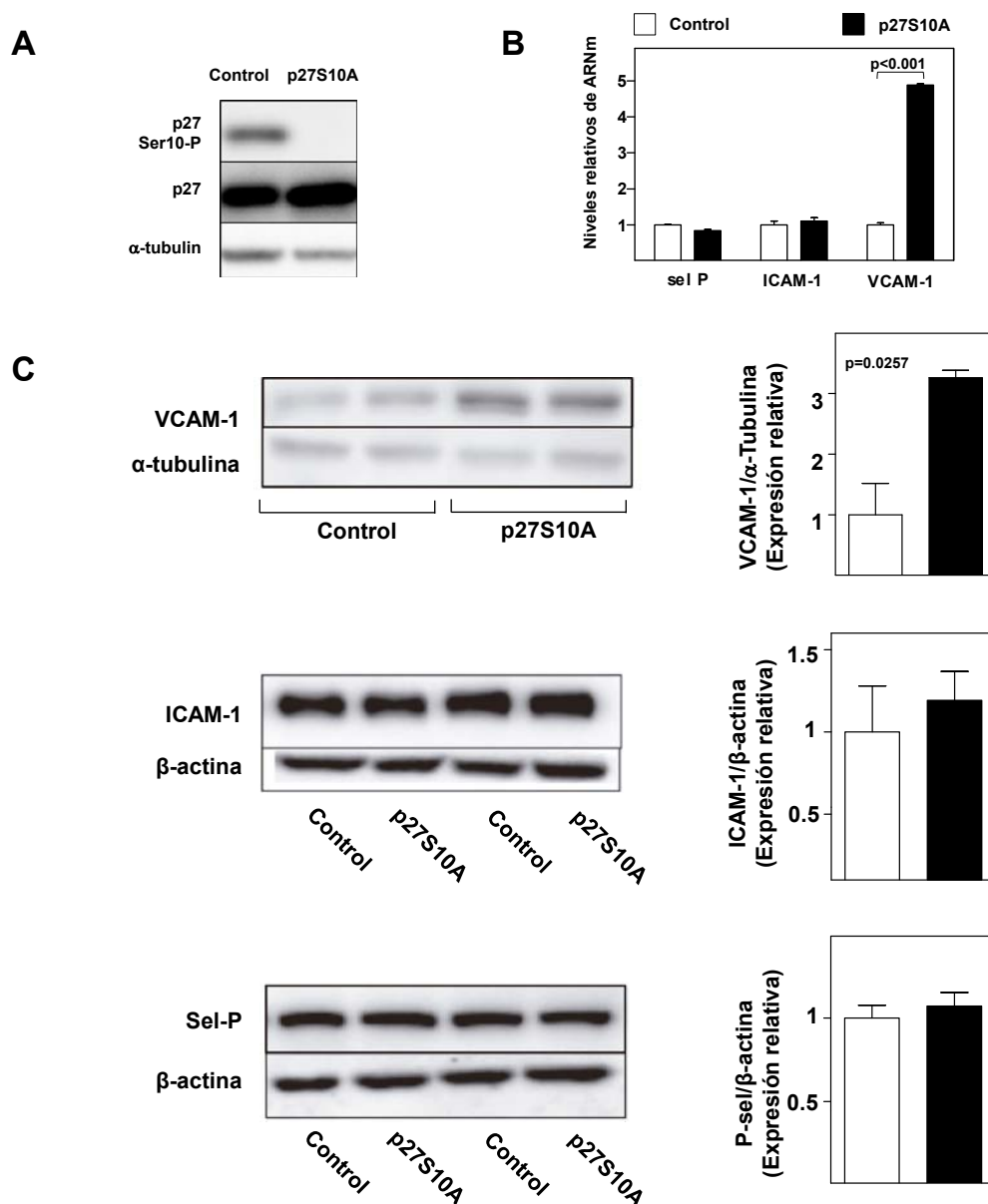
Al estudiar por qPCR la expresión génica de Sel-L, Sel-P, ICAM-1 y VCAM-1 en aortas de ratones apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A se observó que los niveles de expresión de Sel-L, ICAM-1 y VCAM-1 eran superiores en ausencia de la



**Figura 17.** La ausencia de fosforilación de p27 en la serina 10 incrementa los niveles de expresión de moléculas de adhesión en aorta de ratón. (A) Análisis por *Western-Blot* del estado fosforilado de p27 en aorta de ratones apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A. Se analizó la cantidad de β-actina en las muestras como control de carga. (B) Niveles de expresión génica de las moléculas Sel-L, Sel-P, ICAM-1 y VCAM-1 en aortas de ratones apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A (n=2 muestras de 2-3 aortas por condición). Los resultados se relativizaron para cada gen con su control (apoE<sup>-/-</sup>).



fosforilación de p27 en la S10 en estados no hipercolesterolémicos (**figura 17-B**). Este resultado reveló una relación causal entre la ausencia de fosforilación de p27-S10 y el aumento de la expresión de moléculas de adhesión en aorta.



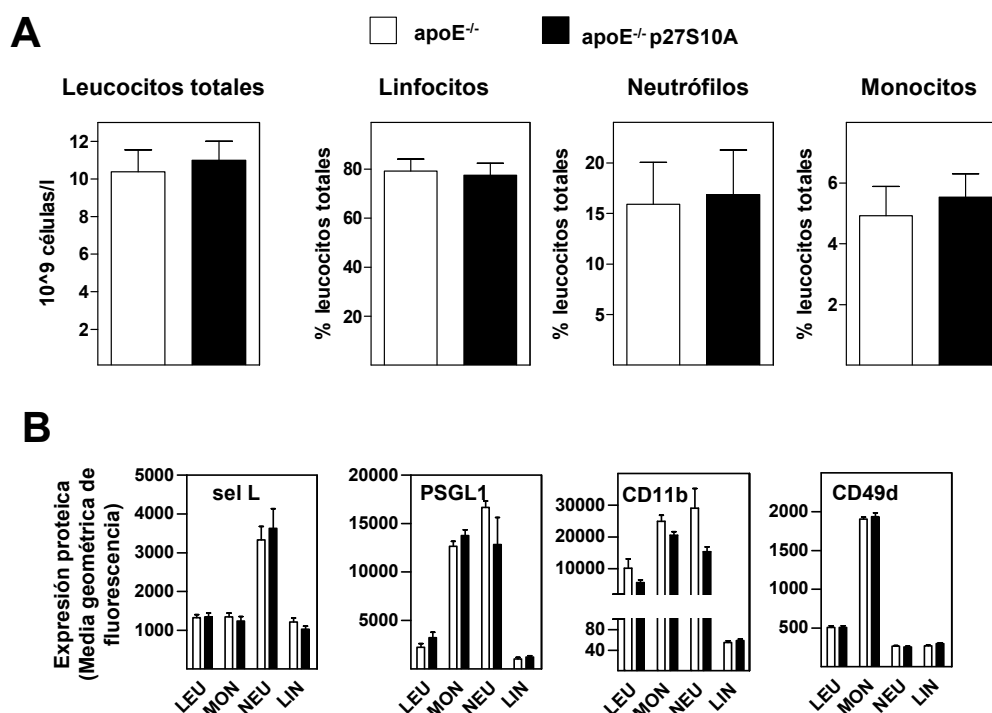
**Figura 18.** La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta la expresión de VCAM-1 en células endoteliales de aorta de ratón. (A) Análisis por *Western-Blot* del estado fosforilado de p27 en células endoteliales de aorta procedentes de ratones control y ratones p27S10A. Se detectó la expresión de  $\alpha$ -tubulina como control de carga. (B) Niveles de ARNm de las moléculas Sel-P, ICAM-1 y VCAM-1 en células endoteliales de aorta de ratón procedentes de animales control o p27S10A (n=2 grupos de 3 aortas por condición). Los datos se relativizaron para cada gen con su control. (C) Análisis por *Western-Blot* y cuantificación de los niveles proteicos de VCAM-1, ICAM-1 y Sel-P en células endoteliales de ratones control y ratones p27S10A. Se representaron los niveles de expresión de cada una de las proteínas relativos a la condición control. Se utilizaron como control de carga  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -actina. Se emplearon 2 cultivos distintos por condición. Los datos representados corresponden a dos experimentos independientes.

#### **1.4 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta la expresión de VCAM-1 en células endoteliales de aorta de ratón**

A continuación quisimos corroborar que el aumento de expresión de moléculas de adhesión específicas de endotelio observada en aortas de ratones carentes de la fosforilación de p27 en la S10 ocurre en este tipo celular. Para esto se aislaron células endoteliales de aorta de ratones p27S10A y de ratones silvestres, las cuales presentan respectivamente las formas desfosforilada y fosforilada de p27 en la S10 (**figura 18-A**). Observamos que la expresión de la forma no fosforilable de p27 no altera los niveles de expresión de Sel-P e ICAM-1 pero incrementa considerablemente los niveles VCAM-1 tanto a nivel de ARNm (**figura 18-B**) como a nivel proteico (**figura 18-C**). Este hallazgo confirmó la relevancia de la pérdida de la fosforilación de p27-S10 en la activación endotelial evidenciada por la sobreexpresión de VCAM-1.

#### **1.5 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 no modifica las poblaciones leucocitarias en sangre de ratón ni la expresión de moléculas de adhesión en leucocitos**

Los experimentos llevados a cabo hasta el momento indicaron un claro papel de la fosforilación de p27 en la regulación de la expresión de moléculas de adhesión, principalmente VCAM-1, en células endoteliales. Dado que estas moléculas juegan un papel fundamental en los procesos de interacción leucocito-endotelio y sabiendo que dicha fosforilación interviene en el comportamiento leucocitario (Fuster, 2011), quisimos averiguar si también participaba en el control del estado inflamatorio de los animales alterando los niveles leucocitarios en sangre o la expresión de ligandos proteicos en estas células. Con este fin se extrajo sangre de ratones apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A y se determinó, mediante citometría de flujo, el número de leucocitos totales, linfocitos, neutrófilos y monocitos (**figura 19-A**) así como la expresión de las integrinas Sel-L, PSGL-1 (ligando de Sel-P), CD11b (ligando de ICAM-1) y CD49b (ligando de VCAM-1) (**figura 19-B**) en cada uno de estas subpoblaciones. Los datos obtenidos demostraron que el déficit de fosforilación de p27 en la S10 no modifica las poblaciones leucocitarias presentes en sangre ni la expresión de ligandos en

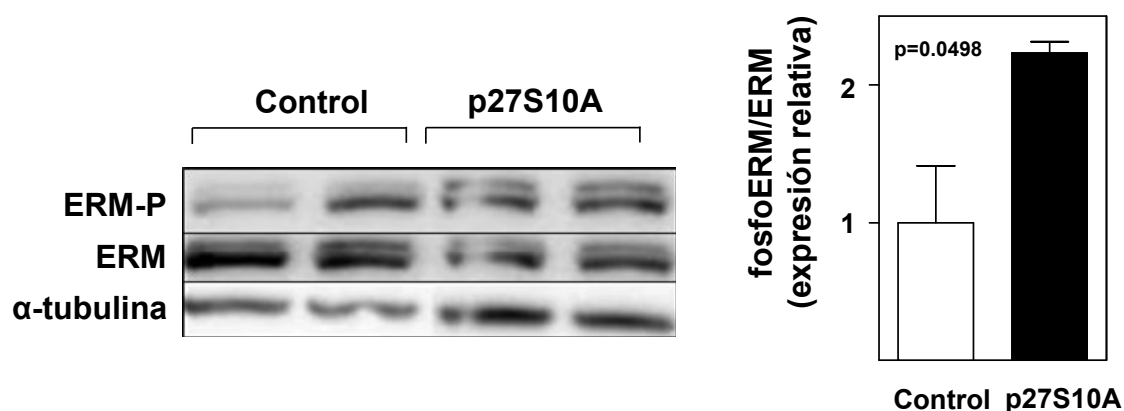


**Figura 19.** La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 no modifica las poblaciones leucocitarias en sangre ni la expresión de moléculas de adhesión en dichas poblaciones en ratones apoE<sup>-/-</sup>. (A) Cuantificación de la cantidad de leucocitos totales y proporción de linfocitos, neutrófilos y monocitos en sangres de ratones apoE<sup>-/-</sup> (n=9) y apoE<sup>-/-</sup>p27S10A (n=7). (B) Niveles de expresión (representado como valor arbitrario de fluorescencia) de las integrinas Sel-L, PSGL1, CD11b y CD49d en leucocitos totales y en las principales subpoblaciones leucocitarias en sangres de ratones apoE<sup>-/-</sup> (n=6) y apoE<sup>-/-</sup>p27S10A (n=5). (LEU=leucocitos totales; MON=monocitos; NEU=neutrófilos y LIN=linfocitos).

dichas células. Estos resultados, sumado a los datos previos, sugieren que al menos en lo que respecta a las poblaciones leucocitarias y el grado de expresión de integrinas en estas poblaciones durante las primeras etapas de la aterogénesis, el papel de esta modificación postraducciona está restringido al contexto endotelial.

### 1.6 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 incrementa la actividad de la vía de señalización RhoA/ROCK en células endoteliales de aorta de ratón

La vía de señalización RhoA/ROCK regula multitud de procesos celulares, como la migración (Joshi, 2008; Worthylake, 2003), la proliferación (Yasui, 1998), y la contractilidad (Peters, 2007). A nivel endotelial, RhoA/ROCK modula la expresión de la molécula de adhesión VCAM-1 (Seye, 2004). Habiendo demostrado que la ausencia de fosforilación de p27 promueve la expresión de VCAM-1 a nivel



**Figura 20.** La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 activa la ruta RhoA/ROCK en células endoteliales de aorta de ratón. Análisis por *Western-Blot* y cuantificación de los niveles de expresión de las proteínas Ezrina-Radoxina-Moesina (ERM) y sus formas fosforiladas (Fosfo-ERM) en células endoteliales de ratones silvestres y p27S10A. Los resultados se mostraron como el cociente entre los niveles de las formas fosforilada y los niveles totales de ERM y se relativizó a la condición control. Se detectó  $\alpha$ -tubulina como control de carga de las muestras.

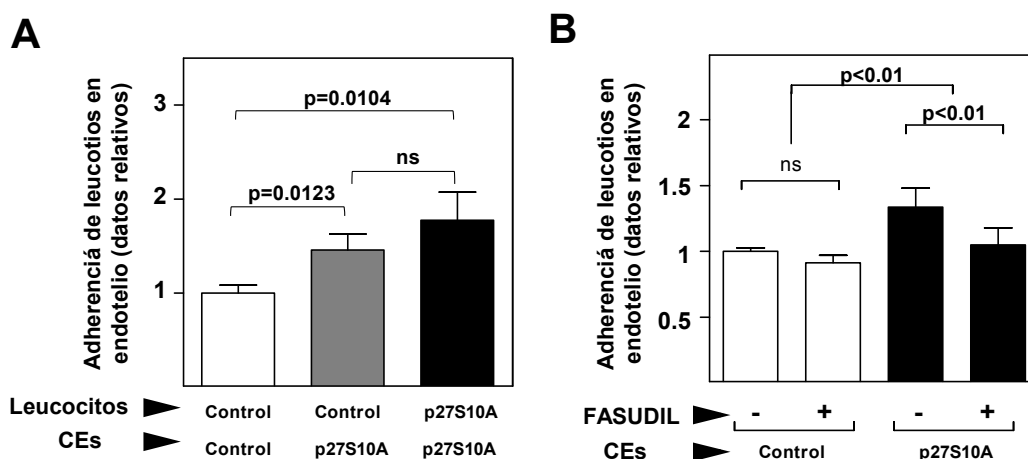
endotelial, decidimos determinar si cambios en el grado de fosforilación de p27-S10 podrían participar en la regulación de la señalización por la vía RhoA/ROCK en el endotelio. Para comprobar esta hipótesis cuantificamos, en células endoteliales, los niveles proteicos de los miembros de la familia ERM (Erzina/Radoxina/Moesina) y de sus formas fosforiladas, las cuales son un indicador indirecto de la actividad RhoA/ROCK. Observamos que las células endoteliales procedentes de ratones p27S10A presentaban un mayor estado fosforilado de las proteínas ERM (**figura 20**), lo que muestra una mayor activación de la vía RhoA/ROCK en estas células e identifica a esta vía de señalización como posible responsable de la activación endotelial observada en estados defosforilados de p27-S10.

### **1.7 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 en el endotelio promueve la adhesión leucocitaria como consecuencia de un aumento de la actividad de la vía RhoA/ROCK y de la sobreexpresión de VCAM-1**

Los resultados anteriores sugieren que la falta de fosforilación de p27 aumenta la expresión de VCAM-1 en células endoteliales debido a la activación de la vía de señalización RhoA/ROCK. Por ello, quisimos comprobar si esta regulación afectaba a la funcionalidad del endotelio y, centrándonos en el contexto

aterosclerótico, a la adhesión leucocitaria vascular. Para responder a esta cuestión, se realizaron experimentos *in vitro* en los que se evaluó la unión leucocito-endotelio incubando leucocitos y células endoteliales procedentes de ratones silvestres o carentes de la fosforilación de p27-S10. Estos ensayos demostraron que la adhesión leucocitaria era mayor cuando las células endoteliales carecían de la fosforilación de p27 (**figura 21-A**). De hecho, cuando se incubaron leucocitos p27S10A con endotelios mutantes, la adhesión leucocitaria fue similar a la observada empleando leucocitos control (**figura 21-A**), lo que confirmó al endotelio como principal tipo celular responsable de este fenómeno.

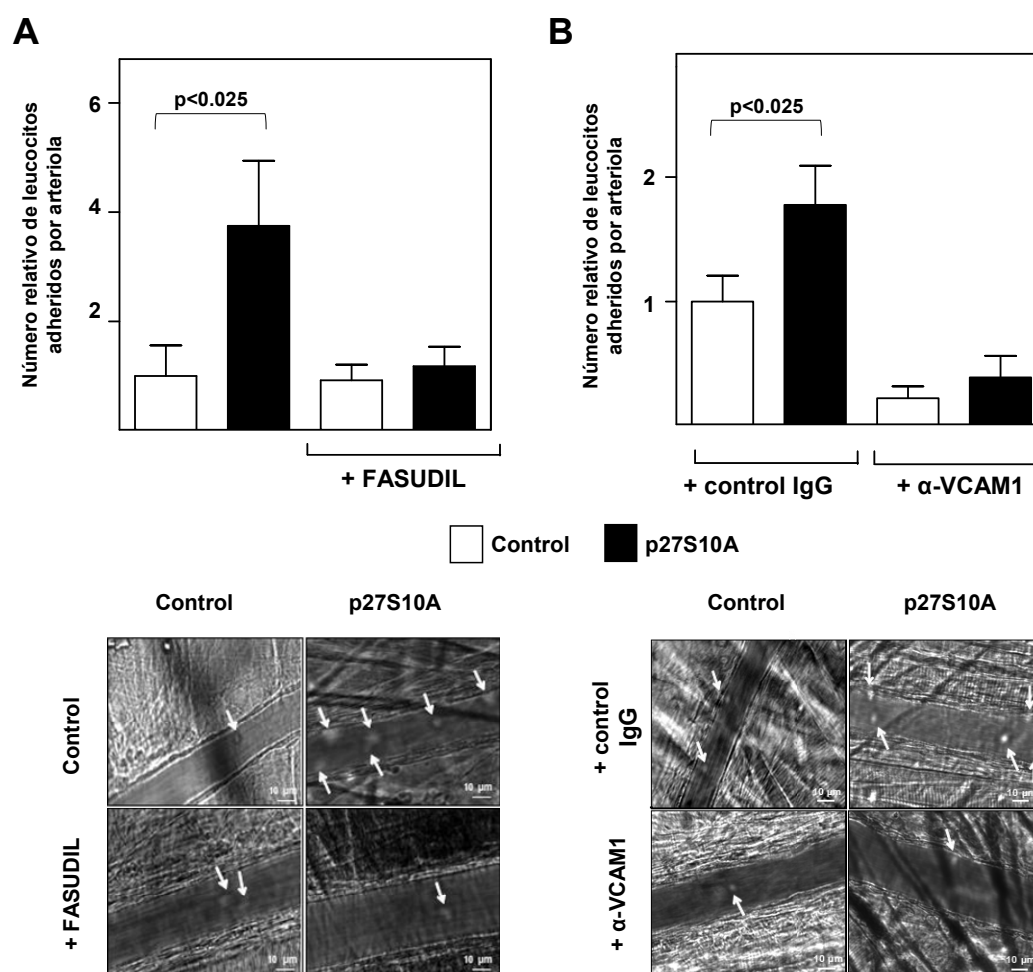
Además y como sugieren resultados anteriores, pudimos comprobar que la mayor adhesión leucocitaria observada en el endotelio p27S10A es consecuencia de un incremento de la actividad de la vía RhoA/ROCK, ya que al incubar las células endoteliales con fasudil, un inhibidor específico de esta ruta, se observó una cantidad similar de leucocitos adheridos a endotelio control y p27S10A (**figura 21-B**).



**Figura 21. La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 en el endotelio promueve la adhesión leucocitaria *in vitro* como consecuencia de un aumento de la actividad de la vía RhoA/ROCK. (A)** Representación de la cantidad relativa de leucocitos adheridos a un cultivo endotelial (CEs). Se comparan las siguientes condiciones: leucocitos control-endotelio control, leucocitos control- endotelio p27S10A y leucocitos p27S10A – endotelio p27S10A. Los resultados se expresan relativizados a la condición control (leucocitos control – endotelio control). **(B)** Representación de la cantidad de leucocitos adheridos a un cultivo endotelial (CEs control o p27S10A) en condiciones basales y tras tratamiento con fasudil. Los resultados se expresan relativizados a la condición control (CEs control sin tratamiento con fasudil). (A y B) Se muestra un promedio de tres experimentos independientes.

Este hallazgo fue confirmado *in vivo*, con estudios de adhesión leucocitaria en arteriolas cremastéricas mediante microscopía infravital, en los que pudimos ver como la ausencia de fosforilación en p27-S10 incrementó la adhesión leucocitaria en arteriolas, y como ese incremento se revertía con el tratamiento de los animales con fasudil (**figura 22-A**).

Por último, se determinó si la mayor adhesión leucocitaria asociada a la ausencia



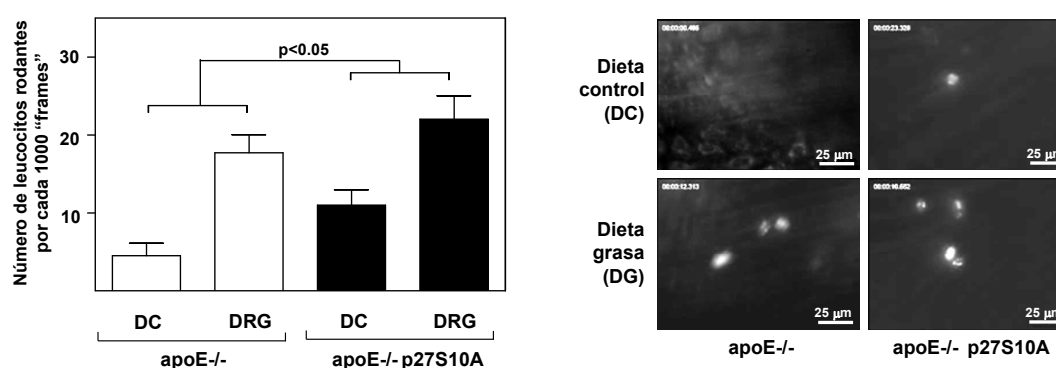
**Figura 22.** La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 promueve la adhesión leucocitaria *in vivo* como consecuencia de un aumento de la actividad de la vía RhoA/ROCK y de la sobrexpresión de VCAM-1. (A) Cuantificación relativa (arriba) e imágenes representativas (abajo) de la adhesión leucocitaria en arteriolas cremastéricas de ratones silvestres y p27S10A en condiciones basales (n=11 arteriolas control y 10 arteriolas p27S10A de 4 animales por grupo) o tras ser tratados con fasudil (n=21 arteriolas de 7 animales por grupo). (B) Cuantificación relativa (arriba) e imágenes representativas (abajo) de la adhesión leucocitaria en arteriolas cremastéricas de ratones silvestres y p27S10A tras ser tratados con un anticuerpo control (n= 9 arteriolas control de 3 animales por grupo) o con un anticuerpo específico frente a VCAM-1 (n= 12 arteriolas de 4 animales por grupo). (A y B) En las imágenes se señalan con flechas los leucocitos adheridos.

de fosforilación de p27 en la S10 era consecuencia del incremento que habíamos observado en la expresión endotelial de VCAM-1 (**figura 18**). Se trataron ratones silvestres y p27S10A con un anticuerpo específico frente a VCAM-1 y se estudió la adhesión leucocitaria en arteriolas cremastéricas. De nuevo pudimos comprobar como los ratones p27S10A presentaban un mayor número de leucocitos adheridos que los ratones silvestres, diferencia que desaparecía con el bloqueo de VCAM-1 (**figura 22-B**).

Estos resultados confirmaron que la ausencia de fosforilación de p27-S10 incrementa la adhesión leucocitaria al endotelio mediante un mecanismo dependiente de la activación de la vía de señalización RhoA/ROCK y la expresión de VCAM-1.

### 1.8 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 incrementa el rodamiento leucocitario en carótida de ratones apoE<sup>-/-</sup> durante la aterogénesis

Las arteriolas son vasos de pequeño calibre que no presentan aterosclerosis, motivo por el cual decidimos estudiar los procesos de interacción leucocito-endotelio en arterias de mayor tamaño susceptibles a desarrollar lesiones ateroscleróticas, como la arteria carótida. Sirviéndonos de un nuevo método de visualización *in vivo* basado en técnicas de microscopía intravital fluorescente

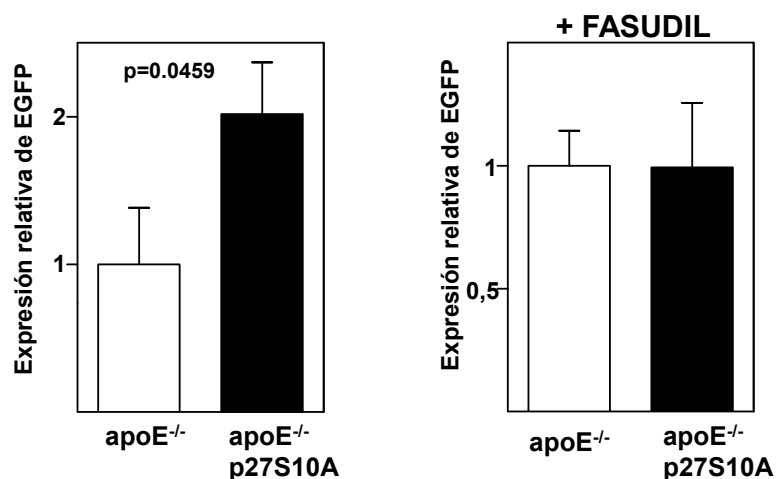


**Figura 23. La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 incrementa el rodamiento de leucocitos en la carótida de ratones apoE<sup>-/-</sup>.** Cuantificación (izquierda) e imágenes representativas (derecha) del rodamiento leucocitario en carótida de ratones apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A alimentados con dieta control (DC) o con dieta rica en grasa (DRG) durante 14 días (n=7- 21 campos de 5 ratones por grupo).

desarrollado en nuestro laboratorio (Chevre, 2014), se estudió el fenómeno de rodamiento leucocitario durante la aterogénesis en ratones apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A alimentados con dieta control o con dieta grasa. Como era de esperar, los animales alimentados con dieta grasa presentaron un mayor número de leucocitos en rodamiento que los alimentados con dieta control. No obstante se pudo comprobar que en ambas condiciones, los ratones deficientes de la fosforilación de p27-S10 mostraban mayores tasas de rodamiento leucocitario que sus controles apoE<sup>-/-</sup> (**figura 23**).

### 1.9 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 promueve el reclutamiento leucocitario en aortas de ratones apoE<sup>-/-</sup> como consecuencia de un mecanismo dependiente de RhoA/ROCK

En el proceso aterosclerótico, y después del rodamiento, los leucocitos se adhieren firmemente al endotelio y cambian su morfología en busca de zonas que permitan su extravasación y final reclutamiento en la capa íntima arterial (Binder, 2002; Hansson, 2005). Dado que la fosforilación de p27 en la S10 modula la interacción leucocito-endotelio, quisimos estudiar si esta modificación postraduccional también participa en el proceso posterior de extravasación

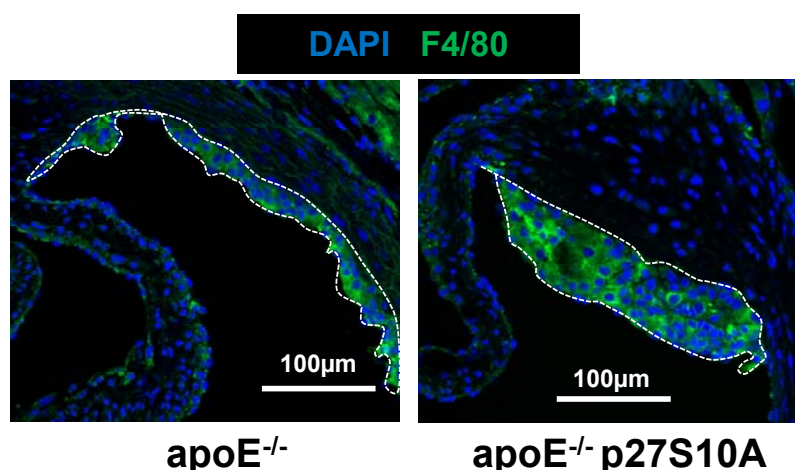


**Figura 24.** La ausencia de la fosforilación de p27-S10 promueve el reclutamiento leucocitario en aortas de ratones apoE<sup>-/-</sup> durante la aterogénesis debido a la activación de RhoA/ROCK. Expresión relativa de EGFP en aortas de ratones apoE<sup>-/-</sup> (n=4) y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A (n=6) o tratados con fasudil tras administración intravenosa de leucocitos procedentes de médula ósea de ratones Mafia. Los animales fueron alimentados con dieta grasa durante 2 semanas.



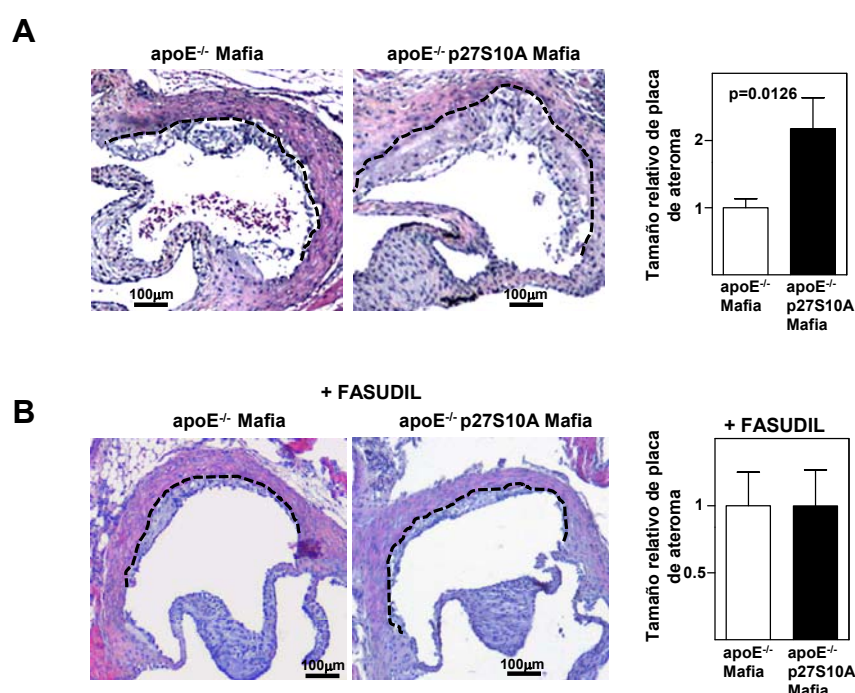
leucocitaria. Para responder a esta cuestión se llevaron a cabo experimentos de transferencia celular adoptiva empleando leucocitos procedentes de ratones Mafia, los cuales expresan EGFP en las células de origen mieloide (monocitos y neutrófilos principalmente) (Burnett, 2004). Se inyectaron leucocitos Mafia procedentes de médula ósea durante dos días consecutivos en ratones apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A de 3 meses de edad alimentados durante 2 semanas con dieta grasa. A continuación se analizó por qPCR la presencia de ARNm de EGFP en la aorta de estos animales como medida del grado de extravasación leucocitaria, observándose que la ausencia de fosforilación de p27 en la S10 facilita el reclutamiento leucocitario en aorta de ratón durante la aterogénesis (**figura 24**). Estas diferencias en la extravasación leucocitaria entre ratones apoE<sup>-/-</sup> y p27S10A desaparecieron en animales previamente tratados con fasudil (**figura 24**). Estos resultados confirman que la ausencia de fosforilación de p27 en la S10, mediante activación de la vía de señalización RhoA/ROCK, aumenta el reclutamiento leucocitario que ocurre en las etapas tempranas del desarrollo de la aterosclerosis.

### 1.10 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 promueve la formación de aterosclerosis temprana como consecuencia de un incremento de la actividad de la vía RhoA/ROCK

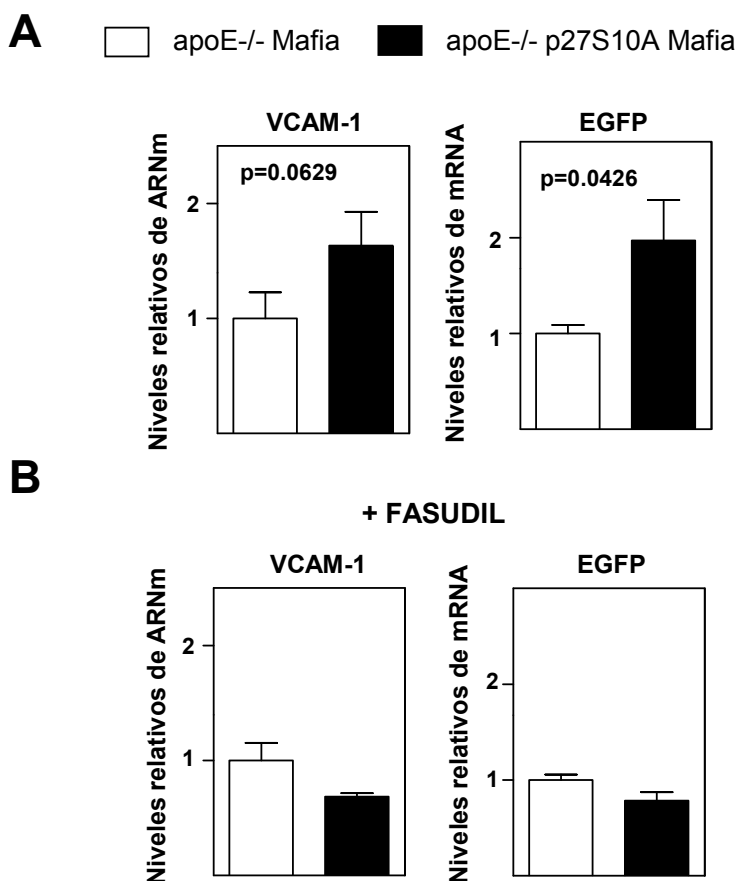


**Figura 25. Lesiones ateroscleróticas en seno aórtico de ratones apoE<sup>-/-</sup> tras cuatro semanas de dieta grasa.** Imágenes representativas de macrófagos positivos para F4/80 (verde) en secciones de seno aórtico de ratones apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A alimentados con dieta grasa durante 4 semanas. Los núcleos celulares fueron marcados con DAPI (azul).

Los estudios presentados hasta ahora se llevaron a cabo en ratones alimentados con dieta control o con dieta grasa durante periodos cortos para evitar la formación de lesiones ateroscleróticas de tamaño considerable. Para evaluar si el aumento de adhesión y extravasación leucocitaria asociado al estado defosforilado de p27-S10 tenía relevancia en la formación aterosclerótica temprana, se alimentaron ratones apoE<sup>-/-</sup> Mafia y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A Mafia con dieta grasa durante 4 semanas. En estas condiciones, ambos grupos de ratones presentaron pequeñas lesiones conocidas como “*fatty streaks*” que estaban compuestas principalmente por macrófagos, como se pudo observar mediante inmunodetección del antígeno F4/80 (**figura 25**). El análisis histológico en seno aórtico de ambos grupos experimentales mostró lesiones de mayor tamaño en ratones apoE<sup>-/-</sup> p27S10A Mafia en comparación con sus controles (**figura 26-A**). Además, de acuerdo con nuestros resultados previos, el tamaño de las lesiones ateroscleróticas fue similar en ratones de ambos genotipos tratados con fasudil para bloquear la actividad RhoA/ROCK (**figura 26-B**).



**Figura 26.** La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta la formación de aterosclerosis temprana debido a un incremento de la actividad de la vía RhoA/ROCK. (A) Imágenes representativas y cuantificación de la formación de placa aterosclerótica en el seno aórtico de ratones apoE<sup>-/-</sup> Mafia (n=9) y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A Mafia (n=9) tras 4 semanas de dieta grasa. (B) Imágenes representativas y cuantificación de la formación de placa aterosclerótica en el seno aórtico de ratones apoE<sup>-/-</sup> Mafia (n=10) y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A Mafia (n=11) tras 4 semanas de dieta grasa y tratamiento con fasudil.



**Figura 27.** La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta la expresión de VCAM-1 y la extravasación leucocitaria en aortas de ratones apoE<sup>-/-</sup> tras 4 semanas de dieta grasa. (A) Niveles relativos de expresión génica de VCAM-1 y EGFP en aortas de ratones apoE<sup>-/-</sup> Mafia y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A Mafia tras 4 semanas de dieta grasa (n=4-5 aortas por condición) (B) Niveles relativos de expresión génica de VCAM-1 y EGFP en aortas de ratones apoE<sup>-/-</sup> Mafia y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A Mafia tras 4 semanas de dieta grasa tratados con fasudil (n=4-5 aortas por condición).

Finalmente se estudiaron los niveles de expresión génica de VCAM-1 y EGFP (indicativo del reclutamiento de monocitos y neutrófilos) en las aortas de estos animales. Como era de esperar, se observó una mayor expresión de VCAM-1 y EGFP en ratones apoE<sup>-/-</sup> p27S10A Mafia en comparación con sus controles apoE<sup>-/-</sup> Mafia (**figura 27-A**), diferencias que desaparecieron cuando se bloqueó la actividad RhoA/ROCK mediante tratamiento con fasudil (**figura 27-B**).

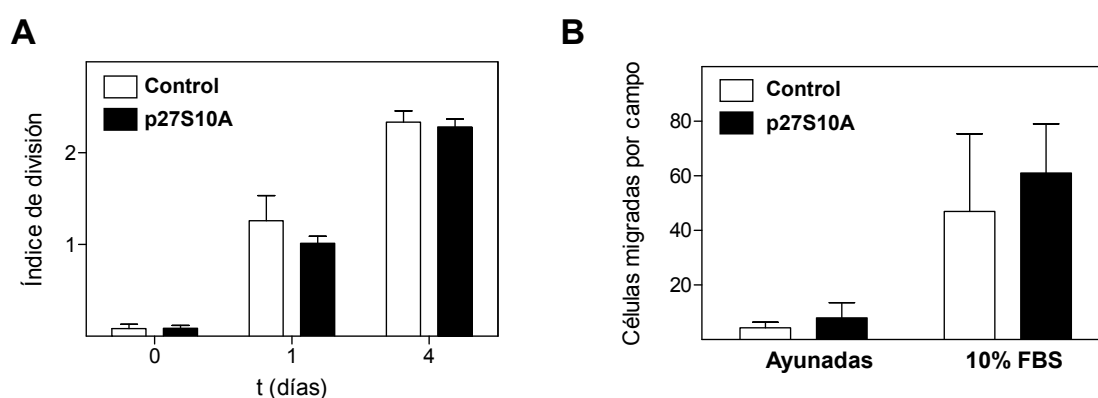
En su conjunto estos datos sugieren que la ausencia de fosforilación de p27 en la S10 promueve una mayor actividad de la vía RhoA/ROCK y la sobreexpresión de VCAM-1 en aorta, lo que acelera el desarrollo aterogénico en las primeras fases de la enfermedad.

### 1.11 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 no modifica la proliferación ni la migración en células endoteliales en cultivo, pero reduce los niveles citosólicos de p27

La proliferación celular y, en menor grado, la migración celular, son las principales funciones clásicamente asociadas a p27. Siendo ambos procesos fundamentales en el desarrollo aterosclerótico, nos propusimos determinar si la fosforilación de p27 en la S10 los regula en células endoteliales.

Para el estudio del papel de la fosforilación en S10 de p27 en la proliferación celular se llevaron a cabo experimentos basados en la dilución del marcador celular *Cell-Trace-Violet* como consecuencia del reparto del citoplasma entre las células hijas tras la división celular. El estudio mediante citometría de flujo mostró tasas similares de división al comparar células endoteliales silvestres y p27S10A, tanto en condiciones de ayuno como tras estimulación mitogénica (adicionando FBS) durante 1 y 4 días (**figura 28-A**).

Por otra parte, la migración de estas células se evaluó en pocillos porosos en condiciones de ayuno y tras un estímulo migratorio (FBS) de 24 horas,

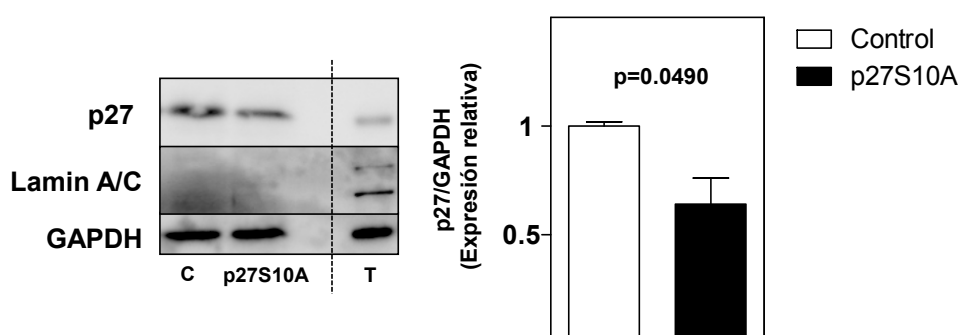


**Figura 28. La ausencia de fosforilación en p27-S10 no modifica ni la proliferación ni la capacidad migratoria de células endoteliales in vitro.** (A) Representación del índice de división de células endoteliales procedentes de ratones silvestres y p27S10A en ausencia de un estímulo mitogénico (privadas de FBS) y tras estimulación con FBS durante 1 y 4 días. El resultado muestra el promedio de dos experimentos independientes. (B) Representación del número de células migradas en un ensayo de migración en pocillo poroso de células endoteliales procedentes de ratones silvestres y p27S10A en condiciones de ayuno (privadas de FBS) o tras un estímulo migratorio (10% de FBS durante 24 h).

comprobandose en ambas condiciones que la ausencia de fosforilación no modifica la capacidad migratoria de las células endoteliales (**figura 28-B**).

Estos experimentos revelaron tasas similares de proliferación y de migración en células endoteliales procedentes de animales de ambos genotipos, por lo que pudimos descartar estos mecanismos como responsables de la aterosclerosis acelerada observada en ratones p27S10A.

Se sabe que p27 puede interactuar con RhoA (Besson, 2004), y que la fosforilación de 27 en la S10 modula la localización subcelular de la proteína (Rodier, 2001). Por lo tanto, estos mecanismos podrían afectar la cantidad y localización subcelular de p27 en las células endoteliales y facilitar la exacerbada actividad RhoA/ROCK presente en células endoteliales p27S10A. Para comprobar esta posibilidad se analizaron por *Western-Blot* extractos proteicos de citoplasma de células endoteliales procedentes de ratones control y p27S10A. Estos estudios mostraron que la ausencia de la fosforilación de p27-S10 reduce de manera significativa los niveles totales de la proteína en este compartimento (**figura 29**). Este resultado sugiere que la menor presencia de p27 en el citoplasma reduce la capacidad de p27 para interactuar con RhoA, lo que supone un importante indicio para desentramar el mecanismo responsable del

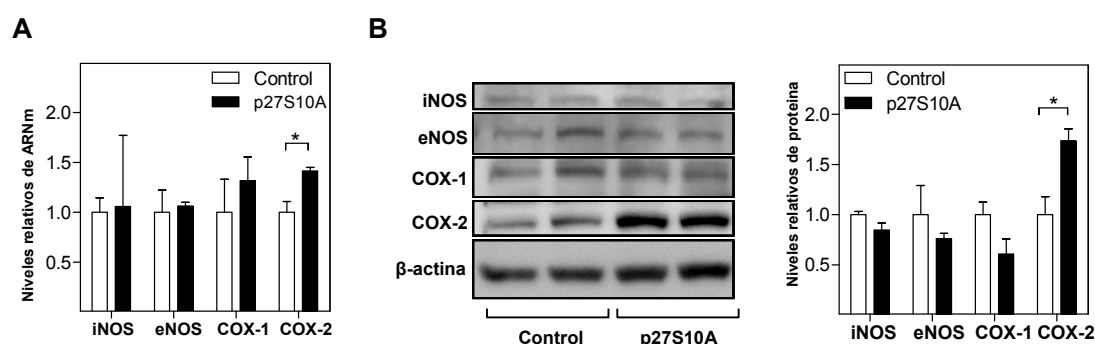


**Figura 29.** La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 se asocia con una reducción de los niveles citoplasmáticos de p27. Izquierda. *Western-Blot* de extractos citoplasmáticos de células endoteliales procedentes de aortas de ratones silvestres (C) o carentes de la fosforilación de p27 en la S10 (p27S10A). Derecha. Gráfica mostrando la cuantificación de los niveles de p27. Se detectó la expresión de Lamina A/C (proteína nuclear) y GAPDH (proteína citoplasmática) para verificar la calidad de los extractos citoplasmáticos. Todas las proteínas se detectaron en un extracto total (T). La gráfica muestra el promedio relativizado de la cuantificación de dos *Blots* independientes realizados con muestras procedentes de dos cultivos distintos de células endoteliales por cada condición.

fenotipo observado en ausencia de la fosforilación de p27 en la S10.

## 2. Papel de la fosforilación de p27 en el control de la reactividad vascular dependiente de endotelio

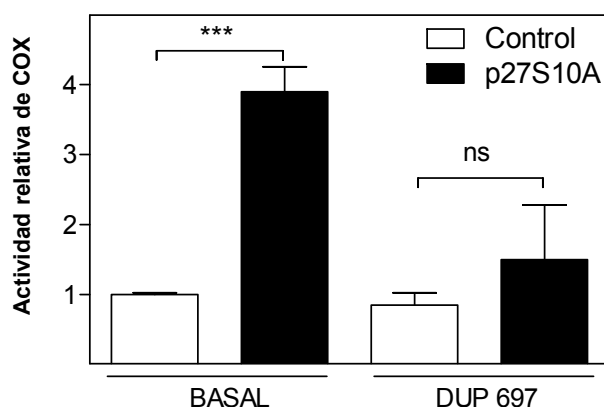
### 2.1 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta la expresión y la actividad de la enzima COX-2 en células endoteliales de aorta de ratón



**Figura 30. La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta la expresión de la enzima COX-2 en células endoteliales de aorta de ratón.** (A) Niveles de expresión del ARNm de eNOS, iNOS, COX-1 y COX-2 en células endoteliales de aorta de ratón p27S10A y silvestres. Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes. (B) *Western-blot* representativo y cuantificación de los niveles de expresión de las enzimas eNOS, iNOS, COX-1 y COX-2 en células endoteliales de aorta de ratones p27S10A y silvestres. Se muestra el promedio de 2 experimentos independientes. (A y B). La cuantificación está relativizada para cada gen y proteína por su control.

De la investigación sobre las implicaciones de la fosforilación de p27-S10 en el desarrollo de aterosclerosis temprana se puede concluir que esta modificación postraduccional regula decisivamente la función endotelial. Dado que el endotelio está implicado en el control del tono y la capacidad reactiva vascular, nos dispusimos a investigar si esta fosforilación también modula estos procesos.

Como primer abordaje, se analizó por qPCR la expresión génica de algunas de las enzimas implicadas en la producción de las principales moléculas que regulan la reactividad vascular, como son las enzimas eNOS e iNOS (responsables de la producción de óxido nítrico), o COX-1 y COX-2 (productoras de moléculas vasorreactivas, como prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos).



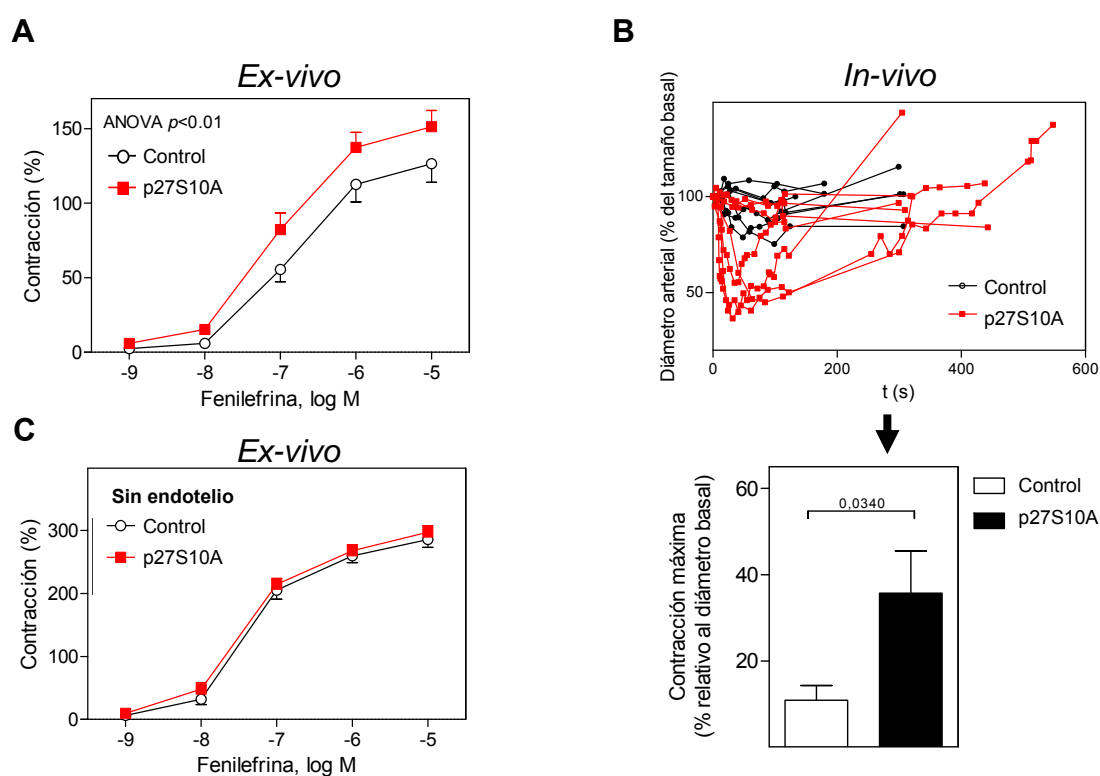
**Figura 31.** La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta la actividad de la enzima COX-2 en células endoteliales de aorta de ratón. Cuantificación de la actividad relativa de COX en células endoteliales control (n=5) y p27S10A (n=4) en estado basal y bajo el efecto del inhibidor DUP 697.

Mientras que no observamos diferencias en la expresión de eNOS, iNOS y COX-1 al comparar células endoteliales silvestres y p27S10A, la ausencia de fosforilación de p27-S10 aumentó los niveles de expresión de COX-2 en este tipo celular (**figura 30-A**). Estos resultados fueron confirmados a nivel proteico mediante *Western-Blot* (**figura 30-B**). A continuación se comprobó si, como consecuencia de la sobreexpresión de COX-2, las células endoteliales p27S10A poseían una mayor actividad ciclooxygenasa. Mediante el empleo de un *kit* comercial se determinó la actividad peroxidada dependiente de COX en células endoteliales silvestres y carentes de la fosforilación de p27-S10, confirmando que la expresión de p27S10A incrementa notablemente esta actividad (**figura 31**). Por último se corroboró que la ausencia de fosforilación de p27-S10 aumenta la función ciclooxygenasa endotelial como consecuencia de la sobreexpresión de COX-2, ya que cuando se realizó este mismo ensayo bloqueando específicamente esta isoforma con el inhibidor DUP 697, se obtuvieron valores similares de actividad COX en células endoteliales silvestres y p27S10A (**figura 31**).

## 2.2 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta la contractilidad vascular dependiente de endotelio en respuesta a fenilefrina mediante la acción de COX-2

COX-2 es un importante modulador de los procesos de contractilidad y regulación del tono vascular ya que es responsable de la producción de prostanoïdes (Camacho, 1998; Versari, 2009). Por este motivo quisimos evaluar si el aumento de COX-2 en endotelio provocado por la ausencia de fosforilación de p27-S10 podía modificar la capacidad contráctil arterial.

Para responder a esta cuestión se llevaron a cabo experimentos de miografía de alambre, técnica que permite evaluar *ex vivo* la contractilidad vascular en respuesta a diferentes estímulos. En primer lugar comprobamos que no existen diferencias significativas en los valores de contracción máxima a KCl al comparar anillos de aorta de ratones silvestres y p27S10A (datos no mostrados). A continuación analizamos la capacidad contráctil de los anillos aórticos en respuesta a dosis crecientes de fenilefrina (agonista  $\alpha$ 1-adrenérgico con

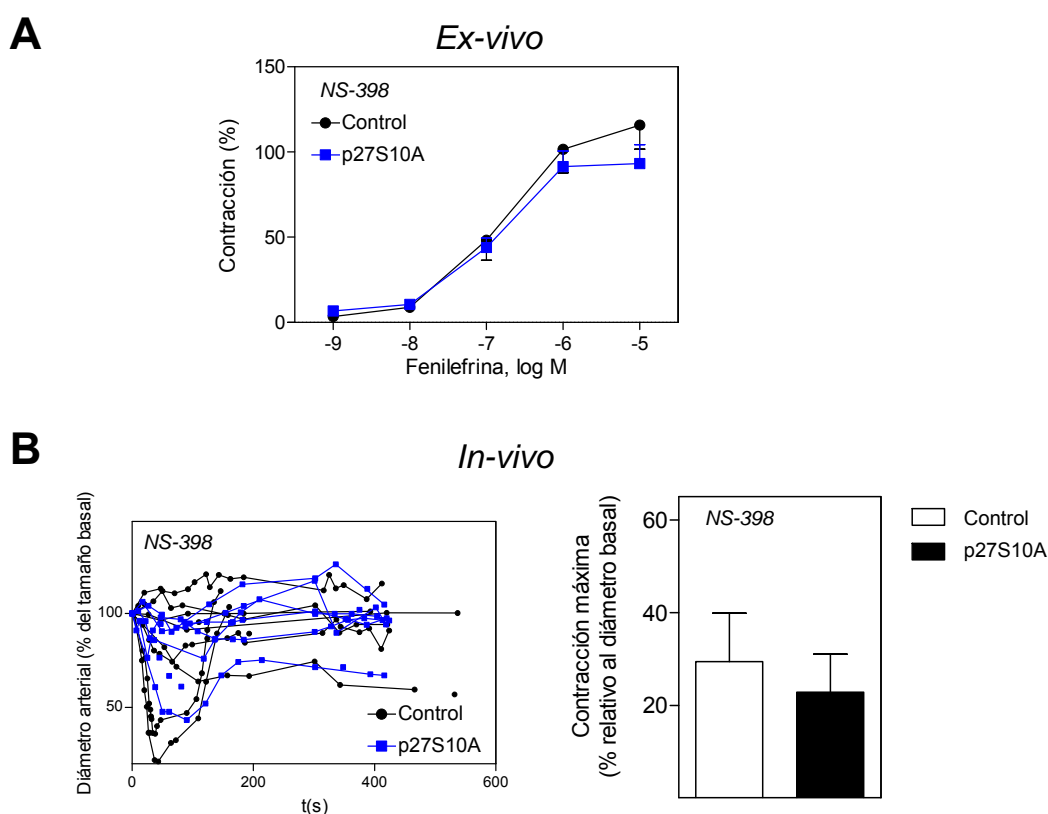


**Figura 32. La ausencia de fosforilación en p27-S10 aumenta la contractilidad vascular dependiente de endotelio en respuesta a fenilefrina.** (A) Curva de contracción, a dosis crecientes de fenilefrina, de aortas de ratones p27S10A (n=7) y ratones silvestres (n=5). (B) Arriba. Curvas de diámetro arterial con respecto a tiempo de arteriolas de cremaster de ratones p27S10A (n=7) y ratones silvestres (n=7) en respuesta a una dosis de 50  $\mu$ l de fenilefrina a 1 mM. Abajo. Representación de la contracción máxima alcanzada por dichas arteriolas. (C) Curva de contracción a dosis crecientes de fenilefrina de aortas de ratones p27S10A (n=6) y ratones silvestres (n=8) previamente denudadas de endotelio.



importante acción contráctil), determinando el porcentaje de contracción respecto a la contracción máxima inducida por KCl. Los datos obtenidos mostraron que las arterias procedentes de ratones p27S10A alcanzaban un mayor grado de contracción que sus controles silvestres en respuesta a distintas concentraciones de fenilefrina (**figura 32-A**).

Este hallazgo pudo ser confirmado *in-vivo* mediante microscopía intravital de arteriolas en músculo cremaster. Se administró una dosis de 40  $\mu$ l de fenilefrina ( $10^{-3}$  M) a ratones silvestres y p27S10A y se registró la respuesta contráctil en las arteriolas de dichos animales durante un máximo de 10 minutos. En este tiempo se pudo comprobar que las arteriolas de los ratones que expresaban la versión no fosforilable de p27 en S10 alcanzaban diámetros menores que las arteriolas de los ratones silvestres, acompañado a su vez de un mayor tiempo de

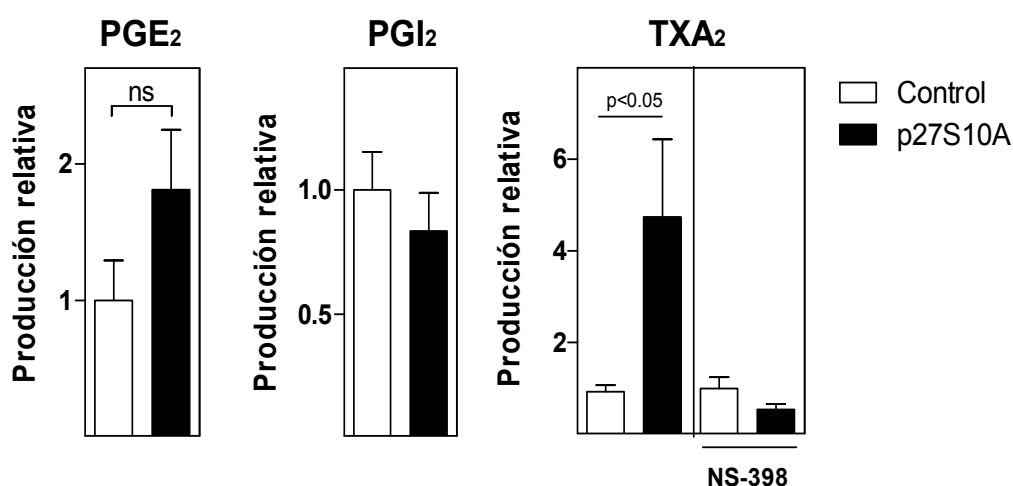


**Figura 33. La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta la contractilidad vascular en respuesta a fenilefrina por un mecanismo dependiente de COX-2.** (A) Curva de contracción, a dosis crecientes de fenilefrina, de aortas de ratones p27S10A (n=6) y ratones silvestres (n=6) en presencia de 1  $\mu$ M de NS-398, inhibidor específico de COX-2. (B) Izquierda. Curvas de diámetro arterial con respecto a tiempo de arteriolas de cremaster de ratones p27S10A (n=6) y ratones silvestres (n=8) tratados con NS-398 en respuesta a una dosis de 50  $\mu$ l de fenilefrina 1mM. Derecha. Representación de la contracción máxima alcanzada por dichas arteriolas.

recuperación, lo que indicó una mayor respuesta al estímulo vasoconstrictor (**figura 32-B**).

Además pudimos demostrar que la mayor sensibilidad contráctil observada en ratones p27S10A era debida específicamente al efecto de la fosforilación de p27-S10 en células endoteliales, ya que la eliminación mecánica del endotelio reducía la mayor capacidad contráctil de las aortas obtenidas de ratones p27S10A equiparándolas a los valores de las aortas de ratones control (**figura 32-C**).

Para comprobar si el aumento de COX-2 en endotelio p27S10A es la causa de la mayor respuesta contráctil que observamos en aorta de ratones p27S10A, se estudió la contractilidad vascular en respuesta a fenilefrina bajo el efecto del inhibidor específico de COX-2 NS-398 en aortas *ex vivo* y en arteriolas *in vivo* por técnicas de miografía y microscopía intravital, respectivamente. Los datos obtenidos mostraron respuestas contráctiles similares en ratones control y p27S10A por ambas aproximaciones experimentales cuando se bloqueó la función de COX-2 (**figura 33**), lo que confirmó que la actividad COX-2 es responsable de la hiperreactividad vascular observada cuando p27 no está fosforilado en S10.

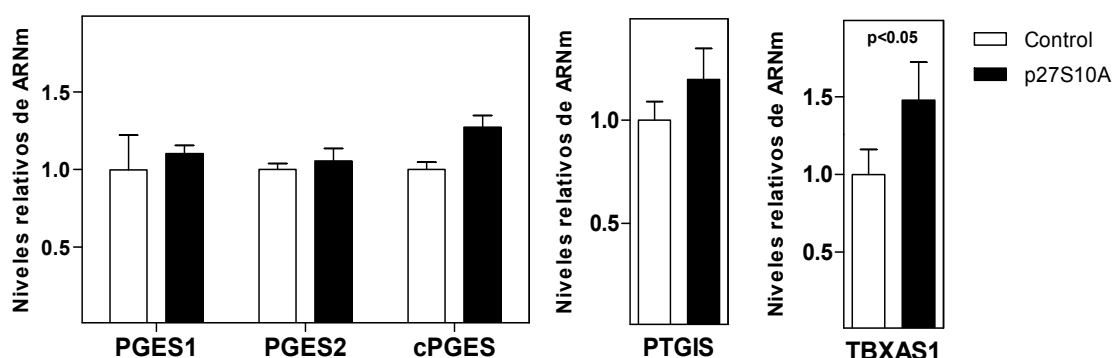


**Figura 34.** La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta la producción de tromboxano A<sub>2</sub> en aortas de ratón. Medida relativa de la liberación de los principales metabolitos vasoactivos derivados del ácido araquidónico, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> y TXA<sub>2</sub> en aortas de ratones silvestres y p27S10A (n=5-17 aortas por genotipo) en condiciones basales. En el caso de TXA<sub>2</sub> también se midió su liberación en aortas incubadas con 1 μM NS-398 para inhibir COX-2.

### 2.3 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta la producción de tromboxano 2 mediada por COX-2 en aorta de ratón

La proteína COX-2 es una enzima clave en la biosíntesis de moléculas vasoactivas derivadas del ácido araquidónico (Feletou, 2011), como la prostaglandina E<sub>2</sub> y la prostaciclina (PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>) y el tromboxano (TXA<sub>2</sub>) (figura 6). Por ello, cuantificamos la producción de PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> y TXA<sub>2</sub> en aortas de ratón con el objetivo de identificar el agente responsable de la hipersensibilidad contráctil observada en arterias p27S10A. Mediante la utilización de *kits* comerciales se cuantificó la liberación de estas moléculas en aortas murinas en estado basal. Mientras que no había diferencias en los niveles de liberación de PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub> entre aortas p27S10A y control, observamos que la liberación del vasoconstrictor TXA<sub>2</sub> fue considerablemente mayor en aortas procedentes de ratones p27S10A (figura 34). Este resultado se relacionó directamente con el incremento de la actividad de COX-2 en dichas aortas ya que la cantidad de TXA<sub>2</sub> liberado fue muy similar en aortas silvestres y p27S10A cuando previamente fueron tratadas con el inhibidor de COX-2 NS-398 (figura 34).

Finalmente se analizaron mediante qPCR los niveles de expresión del ARNm que codifica para las enzimas directamente responsables de la síntesis de PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> y TXA<sub>2</sub> en aortas murinas. Mientras que se observaron niveles de expresión similares de los genes PGES1, PGES2 y cPGES (responsables de la producción



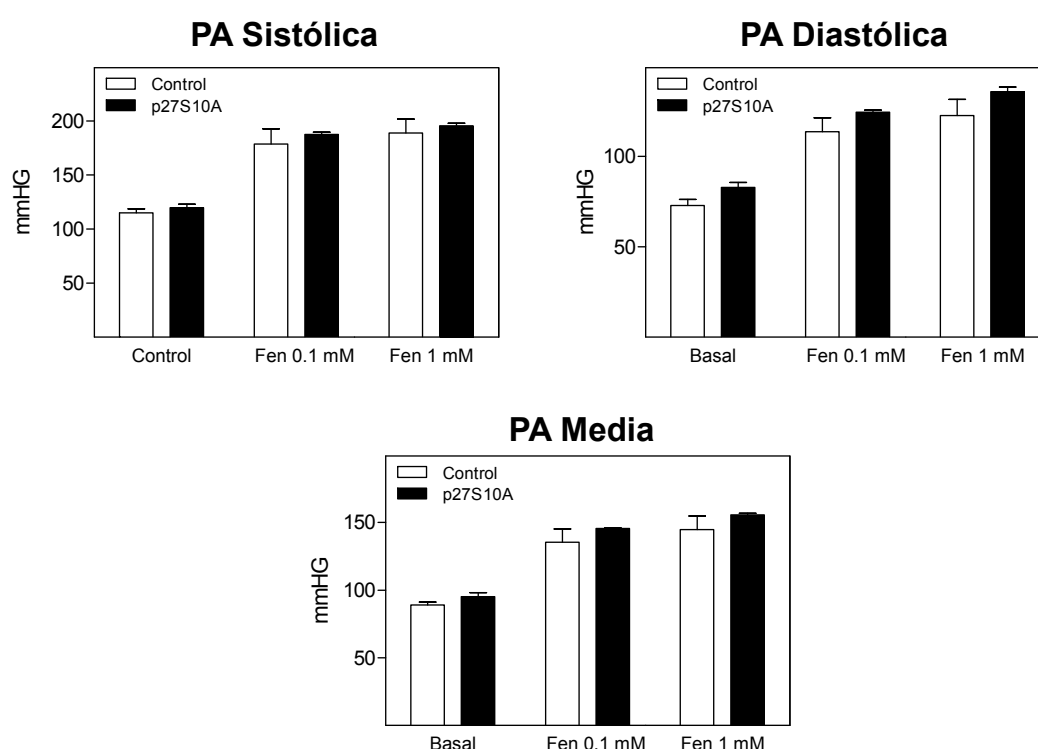
**Figura 35.** La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta la expresión de TBXAS1 en aorta de ratón. Expresión génica relativa de las principales enzimas encargadas de la síntesis de PGE<sub>2</sub> (PGES1, PGES2 y cPGES), PGI<sub>2</sub> (PTGIS) y TXA<sub>2</sub> (TBXAS1) en aortas de ratones silvestres (n=5) o p27S10A (n=4).

de PGE<sub>2</sub>) y de PTGIS (enzima sintetizadora de PGI<sub>2</sub>), los niveles de ARNm de TBXAS1 (productor de TXA<sub>2</sub>) fueron más elevados en aortas p27S10A que en sus controles silvestres (**figura 35**).

En conjunto estos datos demuestran que una deficiente fosforilación de p27 en la S10 promueve la síntesis del vasoconstrictor TXA<sub>2</sub> a través del aumento de la actividad COX-2 y de la sobreexpresión de TBXAS1, lo que explicaría el aumento de la reactividad vascular en las arterias de los ratones p27S10A.

#### 2.4 La ausencia de fosforilación p27 en la S10 no modifica los niveles de presión arterial en ratones

Teniendo en cuenta las implicaciones patológicas de una desregulación de los mecanismos responsables del control del tono vascular y dado que la expresión de p27S10A conduce a un incremento de la contractilidad vascular en respuesta

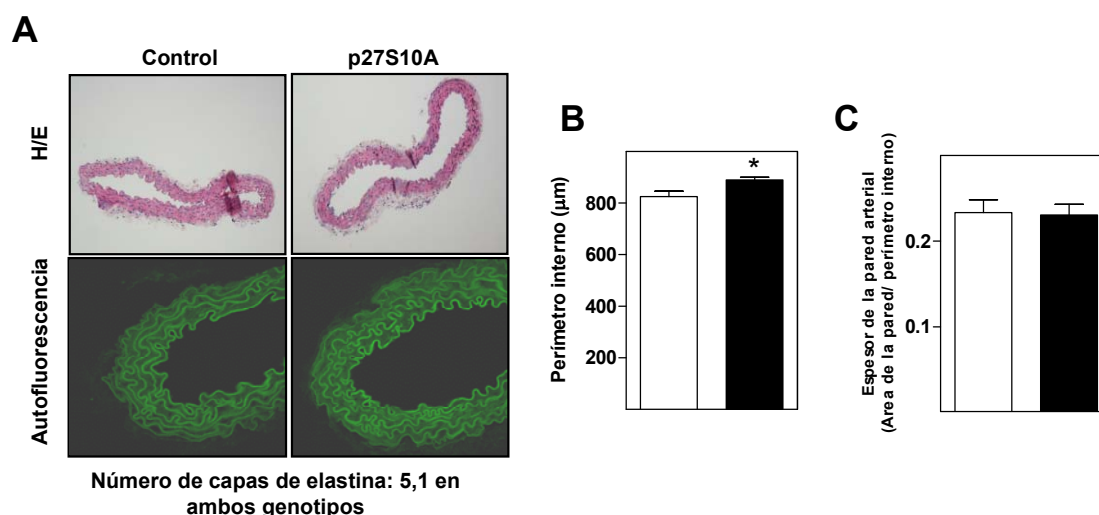


**Figura 36.** La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 no modifica la presión arterial basal, ni tras tratamiento con fenilefrina en ratones. Valores de presión arterial sistólica, diastólica y media de ratones silvestres (n=3) y p27S10A (n=3) en estado basal o tras una dosis de 50  $\mu$ l de fenilefrina a una concentración de 1mM y 0.1 mM.

a fenilefrina en ratón, se pensó en la posibilidad de que la ausencia de fosforilación de p27-S10 pudiera causar alteraciones de la presión arterial en estos animales. Mediante la utilización del sistema BP-2000 se determinó la presión arterial en ratones silvestres y p27S10A en condiciones basales (anestesiados) y tras una dosis intravenosa (IV) de 50  $\mu$ l del agente hipertensivo fenilefrina a una concentración de 0.1 mM y 1 mM. Como se esperaba la administración del agonista adrenérgico incrementó considerablemente la presión arterial en los animales pero, sorprendentemente, no se observaron diferencias significativas en la presión arterial al comparar los ratones silvestres y los p27S10A, lo que pone de manifiesto que, a pesar de que la ausencia de fosforilación de p27-S10 conduce a estados de hipersensibilidad frente a agentes vasoconstrictores, esto no se traduce en una mayor presión arterial.

## **2.5 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta el diámetro luminal en aortas murinas**

Por último quisimos investigar si las alteraciones observadas en el comportamiento vascular debidas a la ausencia de fosforilación de p27-S10 podían llevar asociada alguna modificación estructural de las arterias murinas. Para ello se hizo un estudio histológico de las aortas torácicas de los ratones p27S10A. El análisis mostró que los ratones p27S10A poseían el mismo número de fibras de elastina y el mismo espesor de la capa media que sus controles silvestres (**figura 37-A-C**). No obstante, gracias a las posibilidades de análisis que nos permite el miógrafo de alambre, pudimos comprobar que el tamaño de la luz (diámetro luminal) de las aortas procedentes de los animales que expresan la versión no fosforilable de p27 eran ligeramente superiores que los diámetros de las aortas de los ratones silvestres (**figura 37-B**). Este aumento de diámetro luminal no iba acompañado de cambios en el area de la sección de corte de la pared arterial, por lo que el remodelado vascular observado se podía calificar como eutrófico hacia el exterior, posiblemente debido a un mecanismo adaptativo en respuesta a la disfunción endotelial previamente observada.



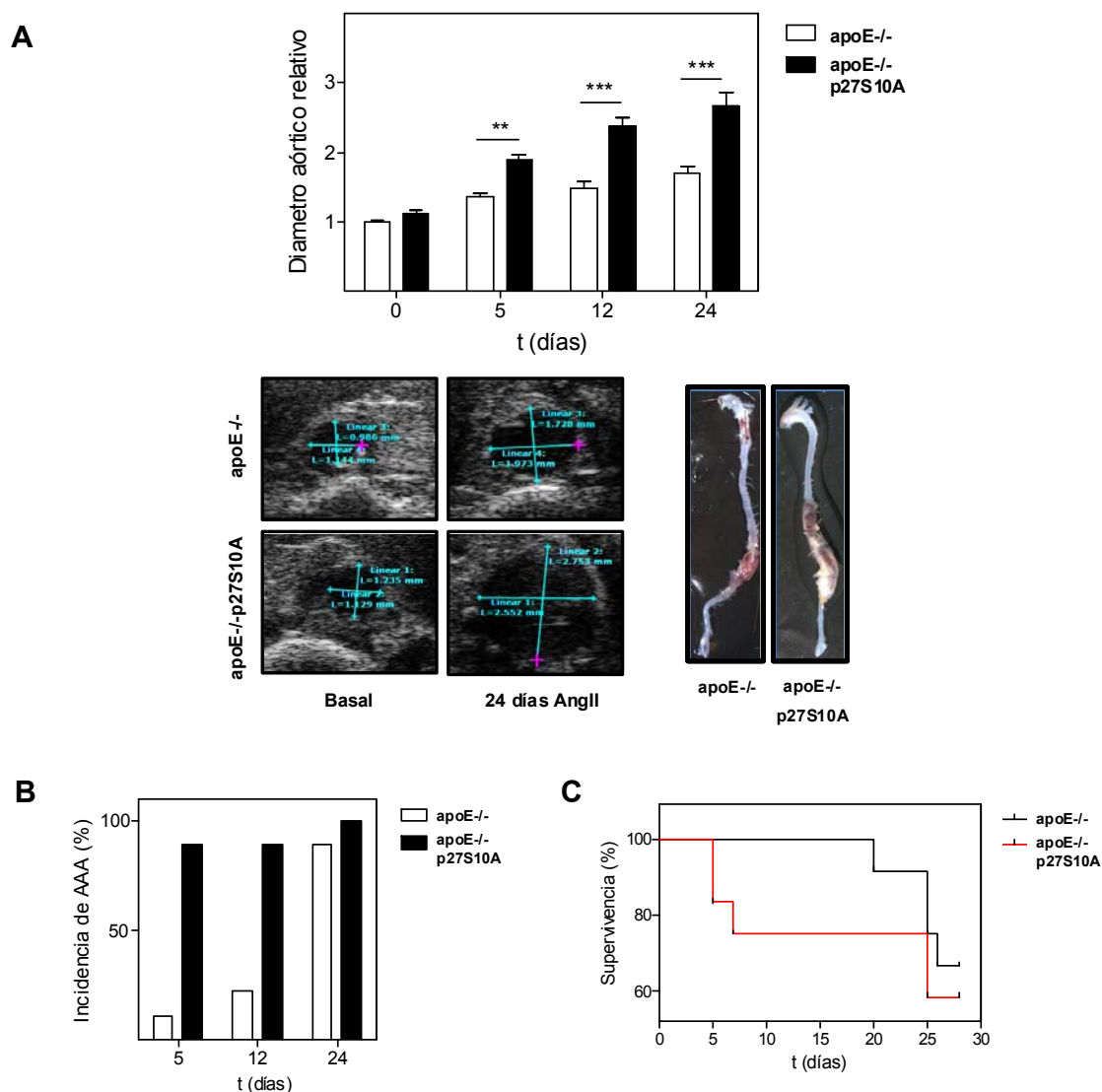
**Figura 37.** La ausencia de la fosforilación de p27 en la S10 aumenta el diámetro luminal en aortas murinas. (A) Imágenes representativas de secciones aórticas de ratones silvestres y p27S10A teñidas con hematoxilina/eosina (arriba) y observadas por microscopía confocal tras ser excitadas con un láser emisor a una longitud de onda de 488nm (abajo). (B) Medidas del perímetro interno y (C) del espesor de la pared arterial de aortas de ratones silvestres (n=16) y p27S10A (n=17).

### 3. Papel de la fosforilación de p27 en la S10 el desarrollo de AAA

#### 3.1 La ausencia de fosforilación de p27-S10 promueve la formación de AAA en un modelo de ratón basado en la infusión de AngII

Debido a las similitudes en el proceso de desarrollo de aterosclerosis y de la formación de aneurismas (detallados en la *Introducción*) y dado que la ausencia de fosforilación de p27 en la S10 tiene importantes implicaciones tanto en el comportamiento como en la estructura vascular, decidimos estudiar si esta modificación postraduccional también juega un papel relevante en el proceso de generación de AAA.

Para ello, se empleó el modelo de formación de AAA en ratones apoE<sup>-/-</sup> mediante infusión subcutánea del agente hipertensivo AngII. Se analizó por ecografía abdominal el grado de dilatación aórtica de ratones apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A tras infusión de AngII durante 5, 12 y 24 días. Los ratones deficientes de la fosforilación de p27 en la S10 mostraron mayor diámetro aórtico desde las primeras fases del modelo (día 5) y durante todo el desarrollo del mismo (día 12



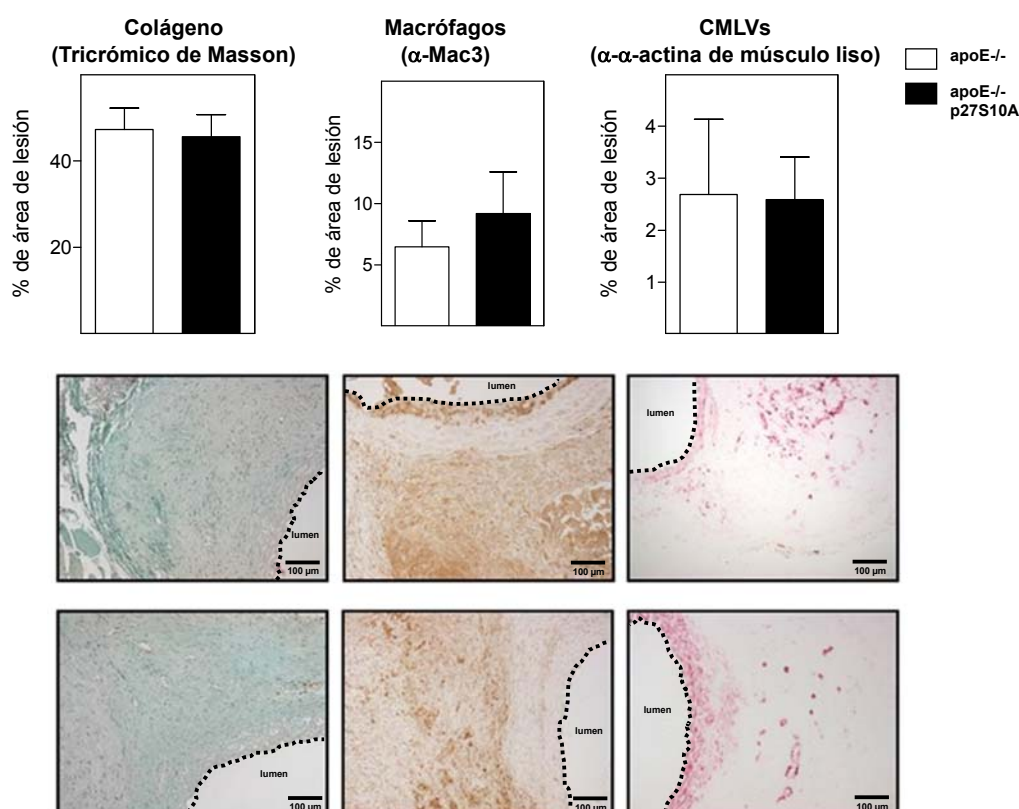
**Figura 38. La ausencia de fosforilación de p27-S10 promueve la formación de aneurismas aórticos abdominales en ratones tras tratamiento con AngII.** (A) Arriba. Representación del diámetro máximo relativo de aortas de ratones apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A en condiciones basales (n= 2 apoE<sup>-/-</sup> y 4 apoE<sup>-/-</sup> p27S10A) y tras infusión de AngII durante 5 días (n= 12 apoE<sup>-/-</sup> y 10 apoE<sup>-/-</sup> p27S10A), 12 días (n= 12 apoE<sup>-/-</sup> y 9 apoE<sup>-/-</sup> p27S10A) y 24 días (n= 9 apoE<sup>-/-</sup> y 9 apoE<sup>-/-</sup> p27S10A). Abajo. Imágenes representativas de las ecografías abdominales realizadas en ratones apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A en estado basal y tras 24 días de tratamiento con AngII e imágenes de estas aortas tras el sacrificio de los animales (día 28 de tratamiento). (B) Valores de incidencia de AAA en ratones apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A tratados con AngII durante los tiempos indicados. (C) Curvas de supervivencia de ratones apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A tratados con AngII durante 28 días.

y 24) (**figura 38-A**). Asimismo, el número de animales que presentaron AAA (considerando AAA como una dilatación aórtica que supera en un 50% el diámetro aórtico inicial) fue mayor en el grupo apoE<sup>-/-</sup> p27S10A, siendo muy llamativas estas diferencias durante los primeros días de la administración de la AngII (**figura 38-B**). Por último, al estudiar la supervivencia durante el transcurso

del modelo, pudimos constatar como los ratones carentes de la fosforilación de p27-S10 mostraban tasas de mortalidad superiores comparado con sus controles apoE<sup>-/-</sup> (**figura 38-C**). Todos estos datos sugieren que la pérdida de fosforilación de p27 en la S10 acelera y agrava el proceso de formación de AAA en el modelo murino de infusión de AngII, empeorando el pronóstico de la enfermedad.

### 3.2 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 no modifica la composición de las lesiones aneurismáticas ni la presión arterial de ratones tratados con AngII

Con el objetivo de identificar el mecanismo por el que la fosforilación de p27 en la S10 protege frente a la formación de AAA, se hizo un análisis histológico de

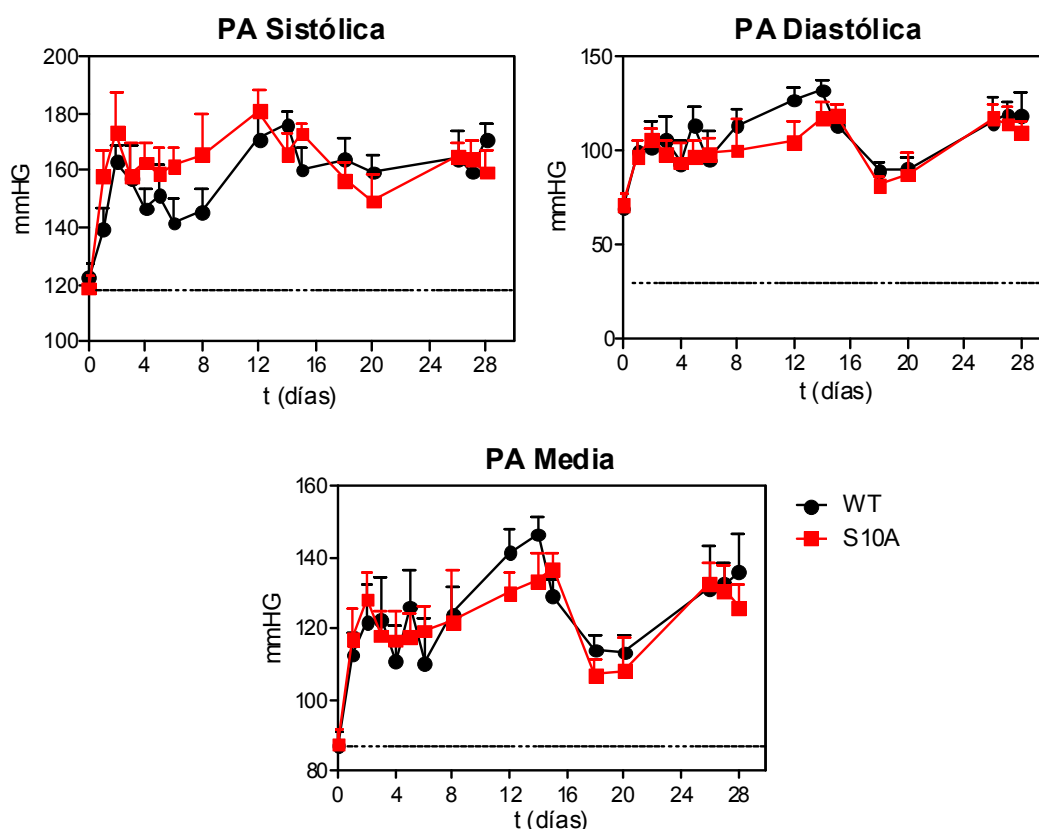


**Figura 39.** La ausencia de fosforilación de p27-S10 no altera el contenido en colágeno, macrófagos y CMLVs de aneurismas aórticos abdominales de ratones tratados con AngII. Cuantificación e imágenes representativas de muestras histológicas de AAA de ratones apoE<sup>-/-</sup> (n=5) y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A (n=5) en las que se detectó el contenido de colágeno (tricrómico de Masson), macrófagos (inmunodetección de Mac-3) y células de músculo liso (inmunodetección de α-actina específica de músculo liso).



las muestras obtenidas en el modelo de infusión de AngII en ratones. Mediante tinción tisular e inmunohistoquímica se detectaron algunos de los principales componentes presentes en lesiones aneurismáticas, como el colágeno (Tricrómico de Masson), los macrófagos (inmunodetección de Mac-3) y las CMLVs (inmunodetección de  $\alpha$ -actina específica de músculo liso). La cuantificación del área positiva para cada componente reveló que la composición de estas lesiones no se ve modificada por la ausencia de fosforilación de p27-S10 (**figura 39**).

Por otro lado, la hipertensión arterial es un importante factor de riesgo en el proceso de formación de AAA (Vardulaki, 2000). Los experimentos mostrados hasta el momento indican que las arterias de los ratones p27S10A presentan una mayor capacidad contráctil en respuesta a agentes hipertensivos y, dado que la AngII es un potente agente vasoconstrictor, quisimos averiguar si la



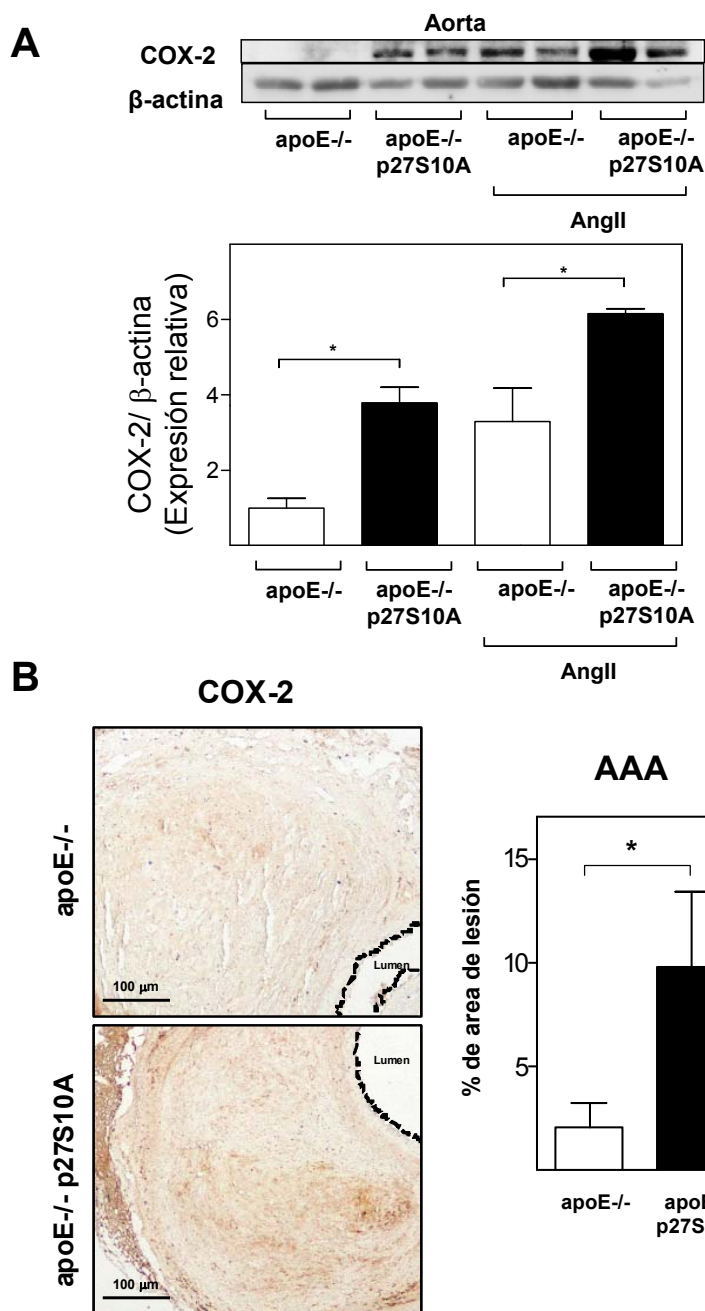
**Figura 40.** La ausencia de fosforilación de p27-S10 no modifica la presión arterial en ratones tratados con AngII. Valores de presión arterial sistólica, diastólica y media de ratones apoE<sup>-/-</sup> (n=6) y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A (n=6) en estado basal y a distintos tiempos de tratamiento con AngII.

fosforilación de p27-S10 participa en el control de la presión arterial durante el desarrollo de esta enfermedad. Se evaluó las presiones arteriales sistólica, diastólica y media de ratones apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A mediante el uso de un esfigmomanómetro para cola de ratón, antes de la implantación de las bombas osmóticas liberadoras de AngII y a distintos tiempos del modelo de AAA. La presión arterial de los ratones apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A aumentó considerablemente desde el inicio de la administración subcutánea de AngII, sin embargo no observamos en ningún momento diferencias entre ambos grupos de ratones (**figura 40**).

Por tanto, la ausencia de fosforilación de p27 en la S10 no modifica las características de la lesión aneurismática. Este resultado descarta el aumento del reclutamiento leucocitario, la exacerbada migración de CMVLs o la acelerada degradación de colágeno como posibles mecanismos responsables del agravamiento de la enfermedad en ratones apoE<sup>-/-</sup> p27S10A. Del mismo modo, no parece probable que los fenómenos hipertensivos estén detrás del fenotipo observado en los ratones incapaces de fosforilar p27 en la S10.

### **3.3 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta la expresión de COX-2 en aortas aneurismáticas**

Además de jugar un importante papel como agente modulador del tono vascular, COX-2 participa activamente en multitud de procesos inflamatorios y patológicos (FitzGerald, 2003; Rajakariar, 2006; Seibert, 1994). Dado que los resultados previos mostraron que la fosforilación de p27 modula la expresión de COX-2 al menos en células endoteliales (**figura 30**), quisimos comprobar si su expresión en aorta también está regulada por esta fosforilación, tanto en condiciones basales como tras tratamiento con AngII. Como era de esperar (Beltran, 2009; Morinelli, 2008; Ohnaka, 2000), tras analizar por *Western-Blot* los extractos proteicos de aorta de ratón en el modelo de formación de AAA, observamos que la acción hipertensiva e inflamatoria provocada por la AngII incrementa los niveles de COX-2 tanto en aortas apoE<sup>-/-</sup> como apoE<sup>-/-</sup> p27S10A. Sin embargo, tanto en condiciones basales como bajo el efecto del agente generador de AAA,



**Figura 41. La ausencia de fosforilación de p27-S10 incrementa la expresión aórtica de COX-2 en respuesta a AngII.** (A) Análisis por *Western-Blot* y cuantificación de los niveles proteicos de COX-2 en aortas de ratones apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A sin tratar y tratados con AngII durante 28 días. Se detectó β-actina como control de carga. Los datos se relativizaron a la condición control (aortas apoE<sup>-/-</sup> de ratones sin tratamiento). (B) Análisis inmunohistológico y cuantificación de los niveles de COX-2 en lesiones aneurismáticas de ratones apoE<sup>-/-</sup> (n=4) y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A (n=8) tratados con AngII durante 28 días.

se pudo ver como los niveles de COX-2 estaban incrementados en aorta de ratones que expresaban la versión no fosforilable de p27 (**figura 41-A**). Además, el estudio inmunohistoquímico de muestras de AAA de estos animales evidenció una mayor expresión de COX-2 en ausencia de la fosforilación de p27-S10

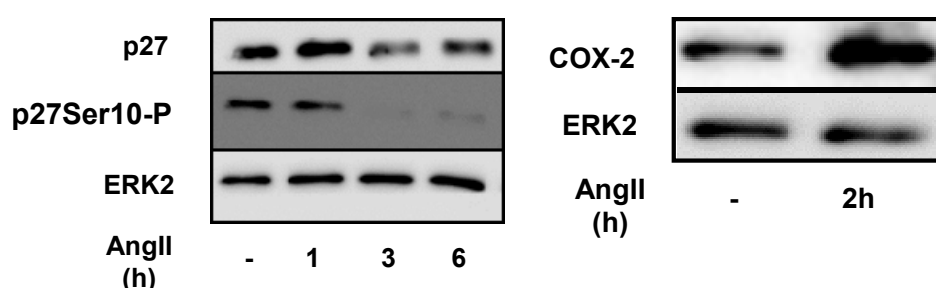
(figura 41-B). Por último, cuando estudiamos el comportamiento endotelial *in vitro*, observamos que la AngII reduce los niveles de fosforilación de p27 en la S10 al mismo tiempo que aumenta la expresión de COX-2 en este tipo celular (figura 42).

Estos datos confirman un papel regulador de la fosforilación de p27-S10 en los mecanismos implicados en la expresión de COX-2 a nivel vascular, y ponen de manifiesto la probable implicación de esta enzima en la formación acelerada de AAA observada en ratones p27S10A.

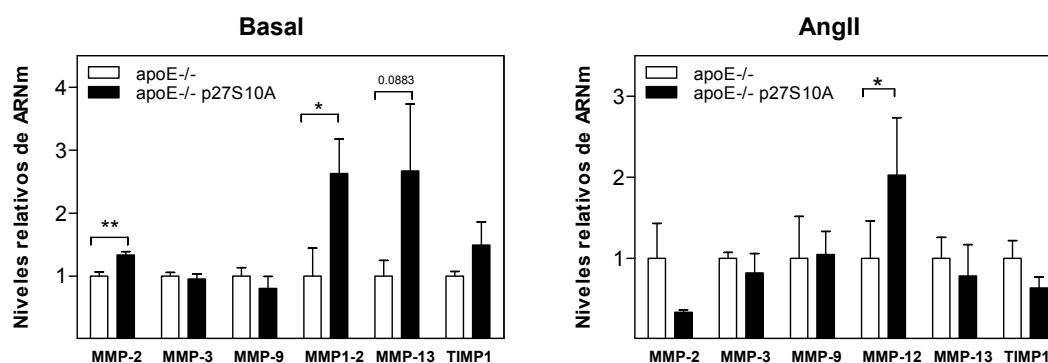
### 3.4 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumenta la expresión de MMPs en aortas murinas

Como se señaló en la *Introducción*, el establecimiento del AAA es consecuencia de un complejo proceso fisiopatológico arterial en el que intervienen multitud de agentes remodeladores. Uno de ellos es una exagerada actividad metaloproteínasa en la pared arterial, la cual conduce a la degradación de la matriz vascular y al debilitamiento de la aorta. Basándonos en esto y en el hecho de que la actividad de COX-2 está asociada con la sobreexpresión de algunas de las principales metaloproteínasas implicadas en el proceso de formación de AAA (Ghoshal, 2012; King, 2006), nos dispusimos a analizar si la fosforilación de p27-

#### Células endoteliales



**Figura 42. La AngII reduce la fosforilación de p27 en la S10 y promueve la expresión de COX-2 en células endoteliales.** Análisis por *Western-Blot* de los niveles proteicos de p27, de su forma fosforilada en la S10 y de COX-2 de células endoteliales en cultivo, en condiciones basales y tras tratamiento con AngII (1 $\mu$ M) durante los tiempos indicados. Se detectó ERK-2 como control de carga.



**Figura 43.** La ausencia de fosforilación de p27-S10 promueve la expresión de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-12 en aorta de ratón. Análisis de la expresión génica de las proteínas MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-12, MMP-13 y TIMP1 en aortas de ratones apoE-/- y apoE-/- p27S10A sin tratar (n=4 para cada genotipo) y tratados con AngII (n=4 para cada genotipo) durante 28 días. Los datos se representan para cada gen relativizados a su control.

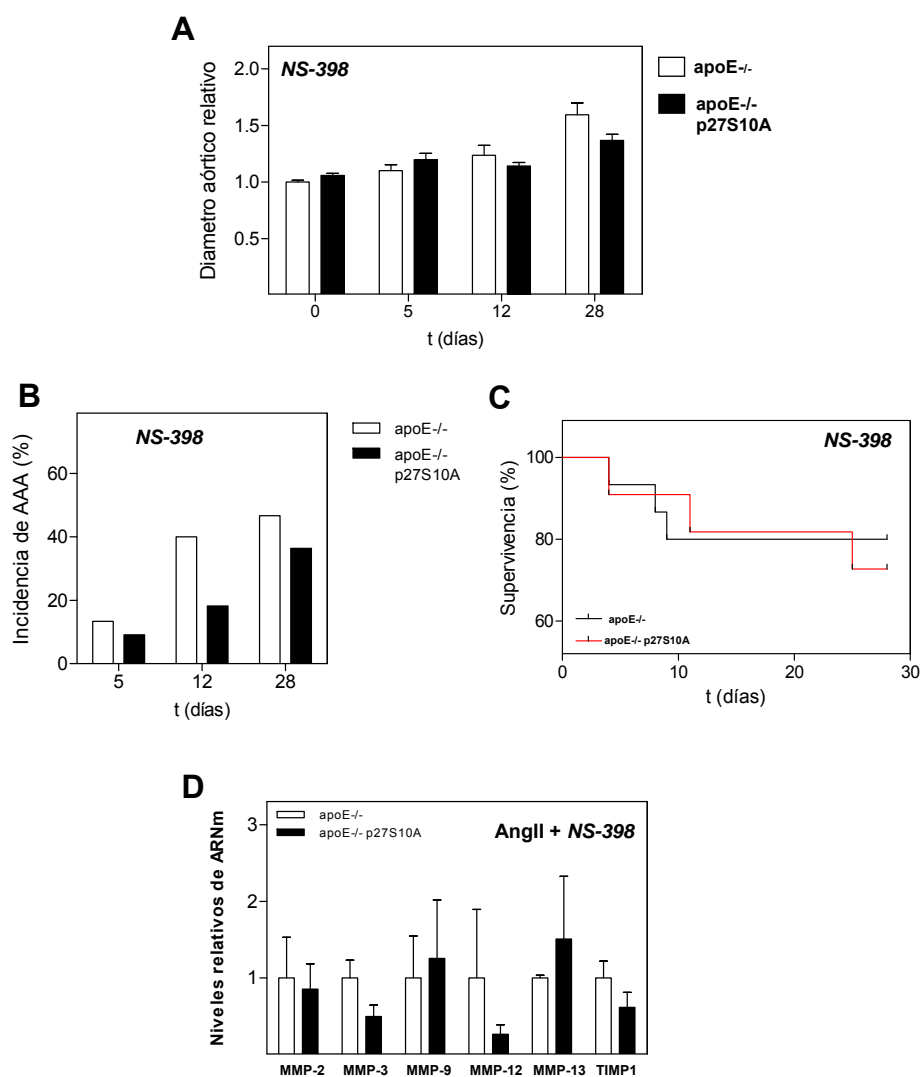
S10 podría alterar la expresión de estas enzimas. Estudiamos por qPCR la expresión de MMP-2, 3, 9, 12 y 13 así como del inhibidor de MMPs TIMP1, en aortas murinas apoE-/- y apoE-/- p27S10A, tanto en estado basal como tras el tratamiento con AngII. Los datos obtenidos mostraron que las aortas de los ratones apoE-/- p27S10A presentan más expresión de la metaloproteinasa MMP-2, y sobre todo de MMP-12, la cual también se sobrepresó tras el tratamiento con AngII (**figura 43**).

Este resultado muestra que la ausencia de fosforilación de p27 en la S10 incrementa la expresión de MMPs, lo que en cierto modo explicaría la mayor sensibilidad de los ratones p27S10A a sufrir remodelado vascular.

### 3.5 La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 promueve la formación de AAA en ratones por un mecanismo dependiente de COX-2

Dado que COX-2 participa activamente en el proceso de formación de AAA (Ghoshal, 2012; King, 2006), quisimos comprobar si su sobreexpresión en ratones apoE-/- p27S10A es, al menos en parte, responsable de la acelerada formación de AAA en estos animales. Las imágenes de la aorta abdominal obtenidas por ecografía de ultrasonidos pusieron de manifiesto que el tratamiento con NS-398 para inhibir COX-2 igualó tanto el tamaño de las

lesiones aneurismáticas en ratones apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A (figura 44-A) como la incidencia de la enfermedad (figura 44-B) o la mortalidad (figura 44-C) tras infusión de AngII. Por otro lado, los niveles de expresión génica en aorta de las metaloproteinasas estudiadas con anterioridad también fueron equiparables entre los ratones apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A tratados con NS-398 (figura 44-D), lo que confirmó que la actividad de COX-2 es responsable de la sobreexpresión



**Figura 44.** La ausencia de fosforilación de p27-S10 promueve la formación de aneurismas aórticos abdominales en ratones a través de una aumentada actividad COX-2. (A) Representación de los diámetros máximos relativos de aortas de ratones apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A tratados con NS-398 en condiciones basales (n= 12 apoE<sup>-/-</sup> y 11 apoE<sup>-/-</sup> p27S10A) y tras infusión de AngII durante 5 días (n= 14 apoE<sup>-/-</sup> y 10 apoE<sup>-/-</sup> p27S10A), 12 días (n= 12 apoE<sup>-/-</sup> y 9 apoE<sup>-/-</sup> p27S10A) y 24 días (n= 11 apoE<sup>-/-</sup> y 8 apoE<sup>-/-</sup> p27S10A). (B) Valores de incidencia de AAA en ratones apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A tratados con NS-398 e infundidos con AngII durante los tiempos indicados. (C) Curvas de supervivencia de ratones apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A tratados con NS-398 e infundidos con AngII durante 28 días. (D) Análisis de la expresión génica de las proteínas MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-12, MMP-13 y TIMP1 en aortas de ratones apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A (n=4 para cada genotipo) tratados con NS-398 e infundidos con AngII durante 28 días.

de metaloproteinasas en ausencia de la fosforilación de p27-S10.

En definitiva, estos datos demuestran una clara implicación de la enzima COX-2 en la capacidad protectora de la fosforilación de p27 en la S10 frente a la formación de AAA inducido por AngII.





**Discusión**

---



El papel protector de las proteínas inhibidoras del ciclo celular frente a la enfermedad cardiovascular está ampliamente descrito como demuestra un importante número de estudios (Fuster, 2010). Sin embargo la implicación de este grupo de proteínas en contextos alejados de la proliferación celular está todavía lejos de conocerse.

Trabajos anteriores realizados en este laboratorio han demostrado un efecto protector de p27 frente a la aterosclerosis gracias a su función inhibidora de la proliferación y migración celular (Diez-Juan, 2001; Diez-Juan, 2004) (Castro, 2003; Diez-Juan, 2003). En estos trabajos con cultivos celulares y ratones modificados genéticamente se observó que la expresión de p27 inhibe la proliferación y migración de CMLVs y de macrófagos, favoreciendo la formación de placa aterosclerótica. Sin embargo, recientemente se ha descrito que p27 no solo posee un papel ateroprotector basado en su función anti-proliferativa si no que, mediante su regulación dependiente de la fosforilación en la S10, puede modular otros procesos involucrados en el desarrollo de la enfermedad. Por ejemplo, se ha visto que la pérdida de esta fosforilación incrementa la capacidad de los macrófagos para captar LDLs modificadas y promueve la aterogénesis en estados avanzados de la enfermedad (Fuster, 2011).

Estos precedentes sugieren la posibilidad de que la fosforilación de p27 en la S10 juegue un importante papel en el desarrollo de la enfermedad vascular. Nuestros estudios pretendieron por una parte, identificar si esta modificación postraduccional regula los eventos iniciadores de la aterosclerosis mediante el control del comportamiento endotelial y, por otro, estudiar la implicación de esta fosforilación en otros procesos fisiopatológicos vasculares, como la formación de AAA.

Como primera aproximación, estudiamos si la hipercolesterolemia, factor desencadenante de la aterosclerosis, modifica el estado fosforilado de p27 en la S10. El uso del modelo murino apoE<sup>-/-</sup> nos permitió observar como la hipercolesterolemia induce significativamente una bajada de los niveles de la fosforilación de p27 en la S10 en aorta. Estudios previos demostraron que la aparición de placa aterosclerótica va asociada con una importante defosforilación

de p27 en la S10 (Fuster, 2011), sin embargo en este trabajo hemos podido ver una clara reducción de los niveles de p27-S10 fosforilado a nivel aórtico después de tan solo 9 días de dieta grasa, cuando aún no han aparecido placas ateroscleróticas. Este resultado pone de manifiesto que la pérdida de fosforilación de p27 en la S10 en arterias viene provocada por los altos niveles de colesterol en sangre y no es consecuencia de los procesos fisiopatológicos desarrollados posteriormente. Además la incubación de células endoteliales con suero procedente de ratones hipercolesterolémicos produjo la reducción de la fosforilación de p27 en la S10 en este tipo celular, identificando al estímulo hipercolesterolémico como inductor de la defosforilación de p27-S10.

Puesto que la hipercolesterolemia es responsable de la activación endotelial y la consecuente expresión de moléculas de adhesión durante la aterogénesis (Libby, 2002), quisimos determinar si la pérdida de la fosforilación de p27 en la S10 podría fomentar la expresión de dichas moléculas. Nuestros resultados no solo demostraron que la hipercolesterolemia promueve la expresión de moléculas de adhesión endotelial en aorta, principalmente VCAM-1, sino que también mostraron que esto es consecuencia de la reducción de los niveles de fosforilación de p27, ya que los ratones p27S10A que carecen de dicha fosforilación mostraron una mayor expresión de VCAM-1, ICAM-1 y Sel-L antes incluso de ser alimentados con dieta grasa. Este hallazgo se confirmó en células endoteliales obtenidas de animales p27S10A, las cuales mostraron mayores niveles proteicos de VCAM-1 en estado basal.

Hasta este momento se pensaba que el papel de p27 en el endotelio vascular se limitaba a contribuir al mantenimiento de su estado quiescente no proliferativo (Chen, 2000a), controlando por ejemplo la proliferación y la migración de las células endoteliales durante la angiogénesis (Goukassian, 2001). Sin embargo nuestros resultados son la primera evidencia de que p27 también ejerce en el endotelio una acción más allá de su acción antiproliferativa (Chen, 2000a; Seibold, 2004) o antimigratoria (Hsu, 2014). De hecho la proliferación celular no se ve afectada por la fosforilación de p27 en la S10 según nuestros experimentos, igual que ocurre en linfocitos, fibroblastos y macrófagos murinos (Besson, 2006; Fuster, 2011; Kotake, 2005), a pesar de que la pérdida de

fosforilación de p27-S10 conduce a la reducción de los niveles totales de p27 en estos tipos celulares. En relación a esto, hemos visto que la ausencia de la fosforilación de p27-S10 provoca una reducción de la cantidad de p27 citoplasmático en células endoteliales. No obstante tenemos evidencias de que la cantidad nuclear de p27 no se ve afectada por esta modificación postraduccional (datos no mostrados), lo que explicaría que las células procedentes de animales p27S10A y de animales silvestres tengan la misma capacidad proliferativa.

Asimismo, hemos observado que la capacidad migratoria de las células endoteliales no está condicionada por esta fosforilación. Existen claras evidencias de que p27 controla este proceso. Por un lado estudios llevados a cabo en fibroblastos demuestran que la ausencia de p27 reduce dramáticamente la migración celular (Besson, 2004) aunque, por otro lado se ha visto que la sobreexpresión de esta CKI en CMLVs inhibe la migración celular (Castro, 2003; Diez-Juan, 2003). Nosotros hipotetizamos que quizá la disminución de los niveles citoplasmáticos de p27 asociados a la ausencia de fosforilación en la S10 no es suficiente para comprometer la capacidad migratoria de estas células, pero sin duda serían necesarios más experimentos que confirmasen esta posibilidad y que evidenciasen el mecanismo exacto subyacente a este fenómeno.

La versatilidad funcional de p27 descrita en estos últimos años es en parte consecuencia de su capacidad para interactuar con un gran número de proteínas, entre las que destaca RhoA, una GTPasa perteneciente a la superfamilia de Ras (Besson, 2004). Estudios previos han evidenciado que la activación de RhoA y de sus quinasas asociadas ROCK promueven el proceso aterosclerótico. Se sabe que la inhibición farmacológica de ROCK protege frente al desarrollo de aterosclerosis en modelos porcinos (Shimokawa, 2001) y murinos (Mallat, 2003), promoviendo la proliferación de linfocitos T, la acumulación lipídica y la formación de células espumosas (Wang, 2008a). De hecho, la fosforilación de p27 en S10 inhibe la vía de señalización RhoA/ROCK en macrófagos, restringiendo su capacidad para captar LDLs modificadas (Fuster, 2011). Por otro lado, la expresión de VCAM-1 está altamente regulada por esta GTPasa en células endoteliales (Kawanami, 2013). Estos antecedentes

nos llevaron a estudiar la vía de señalización de RhoA/ROCK como posible responsable de la sobreexpresión de VCAM-1 observada en células endoteliales carentes de la fosforilación de p27 en la S10. Nuestros experimentos mostraron que la expresión de la forma no fosforilable de p27 (p27S10A) aumenta la presencia de VCAM-1 y de las formas fosforiladas de ERM en células endoteliales, de lo que se deduce que en ausencia de la fosforilación de p27-S10, la vía RhoA/ROCK está sobreactivada.

VCAM-1, debido a su importante papel en los fenómenos de adhesión leucocitaria, también participa muy activamente en los primeros estadios de la formación de placas ateroscleróticas, como demuestran estudios en modelos murinos en los que se ha podido ver como una deficiente expresión de VCAM-1 conlleva una disminución en la formación de placas ateroscleróticas (Zhou, 2009). En este sentido, y como era de esperar, observamos que la activación de la vía RhoA/ROCK y la sobreexpresión de VCAM-1 en células endoteliales debida a la pérdida de fosforilación de p27 en la S10 promovieron los fenómenos de interacción leucocito-endotelio. El análisis del número de leucocitos adheridos a cultivos de células endoteliales carentes de la fosforilación y células endoteliales control demostró que en condiciones defosforiladas de p27 este fenómeno está aumentado. De igual modo, el estudio de adhesión leucocitaria en arteriolas cremastéricas mostró un mayor número de leucocitos adheridos en ratones p27S10A que expresaban la versión no fosforilable de p27. Además, la implicación de RhoA/ROCK y VCAM-1 en este fenómeno fue claramente evidenciada al comprobar que el bloqueo de la funcionalidad de ambos (bien con fasudil o bien con anticuerpos específicos frente a VCAM-1) conduce a similares tasas de adhesión leucocitaria tanto si p27 está fosforilado en su S10 como si no.

A continuación fuimos capaces de comprobar que esta mayor interacción leucocito-endotelio atribuible a la ausencia de fosforilación de p27-S10 también ocurría durante el proceso aterogénico. Valiéndonos de una nueva técnica desarrollada en este laboratorio (Chevre, 2014), pudimos visualizar *in situ* las primeras fases de la formación de placa de ateroma en la arteria carótida, observando que los animales apoE<sup>-/-</sup> p27S10A presentaban un mayor número

de leucocitos rodantes que sus controles apoE<sup>-/-</sup>. Este fenómeno se dio tanto con animales alimentados con dieta control como induciendo el proceso aterogénico con una alimentación grasa durante 14 días. De hecho, fue muy interesante comprobar como las diferencias en el número de leucocitos rodantes se redujeron considerablemente en esta segunda condición debido, en nuestra opinión, a la pérdida de fosforilación de p27-S10 que sufren las aortas de los ratones apoE<sup>-/-</sup> por la hipercolesterolemia, como vimos previamente. A este respecto pensamos que una hipercolesterolemia prolongada llevaría a la defosforilación total de p27-S10 a nivel arterial y haría que el comportamiento vascular de los ratones apoE<sup>-/-</sup> y los apoE<sup>-/-</sup> p27S10A fuera el mismo. Lamentablemente se desconoce como la hipercolesterolemia reduce la fosforilación de p27 en la S10, lo que nos invita a llevar a cabo aproximaciones genómicas y proteómicas que permitan identificar los agentes que participan en dicho proceso.

Posteriormente hipotetizamos que, si la ausencia de fosforilación de p27 en la serina 10 aumenta el rodamiento y la adhesión leucocitaria arterial, la extravasación debería estar también incrementada en estas condiciones. De hecho, cuando se estudió la expresión de moléculas de adhesión en arterias apoE<sup>-/-</sup> y arterias apoE<sup>-/-</sup> p27S10A, pudimos ver como la expresión de Sel-L (selectina expresada principalmente en leucocitos) era significativamente mayor en la condición defosforilada, lo que en sí ya sugiere la existencia de un mayor número de leucocitos infiltrados en las arterias procedentes de ratones apoE<sup>-/-</sup> p27S10A. Esta idea se confirmó con estudios de transferencia adoptiva de leucocitos en ratones apoE<sup>-/-</sup>, que demostraron un aumento en el reclutamiento leucocitario en la media arterial en ausencia de la fosforilación de p27 en S10. Asimismo, y como sucedió en los estudios *in vitro* e *in vivo* de adhesión leucocitaria, el bloqueo de la vía RhoA/ROCK mediante tratamiento con fasudil igualó el número de leucocitos extravasados en ambos grupos de animales, reforzando el importante papel de esta ruta de señalización en el comportamiento endotelial derivado de la ausencia de fosforilación de p27.

Los fenómenos de adhesión leucocitaria, rodamiento y extravasación, dependen principalmente de dos compartimentos o tipos celulares distintos, el endotelio y

los leucocitos. Los datos obtenidos indican claramente que la fosforilación de p27 modula el fenotipo endotelial. De hecho los experimentos de extravasación leucocitaria mediante transferencia adoptiva se realizaron en todas las condiciones, inyectando leucocitos silvestres, lo que excluye el componente hematopoyético como posible responsable de la mayor infiltración leucocitaria observada en ratones apoE<sup>-/-</sup>-p27S10A. Sin embargo, estudios previos han demostrado que la ausencia de fosforilación de p27-S10 altera el comportamiento leucocitario. Particularmente se ha visto que los macrófagos p27S10A aumentan su capacidad para captar LDLs modificadas en comparación con células control (Fuster, 2011). Dada la implicación de esta modificación postraducional en la función de los macrófagos, decidimos evaluar si los leucocitos carentes de esta fosforilación expresaban más moléculas de adhesión en superficie, del mismo modo que ocurre en células endoteliales. El estudio de las sangres de ratones p27S10A demostró que la cantidad de monocitos, neutrófilos y linfocitos no se ve alterada por la ausencia de la fosforilación de p27-S10. Asimismo, los niveles de expresión de los ligandos Sel-L, PSGL-1, CD11b y CD49d fueron semejantes en estas subpoblaciones leucocitarias de ratones apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A, lo que confirma que la funcionalidad leucocitaria no está condicionada por la fosforilación de p27 en S10, al menos en lo que se refiere a su interacción con el endotelio. En este mismo sentido, los experimentos de adhesión *in vitro* mostraron que la incubación de leucocitos y células endoteliales p27S10A conlleva la adhesión del mismo número de leucocitos que si los leucocitos expresan p27 fosforilable en la S10, lo que refuerza la idea de que es el endotelio, y no el leucocito, el que modifica la adhesión leucocitaria. Además, estos resultados sugieren que la fosforilación de p27 en la S10 no solo está regulada de manera diferencial en distintos tipos celulares como ya dijimos en la *Introducción*, si no que probablemente sus implicaciones funcionales también sean distintas en cada uno de ellos.

Por último pudimos ver como todos estos fenómenos observados en ausencia de fosforilación de p27-S10 condujeron a la aceleración de la formación de placa aterosclerótica temprana. El análisis de ratones apoE<sup>-/-</sup> Mafia y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A Mafia alimentados con dieta grasa durante 4 semanas mostró la presencia de lesiones ateroscleróticas de mayor tamaño en seno aórtico cuando p27 no se



encuentra fosforilado en S10, hecho que se asoció a un aumento del reclutamiento leucocitario (analizando por qPCR la presencia de EGFP) y a una sobreexpresión de VCAM-1 en aorta. A su vez, la inhibición farmacológica de la vía RhoA/ROCK eliminó las diferencias en la formación de placa aterosclerótica, el reclutamiento leucocitario y la expresión de VCAM-1 entre los ratones apoE<sup>-/-</sup> Mafia y apoE<sup>-/-</sup> Mafia p27S10A.

Estos experimentos en su conjunto ponen de manifiesto que la pérdida de la fosforilación de p27 en la S10 no solo modifica el comportamiento endotelial en respuesta a los primeros estímulos aterogénicos sino que esto se traduce en una aceleración del desarrollo temprano de la aterosclerosis. Además nuestros resultados identifican de un modo concluyente a la ruta RhoA/ROCK y a la molécula VCAM-1 como responsables de dicho efecto. En conclusión, proponemos que la pérdida de fosforilación de p27 en la S10 activa la vía RhoA/ROCK y promueve la expresión de VCAM-1 en el endotelio, favoreciendo la adhesión y el reclutamiento leucocitario y la formación de placa aterosclerótica temprana (**figura 45**).

A pesar de todo, el mecanismo molecular por el que esta fosforilación modifica la actividad RhoA/ROCK no está del todo claro. Otros laboratorios han demostrado que tanto la estabilidad de p27 (Ishida, 2000) como su translocación del núcleo al citosol (Rodier, 2001) dependen de la fosforilación en la S10. De acuerdo con esto hemos observado una reducción de los niveles citoplasmáticos de p27 en células endoteliales de ratones p27S10A, algo que ya se habíamos visto en macrófagos (Fuster, 2011). Actualmente pensamos que el mecanismo responsable de la activación de la vía RhoA/ROCK en ausencia de la fosforilación de p27 es una menor interacción entre p27 y RhoA, hipótesis que deberá validarse experimentalmente (por ejemplo mediante experimentos de inmunoprecipitación). De igual modo, sería interesante analizar los niveles proteicos de RhoA en las células que expresan la versión no fosforilable de p27, ya que debido a la capacidad de p27 para regular la expresión de proteínas, no podemos descartar la posibilidad de que la expresión de RhoA también esté condicionada por la fosforilación de p27-S10.

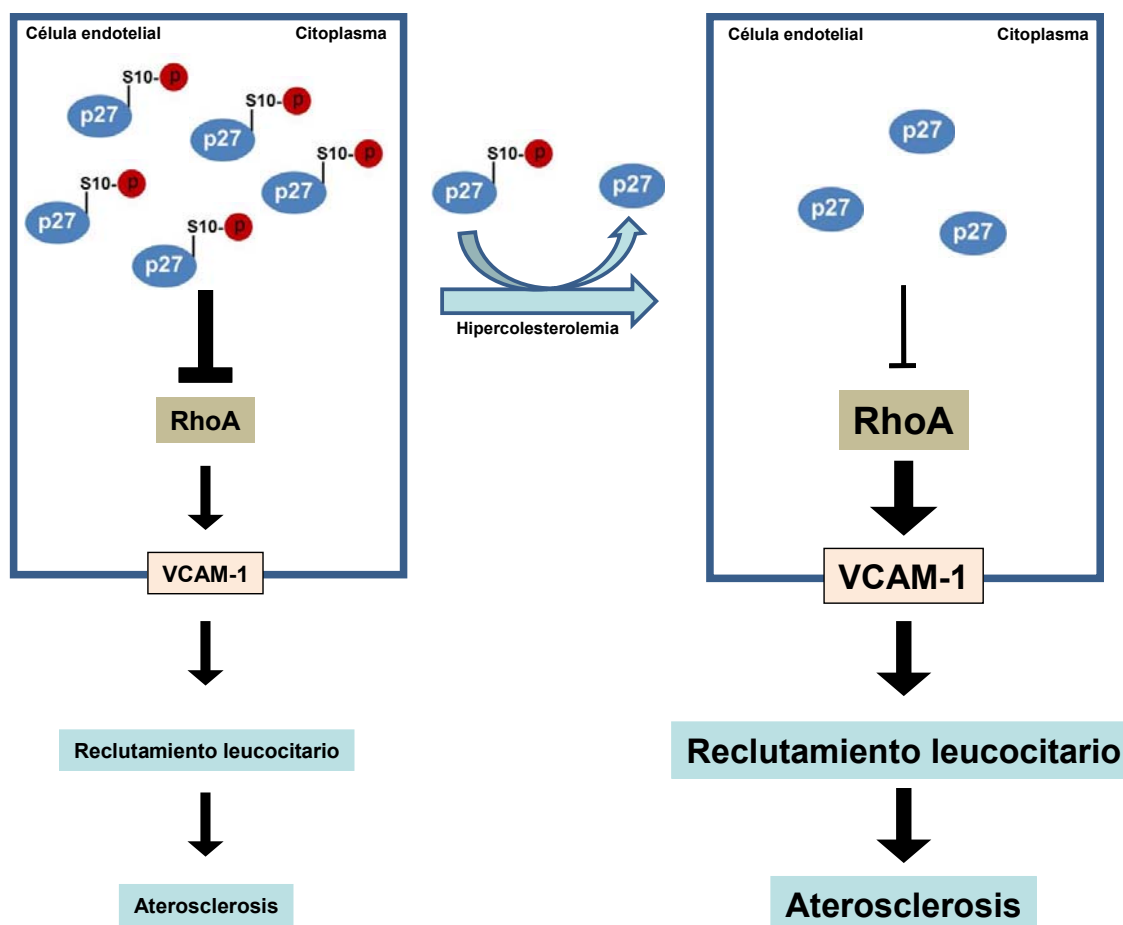


Figura 45. Mecanismo propuesto para el agravamiento de la aterosclerosis temprana asociado a una deficiente fosforilación de p27 en la S10.

Dada la versatilidad funcional del endotelio, nos planteamos estudiar si la fosforilación de p27 en S10 regula otros procesos importantes, concretamente los fenómenos de contractilidad y reactividad vascular. En un primer abordaje con células endoteliales de aorta de ratón, vimos que la ausencia de la fosforilación de p27-S10 promueve la expresión y la actividad de COX-2, sin alterar la expresión de otras enzimas importantes en la regulación de moléculas vasoactivas, como COX-1, eNOS o iNOS. COX-2 o PTGS2 es la enzima que transforma el ácido araquidónico en PGH<sub>2</sub>, principal precursor de prostanoideos. En condiciones normales esta proteína se expresa en muy bajas cantidades en la mayoría de tejidos y tipos celulares, pero su expresión se ve rápidamente inducida en respuesta a procesos inflamatorios (Seibert, 1994). Sin embargo, COX-2 si se expresa constitutivamente en endotelio (Funk, 2007), donde posee una función clave en el control del tono vascular. COX-2 es conocida por ser el

principal responsable de la síntesis vascular del vasodilatador PGI<sub>2</sub>, el cual es fundamental cuando la biodisponibilidad de NO se ve disminuida. En este sentido, estudios previos han demostrado que en estados patológicos como diabetes e hipertensión la actividad de COX-2 podría suponer un mecanismo compensatorio de la disfunción endotelial (Meeking, 2000; Nacci, 2009), aumentando la producción de prostaciclina vasodilatadora. Asimismo, se sabe que la inhibición de COX-2 incrementa el tono vascular en arterias humanas en respuesta a norepinefrina, al reducir la producción de los vasodilatadores PGI<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub> tras un estímulo inflamatorio (Foudi, 2009), o que el bloqueo de la actividad COX-2 a nivel vascular reduce la liberación de PGI<sub>2</sub> y la liberación de NO en modelos animales, lo que predispone a padecer fenómenos hipertensivos y trombóticos (Yu, 2012).

Todos estos antecedentes sugirieron que el aumento de la actividad de COX-2 en células endoteliales asociada a la ausencia de la fosforilación de p27-S10 debía modificar el comportamiento vascular, reduciendo la capacidad contráctil arterial. Gracias al empleo del miógrafo de alambre pudimos estudiar estos fenómenos, observando que, al contrario de lo que pensábamos, la ausencia de fosforilación incrementa la respuesta contráctil frente a un estímulo vasoconstrictor en aorta. Este hallazgo fue confirmado en estudios *in vivo* en arterias de menor tamaño (arteriolas cremastéricas), en los que pudimos ver como los ratones p27S10A respondieron más intensamente al estímulo contráctil provocado por la fenilefrina. Asimismo, constatamos que esta contractilidad alterada atribuida a la ausencia de la fosforilación de p27-S10 era debida a una disfuncionalidad del endotelio, puesto que los experimentos en miógrafo de alambre realizados con aortas a las que se eliminó el endotelio revelaron similares grados de contracción en las aortas control y p27S10A. Por otro lado, se observó que un tratamiento *tanto ex vivo* de las aortas como *in vivo* de los ratones con el inhibidor NS-398, específico de la enzima COX-2, igualaba el comportamiento de las arterias control y p27S10A. En conjunto, estos datos demostraron que la fosforilación de p27 en la S10 participa activamente en los procesos de contractilidad vascular, mediante un mecanismo en el que estaría involucrada la COX-2 endotelial.

Como consecuencia de estos hallazgos, quisimos identificar la molécula vasoactiva responsable de la contractilidad exacerbada observada en arterias de ratones que expresaban la forma no fosforilable de p27. La actividad COX-2 está muy ligada a la producción de PGI<sub>2</sub>, sin embargo también se sabe que COX-2 participa en la síntesis de agentes vasoconstrictores. Por ejemplo, se ha demostrado que la inducción de COX-2 en células endoteliales de roedores, tanto en aorta como en arterias de resistencia, se asocia con un incremento de prostanoideos contráctiles derivados de endotelio (Heymes et al., 2000; Alvarez et al., 2005; Blanco-Rivero et al., 2005; Shi et al., 2008; Viridis et al., 2009). De igual modo, y aunque generalmente se relaciona con COX-1, COX-2 también es responsable de la producción del vasoconstrictor TXA<sub>2</sub> en condiciones inflamatorias (Grandel, 2000). Al estudiar en aorta la liberación de PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> (moléculas vasodilatadoras) y TXA<sub>2</sub> (molécula vasoconstrictora) vimos que la ausencia de fosforilación de p27 en S10 potencia la producción de TXA<sub>2</sub> como consecuencia de la activación de COX-2. Además, observamos en aorta de ratones p27S10A mayor expresión de TBXA<sub>2</sub>, la enzima directamente encargada de la síntesis final de TXA<sub>2</sub>. En conclusión, la ausencia de fosforilación de p27 en la S10 aumentó en aorta la producción del vasoconstrictor TBXA<sub>2</sub>, sin provocar cambios en otros prostanoideos. Dado que el PGH<sub>2</sub> producido por COX-2 es el precursor común de las tres moléculas estudiadas, puede parecer incoherente que sólo la liberación de TXA<sub>2</sub> esté aumentada y no la de PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>. Sin embargo este desequilibrio en la producción final de prostanoideos no es del todo extraño, ya que se sabe que depende de la isoenzima de COX involucrada en el proceso, así como del tipo celular estudiado o el estímulo inductor de la liberación (Caughey, 2001).

Aunque la sobreexpresión de COX-2 se considera un mecanismo compensatorio frente a la hipertensión, y a pesar de la existencia de multitud de estudios que asocian el bloqueo específico de esta isoenzima con la aparición de hipertensión (Chan, 2009), consideramos que la hipersensibilidad a la contractilidad de las arterias de los ratones p27S10A podría llevar asociado un incremento de la presión arterial en estos animales. Sin embargo, no observamos diferencias en los niveles de presión arterial de los ratones p27S10A y sus controles, tanto en estado basal como tras el tratamiento con distintas dosis del agente hipertensivo

fenilefrina. Este sorprendente resultado puede deberse a varios motivos. Por un lado, los estudios mostrados se llevaron a cabo en animales jóvenes de 8 semanas de edad y quizá la disfunción endotelial observada conduzca a procesos hipertensivos como consecuencia de un proceso acumulativo en el tiempo, solo evidenciable en ratones de mayor edad.

También hay que tener en cuenta que el endotelio produce otras moléculas que regulan el tono vascular que no hemos estudiado en este trabajo. El NO es la molécula más relacionada con la actividad endotelial, además su síntesis promueve la expresión de COX-2 (Fang, 2014). Sin embargo, nuestros datos de expresión proteica de eNOS e iNOS en células endoteliales y el análisis de metabolitos derivados del NO realizado en suero de estos ratones (datos no mostrados) parecen indicar que la producción de NO no se vería alterada por el estado de fosforilación de p27-S10. Tampoco hay que olvidar que el endotelio no es el único responsable de la regulación de la capacidad contráctil arterial. Efectivamente, las CMLVs, cuya actividad no se ha evaluado en esta tesis doctoral, también juegan un papel preponderante en este proceso. Las CMLVs pueden presentar diferentes fenotipos, desde un estado maduro quiescente, conocido como “fenotipo contráctil”, que determina el diámetro del vaso sanguíneo (Schaper, 1996; Zalewski, 2002), hasta fenotipos migratorios o proliferativos generados normalmente en respuesta a daño tisular, que van acompañados de alteraciones en la funcionalidad de p27 (Sun, 2001; Tanner, 2000).

Además, debido a las similitudes estructurales, la mayoría de prostanoïdes tienen la capacidad de interactuar no solo con sus receptores preferenciales sino también con muchos otros que a veces presentan funciones contrapuestas (Narumiya, 1999). Cabe pues la posibilidad de que algunos prostanoïdes activen diferencialmente unos receptores u otros por un mecanismo dependiente de la fosforilación de p27 en la S10.

Otra opción podría ser la existencia de una adaptación estructural compensatoria arterial que camuflase el fenotipo hipertensivo. Para evaluar esta posibilidad, analizamos las características estructurales de la aorta de ratones control y

p27S10A. Fue interesante ver que la ausencia de fosforilación de p27 en la S10 no modificó ni la cantidad de fibras de elastina ni el tamaño de la media arterial; sin embargo, observamos un diámetro luminal mayor en aorta de ratones p27S10A. Por un lado este remodelado “hacia afuera” de la aorta puede ser un mecanismo compensatorio que neutralice, en cierta medida, el esperado estado hipertensivo de los ratones p27S10A. Por otra parte, confirma la implicación de esta modificación postraducciona l de p27 en los procesos de remodelado arterial. Aunque, como luego comentaremos en más detalle, la expresión de metaloproteinasas podría ser responsable de esta modificación estructural, consideramos que son necesarios más estudios para identificar exactamente los procesos involucrados en este fenómeno. Para ello pensamos que es fundamental estudiar en profundidad el comportamiento de las CMLVs en ausencia de la fosforilación de p27 en la S10, así como la implicación de esta modificación postraducciona l en las rutas de señalización derivadas de la producción de prostanoides, los cuales modifican considerablemente la homeostasis y estructura vascular (Sparks, 2013; Vessieres, 2013).

Los datos anteriores constataron que la fosforilación de la S10 de p27 juega un papel muy relevante en los procesos iniciadores del proceso aterosclerótico y en la regulación de la reactividad vascular. Dado que el proceso de formación de aneurismas comparte grandes similitudes con el proceso aterosclerótico (ver *Introducción*), y puesto que la ausencia de fosforilación de p27 en la S10 promueve el remodelado exterior del vaso, nos planteamos la posibilidad de que esta modificación postraducciona l también tuviera un papel protector frente al desarrollo de AAA. Mediante el empleo del modelo de infusión de AngII en ratones apoE<sup>-/-</sup> pudimos corroborar esta hipótesis al demostrar que la ausencia de fosforilación de p27 promueve la formación de AAA, incrementando el diámetro aórtico y la incidencia de la enfermedad. A su vez, la expansión de los AAA condujo a una mayor mortalidad en los ratones apoE<sup>-/-</sup> p27S10A.

El modelo de infusión de AngII se caracteriza por una elevada infiltración leucocitaria en la lesión aneurismática (Daugherty, 2000). Nuestros estudios previos de aterosclerosis demostraron una migración leucocitaria aumentada derivada del estado defosforilado de p27. Por tanto, pensamos que uno de los

principales motivos del aceleramiento en la formación de AAA podía ser el exacerbado reclutamiento leucocitario en las lesiones de los ratones carentes de la fosforilación de p27-S10. Sin embargo, los análisis histológicos de los AAA obtenidos de ratones apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A mostraron una cantidad similar de macrófagos en las lesiones. Esto puede ser debido a que los mecanismos que inducen reclutamiento leucocitario son diferentes en el modelo aterosclerótico y de formación de AAA. Estudios en vénulas de rata han demostrado que la infiltración leucocitaria inducida por AngII está mediada por la actividad de los receptores de la angiotensina II AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> y la consecuente sobreexpresión de Sel-P (Piqueras, 2000), pero no hay constancia de que p27 esté implicado en esta ruta de señalización. Además, nuestros estudios histológicos se realizaron en AAA avanzados, por lo que desconocemos lo que sucede en los primeros estadios de la formación de estas dilataciones, momento en que quizá sí se puedan observar diferencias en la composición de las lesiones. Por ello, la realización de modelos más cortos (infusión de AngII durante 5-10 días) podría aportarnos datos de gran interés.

Del mismo modo, y de acuerdo con nuestros estudios previos de aterosclerosis avanzada (Fuster, 2011), tampoco observamos diferencias en la presencia de otros componentes de la lesión, como el colágeno o las CMLVs al comparar ratones apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A. Por tanto, nuestros resultados parecen indicar que las características histológicas de las lesiones aneurismáticas son similares en ratones apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A tras 28 días de infusión de AngII, lo que sugiere que la ausencia de fosforilación de p27-S10 acelera el proceso patológico, pero no los mecanismos desencadenantes de la enfermedad.

El modelo de infusión de AngII se caracteriza por producir una importante elevación de los niveles de presión arterial en los animales. Aunque no es responsable directo de la formación de AAA en el modelo de infusión de AngII (Cassis, 2009), la hipertensión se asocia al desarrollo de la enfermedad tanto en modelos animales (Nishijo, 1998) como en humanos (Forsdahl, 2009). Sin embargo, en nuestro estudio observamos que la AngII eleva por igual la presión arterial en ratones apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A, a pesar de que estos últimos

respondían más al estímulo vasoconstrictor de la fenilefrina. Estos resultados descartan la hipertensión como posible mecanismo del aceleramiento de AAA asociado a la ausencia de fosforilación de p27 en la S10.

Sin embargo, y en concordancia con los estudios de reactividad vascular, observamos mayor expresión de COX-2 en las arterias de los ratones apoE<sup>-/-</sup> p27S10A, tanto en estado basal antes de la formación de lesiones como en la propia lesión aneurismática inducida por el tratamiento con AngII. Además, la AngII indujo en células endoteliales la defosforilación de p27 en la S10 y la sobreexpresión de COX-2.

COX-2 participa activamente en múltiples enfermedades (Pasinetti, 1998; Teismann, 2003). Estudios previos ya han demostrado que la actividad de COX-2 promueve la generación de aneurisma. Así, se ha observado que la inhibición farmacológica de COX-2 reduce la expansión aneurismática tanto en ratones (Ghoshal, 2012; King, 2006) como en ratas (Miralles, 1999). De acuerdo con esto, la expresión y actividad de COX-2 es mayor en muestras de AAA humanos (Holmes, 1997). Por tanto, hipotetizamos que la activación de COX-2 que observamos en ausencia de la fosforilación de p27 en la S10 estaría implicada en el aumento del desarrollo de esta enfermedad en ratones apoE<sup>-/-</sup> p27S10A. Apoyando esta posibilidad, observamos tasas similares de formación de AAA, así como de incidencia y de mortalidad al comparar ratones apoE<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup> p27S10A tratados con NS-398 con el fin de inhibir COX-2 durante todo el período de infusión con AngII.

El mecanismo por el que la actividad de COX-2 incrementa la formación de AAA no se conoce con exactitud. Se piensa que la producción de PGI<sub>2</sub> fomenta el estrés oxidativo a nivel vascular, favoreciendo los procesos que originan el desarrollo de la enfermedad (Wang, 2008b). No obstante, nuestros datos de producción de prostanoïdes parecen descartar esta posibilidad como la causante del efecto protector de la fosforilación de p27 en la S10. Por otro lado, COX-2 promueve la expresión de metaloproteinasas en distintos tipos celulares (Callejas, 2001) y condiciones patológicas (Pan, 2001). Por ello, decidimos estudiar la expresión de las principales metaloproteinasas asociadas a la



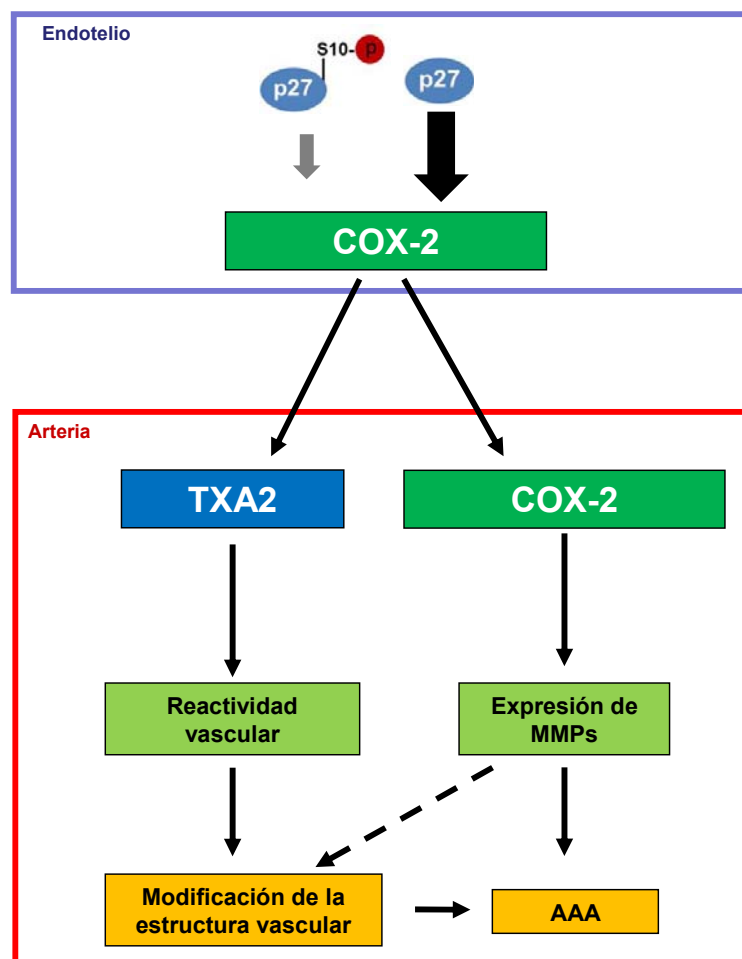


Figura 46. Efecto de la fosforilación de p27 en la S10 en la expresión de COX-2 y su implicación en el remodelado vascular.

formación de AAA (MMP-2, MMP-9 etc.), observando que la fosforilación deficiente de p27 en la S10 incrementa en aorta de ratón los niveles de ARNm de MMP-2 y MMP-12. Esta última también se vio sobrepresada en aorta p27S10A después del estímulo generador del AAA. Esta sobrepresión de metaloproteinasas podría ser responsable de la acelerada formación de AAA en ratones apoE<sup>-/-</sup> p27S10A, puesto que el bloqueo selectivo de COX-2 durante el modelo de generación de AAA no solo igualó el tamaño de las lesiones aneurismáticas sino también la expresión de estas metaloproteinasas.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que la ausencia de fosforilación de p27 en la S10 promueve la expresión y actividad de COX-2. Esta respuesta incrementa la sensibilidad arterial a la contractilidad inducida por fenilefrina y promueve el desarrollo de AAA, posiblemente debido a la inducción de

metaloproteinasas encargadas de la degradación de la matriz vascular (**figura 46**).

Aún quedaría por identificar el mecanismo exacto por el que la fosforilación de p27 regula la expresión de COX-2. Dado que p27 participa directamente en la expresión génica de un importante número de proteínas, se puede hipotetizar que p27 interacciona directamente con el/los factor/es de transcripción asociado/s a la expresión de COX-2. Teniendo en cuenta los resultados de aterosclerosis temprana, RhoA/ROCK puede estar también participando en el control de la reactividad vascular y la formación de AAA dependiente de la fosforilación de p27. De hecho, estudios previos han demostrado que COX-2 promueve la actividad RhoA/ROCK, al menos en células de carcinoma de colon *in vitro* (Chang, 2006).

En su conjunto, este trabajo describe un importante papel de la fosforilación de p27-S10 en varios procesos patológicos del sistema vascular, como consecuencia de efectos sobre diversos procesos fisiopatológicos en distintas etapas de la enfermedad y en diferentes tipos celulares. En contexto de la aterosclerosis, los resultados presentados en este trabajo demuestran que la fosforilación de p27 en la S10 protege frente al desarrollo temprano de la placa limitando el reclutamiento leucocitario propio de los primeros estadios de la enfermedad por un mecanismo dependiente de RhoA/ROCK, lo que se suma a bien establecido papel antiproliferativo de p27 y a la regulación de la formación de células espumosas en fases más avanzadas de la enfermedad. Esta fosforilación limita también la respuesta vasoconstrictor frente a un estímulo vasoconstrictor y protege frente a la formación de AAA, controlando la expresión de COX-2 (**figura 47**). Basándonos en esto, consideramos que esta fosforilación podría ser una diana terapéutica muy interesante para prevenir el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica actuando en diferentes estadios de la enfermedad, así como para la prevención de otros eventos vasculares patológicos, como el AAA. De hecho, en los últimos años ha habido grandes esfuerzos por desarrollar inhibidores específicos de COX-2 con el objetivo de tratar gran número de enfermedades (Hawkey, 1999). Sin embargo, se ha visto que el bloqueo selectivo de esta enzima tiene importantes efectos negativos a nivel vascular, lo

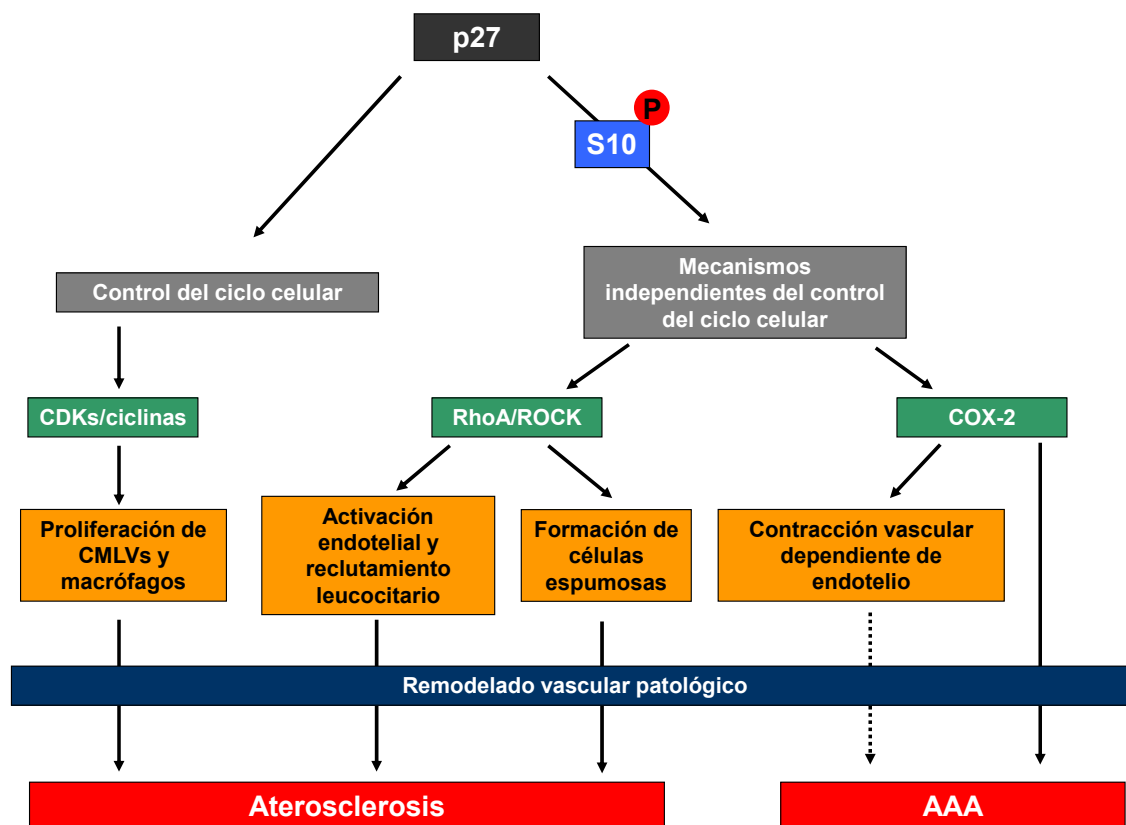


Figura 47. Papel de p27 en el remodelado vascular patológico.

que ha limitado enormemente el uso de estos agentes. Estos efectos adversos se han asociado generalmente al desequilibrio que provocan los inhibidores de COX-2 (como el rofecoxib o el celecoxib) en la producción de  $PGI_2$  y  $TXA_2$ , favoreciendo el efecto protrombótico de este último (Bing, 2002). El mantenimiento del estado fosforilado de p27 en la S10 podría ser una manera indirecta de regular la actividad COX-2 y prevenir la enfermedad cardiovascular, evitando los efectos adversos derivados de la inhibición directa de COX-2.

Cabe destacar que el remodelado vascular patológico se asocia con un descenso en la fosforilación de p27 en la S10 (Fuster, 2011). Por lo tanto, teniendo en cuenta que tanto la aterosclerosis como el desarrollo de AAA se agrava en ratones que expresan la forma de p27 no fosforilable en la S10, sería de enorme interés identificar las quinasas y/o fosfatasa responsables de la regulación de esta fosforilación, así como los estímulos que modulan su actividad, con el objetivo de desarrollar posibles estrategias terapéuticas.

Asimismo, los resultados mostrados invitan a investigar otras modificaciones postraduccionales de p27 en diversos escenarios fisiopatológicos, con el objetivo de dilucidar otras implicaciones funcionales de esta proteína.





**Conclusiones**





1. La hipercolesterolemia se asocia con la disminución de la fosforilación de p27 en la S10 en aorta y en células endoteliales de aorta de ratón.
2. La pérdida de la fosforilación de p27 en la S10 activa la vía RhoA/ROCK y aumenta la expresión de la molécula de adhesión VCAM-1 en células endoteliales de ratón, incrementa la adhesión y la extravasación leucocitaria y promueve el desarrollo de aterosclerosis temprana por un mecanismo dependiente de RhoA/ROCK.
3. La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 reduce los niveles citoplasmáticos de p27 en células endoteliales de aorta de ratón, sin afectar a su capacidad migratoria o proliferativa.
4. La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 incrementa la expresión y la actividad de COX-2 en células endoteliales y la producción arterial de TXA<sub>2</sub>.
5. La ausencia de fosforilación de p27 en la S10 incrementa la contractilidad vascular dependiente de endotelio en respuesta a fenilefrina como consecuencia de una sobreactivación de COX-2, sin modificar la presión arterial en ratones.
6. La fosforilación deficiente de p27 en S10 aumenta la expresión de metaloproteinasas en aorta de ratón y promueve la formación de AAA en ratones tratados con AngII por un mecanismo dependiente de la actividad de COX-2.



## **Bibliografía**



Ailawadi, G., Eliason, J.L., and Upchurch, G.R., Jr. (2003). Current concepts in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 38, 584-588.

Alon, R., Kassner, P.D., Carr, M.W., Finger, E.B., Hemler, M.E., and Springer, T.A. (1995). The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol* 128, 1243-1253.

Alwan, A. (2011). Global status report on noncommunicable diseases 2010. (World Health Organization).

Allain, C.C., Poon, L.S., Chan, C.S., Richmond, W., and Fu, P.C. (1974). Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 20, 470-475.

Anidjar, S., Dobrin, P.B., Eichorst, M., Graham, G.P., and Chejfec, G. (1992). Correlation of inflammatory infiltrate with the enlargement of experimental aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 16, 139-147.

Baldassarre, G., Belletti, B., Nicoloso, M.S., Schiappacassi, M., Vecchione, A., Spessotto, P., Morrione, A., Canzonieri, V., and Colombatti, A. (2005). p27(Kip1)-stathmin interaction influences sarcoma cell migration and invasion. *Cancer Cell* 7, 51-63.

Baliga, R.R., Nienaber, C.A., Bossone, E., Oh, J.K., Isselbacher, E.M., Sechtem, U., Fattori, R., Raman, S.V., and Eagle, K.A. (2014). The role of imaging in aortic dissection and related syndromes. *JACC Cardiovasc Imaging* 7, 406-424.

Balligand, J.L., Kelly, R.A., Marsden, P.A., Smith, T.W., and Michel, T. (1993). Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 347-351.

Banegas, J.R., Villara, F., Graciana, A., and F, R.-A. (2006). Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares en España. *Revista Española de Cardiología* 6.

Beltran, A.E., Briones, A.M., Garcia-Redondo, A.B., Rodriguez, C., Miguel, M., Alvarez, Y., Alonso, M.J., Martinez-Gonzalez, J., and Salaices, M. (2009). p38 MAPK contributes to angiotensin II-induced COX-2 expression in aortic fibroblasts from normotensive and hypertensive rats. *J Hypertens* 27, 142-154.

Berk, B.C. (2001). Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol Rev* 81, 999-1030.

Bertomeu, V., and Castillo-Castillo, J. (2008). Situación de la enfermedad cardiovascular en España. Del riesgo a la enfermedad. *Revista Española de Cardiología Suplementos* 8, 2E-9E.

Besson, A., Gurian-West, M., Chen, X., Kelly-Spratt, K.S., Kemp, C.J., and Roberts, J.M. (2006). A pathway in quiescent cells that controls p27Kip1 stability, subcellular localization, and tumor suppression. *Genes Dev* 20, 47-64.

Besson, A., Gurian-West, M., Schmidt, A., Hall, A., and Roberts, J.M. (2004). p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes Dev* 18, 862-876.

Bi, Y., Xu, K., Zhong, H., Qi, X., Zhang, Z., and Ni, Y. (2012). A novel in vivo rabbit model of abdominal aortic aneurysm induced by periarterial incubation of papain. *J Vasc Interv Radiol* 23, 1529-1536.

Binder, C.J., Chang, M.K., Shaw, P.X., Miller, Y.I., Hartvigsen, K., Dewan, A., and Witztum, J.L. (2002). Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med* 8, 1218-1226.

Bing, R.J., and Lomnicka, M. (2002). Why do cyclo-oxygenase-2 inhibitors cause cardiovascular events? *J Am Coll Cardiol* 39, 521-522.

Bloom, J., and Pagano, M. (2003). Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Semin Cancer Biol* 13, 41-47.

Boehm, M., Yoshimoto, T., Crook, M.F., Nallamshetty, S., True, A., Nabel, G.J., and Nabel, E.G. (2002). A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27(Kip1) and regulates cell cycle progression. *EMBO J* 21, 3390-3401.

Boulanger, C.M., Heymes, C., Benessiano, J., Geske, R.S., Levy, B.I., and Vanhoutte, P.M. (1998). Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. *Circ Res* 83, 1271-1278.

Brandes, R.P., Schmitz-Winnenthal, F.H., Feletou, M., Godecke, A., Huang, P.L., Vanhoutte, P.M., Fleming, I., and Busse, R. (2000). An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9747-9752.

Bredt, D.S., Hwang, P.M., Glatt, C.E., Lowenstein, C., Reed, R.R., and Snyder, S.H. (1991). Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351, 714-718.

Bredt, D.S., and Snyder, S.H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 682-685.

Bullard, D.C., Kunkel, E.J., Kubo, H., Hicks, M.J., Lorenzo, I., Doyle, N.A., Doerschuk, C.M., Ley, K., and Beaudet, A.L. (1996). Infectious susceptibility and

severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. *J Exp Med* 183, 2329-2336.

Burnett, S.H., Kershen, E.J., Zhang, J., Zeng, L., Straley, S.C., Kaplan, A.M., and Cohen, D.A. (2004). Conditional macrophage ablation in transgenic mice expressing a Fas-based suicide gene. *J Leukoc Biol* 75, 612-623.

Callejas, N.A., Casado, M., Diaz-Guerra, M.J., Bosca, L., and Martin-Sanz, P. (2001). Expression of cyclooxygenase-2 promotes the release of matrix metalloproteinase-2 and -9 in fetal rat hepatocytes. *Hepatology* 33, 860-867.

Camacho, M., Lopez-Belmonte, J., and Vila, L. (1998). Rate of vasoconstrictor prostanoids released by endothelial cells depends on cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I synthase activity. *Circ Res* 83, 353-365.

Carman, C.V., and Springer, T.A. (2004). A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol* 167, 377-388.

Carman, C.V., and Springer, T.A. (2008). Trans-cellular migration: cell-cell contacts get intimate. *Curr Opin Cell Biol* 20, 533-540.

Carnero, A., and Hannon, G.J. (1998). The INK4 family of CDK inhibitors. *Curr Top Microbiol Immunol* 227, 43-55.

Carrano, A.C., Eytan, E., Hershko, A., and Pagano, M. (1999). SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol* 1, 193-199.

Cassis, L.A., Gupte, M., Thayer, S., Zhang, X., Charnigo, R., Howatt, D.A., Rateri, D.L., and Daugherty, A. (2009). ANG II infusion promotes abdominal aortic aneurysms independent of increased blood pressure in hypercholesterolemic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296, H1660-1665.

Castro, C., Diez-Juan, A., Cortes, M.J., and Andres, V. (2003). Distinct regulation of mitogen-activated protein kinases and p27Kip1 in smooth muscle cells from different vascular beds. A potential role in establishing regional phenotypic variance. *J Biol Chem* 278, 4482-4490.

Caughey, G.E., Cleland, L.G., Penglis, P.S., Gamble, J.R., and James, M.J. (2001). Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2. *J Immunol* 167, 2831-2838.

Clapp, L.H., Turcato, S., Hall, S., and Baloch, M. (1998). Evidence that Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels play a major role in mediating the vascular effects of iloprost and cicaprost. *Eur J Pharmacol* 356, 215-224.

Coats, S., Flanagan, W.M., Nourse, J., and Roberts, J.M. (1996). Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science* 272, 877-880.

Connor, M.K., Kotchetkov, R., Cariou, S., Resch, A., Lupetti, R., Beniston, R.G., Melchior, F., Hengst, L., and Slingerland, J.M. (2003). CRM1/Ran-mediated nuclear export of p27(Kip1) involves a nuclear export signal and links p27 export and proteolysis. *Mol Biol Cell* 14, 201-213.

Corriu, C., Feletou, M., Canet, E., and Vanhoutte, P.M. (1996). Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of the guinea-pig. *Br J Pharmacol* 119, 959-964.

Corriu, C., Feletou, M., Edwards, G., Weston, A.H., and Vanhoutte, P.M. (2001). Differential effects of prostacyclin and iloprost in the isolated carotid artery of the guinea-pig. *Eur J Pharmacol* 426, 89-94.

Curci, J.A., Liao, S., Huffman, M.D., Shapiro, S.D., and Thompson, R.W. (1998). Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest* 102, 1900-1910.

Curtiss, L.K., and Boisvert, W.A. (2000). Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 11, 243-251.

Chan, C.C., Reid, C.M., Aw, T.J., Liew, D., Haas, S.J., and Krum, H. (2009). Do COX-2 inhibitors raise blood pressure more than nonselective NSAIDs and placebo? An updated meta-analysis. *J Hypertens* 27, 2332-2341.

Chang, Y.W., Marlin, J.W., Chance, T.W., and Jakobi, R. (2006). RhoA mediates cyclooxygenase-2 signaling to disrupt the formation of adherens junctions and increase cell motility. *Cancer Res* 66, 11700-11708.

Chataigneau, T., Feletou, M., Huang, P.L., Fishman, M.C., Duhault, J., and Vanhoutte, P.M. (1999). Acetylcholine-induced relaxation in blood vessels from endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *Br J Pharmacol* 126, 219-226.

Chen, D., Walsh, K., and Wang, J. (2000a). Regulation of cdk2 activity in endothelial cells that are inhibited from growth by cell contact. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 629-635.

Chen, F., Rao, J., and Studzinski, G.P. (2000b). Specific association of increased cyclin-dependent kinase 5 expression with monocytic lineage of differentiation of human leukemia HL60 cells. *J Leukoc Biol* 67, 559-566.

Cheng, Y., Austin, S.C., Rocca, B., Koller, B.H., Coffman, T.M., Grosser, T., Lawson, J.A., and FitzGerald, G.A. (2002). Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A<sub>2</sub>. *Science* 296, 539-541.



Chevre, R., Gonzalez-Granado, J.M., Megens, R.T., Sreeramkumar, V., Silvestre-Roig, C., Molina-Sanchez, P., Weber, C., Soehnlein, O., Hidalgo, A., and Andres, V. (2014). High-resolution imaging of intravascular atherogenic inflammation in live mice. *Circ Res* 114, 770-779.

Cho, D.H., Seo, J., Park, J.H., Jo, C., Choi, Y.J., Soh, J.W., and Jo, I. (2010). Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates endothelial nitric oxide synthase at serine 116. *Hypertension* 55, 345-352.

Chu, I., Sun, J., Arnaout, A., Kahn, H., Hanna, W., Narod, S., Sun, P., Tan, C.K., Hengst, L., and Slingerland, J. (2007). p27 phosphorylation by Src regulates inhibition of cyclin E-Cdk2. *Cell* 128, 281-294.

Daugherty, A., and Cassis, L.A. (2004). Mouse models of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 429-434.

Daugherty, A., Manning, M.W., and Cassis, L.A. (2000). Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest* 105, 1605-1612.

Deng, X., Mercer, S.E., Shah, S., Ewton, D.Z., and Friedman, E. (2004). The cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is stabilized in G(0) by Mirk/dyrk1B kinase. *J Biol Chem* 279, 22498-22504.

Diez-Juan, A., and Andres, V. (2001). The growth suppressor p27(Kip1) protects against diet-induced atherosclerosis. *Faseb J* 15, 1989-1995.

Diez-Juan, A., and Andres, V. (2003). Coordinate control of proliferation and migration by the p27Kip1/cyclin-dependent kinase/retinoblastoma pathway in vascular smooth muscle cells and fibroblasts. *Circ Res* 92, 402-410.

Diez-Juan, A., Perez, P., Aracil, M., Sancho, D., Bernad, A., Sanchez-Madrid, F., and Andres, V. (2004). Selective inactivation of p27(Kip1) in hematopoietic progenitor cells increases neointimal macrophage proliferation and accelerates atherosclerosis. *Blood* 103, 158-161.

Drexler, H.C., and Pebler, S. (2003). Inducible p27(Kip1) expression inhibits proliferation of K562 cells and protects against apoptosis induction by proteasome inhibitors. *Cell Death Differ* 10, 290-301.

Duffy, S.J., Tran, B.T., New, G., Tudball, R.N., Esler, M.D., Harper, R.W., and Meredith, I.T. (1998). Continuous release of vasodilator prostanoids contributes to regulation of resting forearm blood flow in humans. *Am J Physiol* 274, H1174-1183.

Duftner, C., Seiler, R., Dejaco, C., Chemelli-Steingruber, I., Schennach, H., Klotz, W., Rieger, M., Herold, M., Falkensammer, J., Fraedrich, G., *et al.* (2014).

Antiphospholipid antibodies predict progression of abdominal aortic aneurysms. *PLoS One* 9, e99302.

Egan, K.M., Lawson, J.A., Fries, S., Koller, B., Rader, D.J., Smyth, E.M., and Fitzgerald, G.A. (2004). COX-2-derived prostacyclin confers atheroprotection on female mice. *Science* 306, 1954-1957.

Ernst, C.B. (1993). Abdominal aortic aneurysm. *N Engl J Med* 328, 1167-1172.

Eskandari, M.K., Vjungco, J.D., Flores, A., Borensztajn, J., Shively, V., and Pearce, W.H. (2005). Enhanced abdominal aortic aneurysm in TIMP-1-deficient mice. *J Surg Res* 123, 289-293.

Eymin, B., Hagg, M., Droin, N., Sordet, O., Dimanche-Boitrel, M.T., and Solary, E. (1999a). p27Kip1 induces drug resistance by preventing apoptosis upstream of cytochrome c release and procaspase-3 activation in leukemic cells. *Oncogene* 18, 1411-1418.

Eymin, B., Sordet, O., Droin, N., Munsch, B., Hagg, M., Van de Craen, M., Vandenaabeele, P., and Solary, E. (1999b). Caspase-induced proteolysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 mediates its anti-apoptotic activity. *Oncogene* 18, 4839-4847.

Fang, L., Chang, H.M., Cheng, J.C., Leung, P.C., and Sun, Y.P. (2014). Nitric oxide and cGMP induce COX-2 expression and PGE2 production in human granulosa cells through CREB signaling pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 100, E262-269.

Feletou, M., Huang, Y., and Vanhoutte, P.M. (2011). Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol* 164, 894-912.

Feletou, M., Tang, E.H., and Vanhoutte, P.M. (2008). Nitric oxide the gatekeeper of endothelial vasomotor control. *Front Biosci* 13, 4198-4217.

Feletou, M., Verbeuren, T.J., and Vanhoutte, P.M. (2009). Endothelium-dependent contractions in SHR: a tale of prostanoid TP and IP receptors. *Br J Pharmacol* 156, 563-574.

Fero, M.L., Randel, E., Gurley, K.E., Roberts, J.M., and Kemp, C.J. (1998). The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature* 396, 177-180.

Fero, M.L., Rivkin, M., Tasch, M., Porter, P., Carow, C.E., Firpo, E., Polyak, K., Tsai, L.H., Broudy, V., Perlmutter, R.M., *et al.* (1996). A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* 85, 733-744.

Finn, A.V., Nakano, M., Narula, J., Kolodgie, F.D., and Virmani, R. (2010). Concept of vulnerable/unstable plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 1282-1292.

FitzGerald, G.A. (2003). COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nat Rev Drug Discov* 2, 879-890.

Florenes, V.A., Maelandsmo, G.M., Kerbel, R.S., Slingerland, J.M., Nesland, J.M., and Holm, R. (1998). Protein expression of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 in malignant melanoma: inverse correlation with disease-free survival. *Am J Pathol* 153, 305-312.

Forsdahl, S.H., Singh, K., Solberg, S., and Jacobsen, B.K. (2009). Risk factors for abdominal aortic aneurysms: a 7-year prospective study: the Tromso Study, 1994-2001. *Circulation* 119, 2202-2208.

Foudi, N., Louedec, L., Cachina, T., Brink, C., and Norel, X. (2009). Selective cyclooxygenase-2 inhibition directly increases human vascular reactivity to norepinephrine during acute inflammation. *Cardiovasc Res* 81, 269-277.

Freestone, T., Turner, R.J., Coady, A., Higman, D.J., Greenhalgh, R.M., and Powell, J.T. (1995). Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15, 1145-1151.

Fujita, N., Sato, S., Katayama, K., and Tsuruo, T. (2002). Akt-dependent phosphorylation of p27Kip1 promotes binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *J Biol Chem* 277, 28706-28713.

Fujita, N., Sato, S., and Tsuruo, T. (2003). Phosphorylation of p27Kip1 at threonine 198 by p90 ribosomal protein S6 kinases promotes its binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *J Biol Chem* 278, 49254-49260.

Funk, C.D., and FitzGerald, G.A. (2007). COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. *J Cardiovasc Pharmacol* 50, 470-479.

Furchgott, R.F., and Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.

Fuster, J.J., Fernandez, P., Gonzalez-Navarro, H., Silvestre, C., Nabah, Y.N., and Andres, V. (2010). Control of cell proliferation in atherosclerosis: insights from animal models and human studies. *Cardiovasc Res* 86, 254-264.

Fuster, J.J., Gonzalez-Navarro, H., Vinue, A., Molina-Sanchez, P., Andres-Manzano, M.J., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Diez-Juan, A., Bernad, A., Rodriguez, C., *et al.* (2011). Deficient p27 phosphorylation at serine 10 increases macrophage foam cell formation and aggravates atherosclerosis through a

proliferation-independent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 2455-2463.

Galis, Z.S., and Khatri, J.J. (2002). Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 90, 251-262.

Galis, Z.S., Sukhova, G.K., Lark, M.W., and Libby, P. (1994). Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 94, 2493-2503.

Gargiulo, M., Stella, A., Spina, M., Faggioli, G., Cenacchi, G., Degani, A., Guiducci, G., Tonelli, M., Bertoni, F., and D'Addato, M. (1993). Content and turnover of extracellular matrix protein in human "nonspecific" and inflammatory abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Surg* 7, 546-553.

Geraci, M.W., Gao, B., Shepherd, D.C., Moore, M.D., Westcott, J.Y., Fagan, K.A., Alger, L.A., Tuder, R.M., and Voelkel, N.F. (1999). Pulmonary prostacyclin synthase overexpression in transgenic mice protects against development of hypoxic pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 103, 1509-1515.

Getz, G.S., and Reardon, C.A. (2012). Animal models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, 1104-1115.

Ghoshal, S., and Loftin, C.D. (2012). Cyclooxygenase-2 inhibition attenuates abdominal aortic aneurysm progression in hyperlipidemic mice. *PLoS One* 7, e44369.

Glass, C.K., and Witztum, J.L. (2001). Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104, 503-516.

Gluais, P., Lonchamp, M., Morrow, J.D., Vanhoutte, P.M., and Feletou, M. (2005). Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. *Br J Pharmacol* 146, 834-845.

Gomez, E., Schwendemann, C., Roger, S., Simonet, S., Paysant, J., Courchay, C., Verbeuren, T.J., and Feletou, M. (2008). Aging and prostacyclin responses in aorta and platelets from WKY and SHR rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295, H2198-2211.

Gonzalez, C., Barroso, C., Martin, C., Gulbenkian, S., and Estrada, C. (1997). Neuronal nitric oxide synthase activation by vasoactive intestinal peptide in bovine cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 17, 977-984.

Goodall, S., Crowther, M., Hemingway, D.M., Bell, P.R., and Thompson, M.M. (2001). Ubiquitous elevation of matrix metalloproteinase-2 expression in the vasculature of patients with abdominal aneurysms. *Circulation* 104, 304-309.

Goukassian, D., Diez-Juan, A., Asahara, T., Schratzberger, P., Silver, M., Murayama, T., Isner, J.M., and Andres, V. (2001). Overexpression of p27(Kip1) by doxycycline-regulated adenoviral vectors inhibits endothelial cell proliferation and migration and impairs angiogenesis. *Faseb J* 15, 1877-1885.

Grandel, U., Fink, L., Blum, A., Heep, M., Buerke, M., Kraemer, H.J., Mayer, K., Bohle, R.M., Seeger, W., Grimminger, F., *et al.* (2000). Endotoxin-induced myocardial tumor necrosis factor-alpha synthesis depresses contractility of isolated rat hearts: evidence for a role of sphingosine and cyclooxygenase-2-derived thromboxane production. *Circulation* 102, 2758-2764.

Grimmler, M., Wang, Y., Mund, T., Cilensek, Z., Keidel, E.M., Waddell, M.B., Jakel, H., Kullmann, M., Kriwacki, R.W., and Hengst, L. (2007). Cdk-inhibitory activity and stability of p27Kip1 are directly regulated by oncogenic tyrosine kinases. *Cell* 128, 269-280.

Gui, P., Labrousse, A., Van Goethem, E., Besson, A., Maridonneau-Parini, I., and Le Cabec, V. (2014). Rho/ROCK pathway inhibition by the CDK inhibitor p27(kip1) participates in the onset of macrophage 3D-mesenchymal migration. *J Cell Sci* 127, 4009-4023.

Hamberg, M., Svensson, J., and Samuelsson, B. (1975). Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 2994-2998.

Hansson, G.K. (2005). Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352, 1685-1695.

Harbour, J.W., and Dean, D.C. (2000). Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol* 2, E65-67.

Hata, A.N., and Breyer, R.M. (2004). Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther* 103, 147-166.

Haug, E.S., Skomsvoll, J.F., Jacobsen, G., Halvorsen, T.B., Saether, O.D., and Myhre, H.O. (2003). Inflammatory aortic aneurysm is associated with increased incidence of autoimmune disease. *J Vasc Surg* 38, 492-497.

Hawkey, C.J. (1999). COX-2 inhibitors. *Lancet* 353, 307-314.

Helliwell, R.J., Adams, L.F., and Mitchell, M.D. (2004). Prostaglandin synthases: recent developments and a novel hypothesis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70, 101-113.

Hirata, T., Merrill-Skoloff, G., Aab, M., Yang, J., Furie, B.C., and Furie, B. (2000). P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is a physiological ligand for E-selectin in mediating T helper 1 lymphocyte migration. *J Exp Med* 192, 1669-1676.

Ho, A., and Dowdy, S.F. (2002). Regulation of G(1) cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev* 12, 47-52.

Hofmann, F., Feil, R., Kleppisch, T., and Schlossmann, J. (2006). Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev* 86, 1-23.

Holmes, D.R., Wester, W., Thompson, R.W., and Reilly, J.M. (1997). Prostaglandin E2 synthesis and cyclooxygenase expression in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 25, 810-815.

Hood, J.D., and Cheresh, D.A. (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2, 91-100.

Hoshina, K., Sho, E., Sho, M., Nakahashi, T.K., and Dalman, R.L. (2003). Wall shear stress and strain modulate experimental aneurysm cellularity. *J Vasc Surg* 37, 1067-1074.

Hsu, Y.H., Chang, C.C., Yang, N.J., Lee, Y.H., and Juan, S.H. (2014). RhoA-mediated inhibition of vascular endothelial cell mobility: positive feedback through reduced cytosolic p21 and p27. *J Cell Physiol* 229, 1455-1465.

Huang, P.L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K.D., Moskowitz, M.A., Bevan, J.A., and Fishman, M.C. (1995). Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377, 239-242.

Hunt, T., Nasmyth, K., and Novak, B. (2011). The cell cycle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366, 3494-3497.

Irizarry, E., Newman, K.M., Gandhi, R.H., Nackman, G.B., Halpern, V., Wishner, S., Scholes, J.V., and Tilson, M.D. (1993). Demonstration of interstitial collagenase in abdominal aortic aneurysm disease. *J Surg Res* 54, 571-574.

Ishida, N., Hara, T., Kamura, T., Yoshida, M., Nakayama, K., and Nakayama, K.I. (2002). Phosphorylation of p27Kip1 on serine 10 is required for its binding to CRM1 and nuclear export. *J Biol Chem* 277, 14355-14358.

Ishida, N., Kitagawa, M., Hatakeyama, S., and Nakayama, K. (2000). Phosphorylation at serine 10, a major phosphorylation site of p27(Kip1), increases its protein stability. *J Biol Chem* 275, 25146-25154.

Jeziorska, M., and Woolley, D.E. (1999). Local neovascularization and cellular composition within vulnerable regions of atherosclerotic plaques of human carotid arteries. *J Pathol* 188, 189-196.

Johnsen, S.H., Forsdahl, S.H., Singh, K., and Jacobsen, B.K. (2010). Atherosclerosis in abdominal aortic aneurysms: a causal event or a process running in parallel? The Tromso study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 1263-1268.

Johnston, K.W., Rutherford, R.B., Tilson, M.D., Shah, D.M., Hollier, L., and Stanley, J.C. (1991). Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. Subcommittee on Reporting Standards for Arterial Aneurysms, Ad Hoc Committee on Reporting Standards, Society for Vascular Surgery and North American Chapter, International Society for Cardiovascular Surgery. *J Vasc Surg* 13, 452-458.

Joshi, B., Strugnell, S.S., Goetz, J.G., Kojic, L.D., Cox, M.E., Griffith, O.L., Chan, S.K., Jones, S.J., Leung, S.P., Masoudi, H., *et al.* (2008). Phosphorylated caveolin-1 regulates Rho/ROCK-dependent focal adhesion dynamics and tumor cell migration and invasion. *Cancer Res* 68, 8210-8220.

Juvonen, J., Surcel, H.M., Satta, J., Teppo, A.M., Bloigu, A., Syrjala, H., Airaksinen, J., Leinonen, M., Saikku, P., and Juvonen, T. (1997). Elevated circulating levels of inflammatory cytokines in patients with abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 2843-2847.

Kanda, T., Hayashi, K., Wakino, S., Homma, K., Yoshioka, K., Hasegawa, K., Sugano, N., Tatematsu, S., Takamatsu, I., Mitsuhashi, T., *et al.* (2005). Role of Rho-kinase and p27 in angiotensin II-induced vascular injury. *Hypertension* 45, 724-729.

Kawanami, D., Matoba, K., Okada, R., Tsukamoto, M., Kinoshita, J., Ishizawa, S., Kanazawa, Y., Yokota, T., and Utsunomiya, K. (2013). Fasudil inhibits ER stress-induced VCAM-1 expression by modulating unfolded protein response in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 435, 171-175.

Kawauchi, T., Chihama, K., Nabeshima, Y., and Hoshino, M. (2006). Cdk5 phosphorylates and stabilizes p27kip1 contributing to actin organization and cortical neuronal migration. *Nat Cell Biol* 8, 17-26.

Kawka, D.W., Ouellet, M., Hetu, P.O., Singer, II, and Riendeau, D. (2007). Double-label expression studies of prostacyclin synthase, thromboxane synthase

and COX isoforms in normal aortic endothelium. *Biochim Biophys Acta* 1771, 45-54.

King, V.L., Trivedi, D.B., Gitlin, J.M., and Loftin, C.D. (2006). Selective cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib decreases angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1137-1143.

Kiyokawa, H., Kineman, R.D., Manova-Todorova, K.O., Soares, V.C., Hoffman, E.S., Ono, M., Khanam, D., Hayday, A.C., Frohman, L.A., and Koff, A. (1996). Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell* 85, 721-732.

Kobayashi, T., Tahara, Y., Matsumoto, M., Iguchi, M., Sano, H., Murayama, T., Arai, H., Oida, H., Yurugi-Kobayashi, T., Yamashita, J.K., *et al.* (2004). Roles of thromboxane A(2) and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* 114, 784-794.

Koch, A.E., Haines, G.K., Rizzo, R.J., Radosevich, J.A., Pope, R.M., Robinson, P.G., and Pearce, W.H. (1990). Human abdominal aortic aneurysms. Immunophenotypic analysis suggesting an immune-mediated response. *Am J Pathol* 137, 1199-1213.

Koller, A., Sun, D., and Kaley, G. (1993). Role of shear stress and endothelial prostaglandins in flow- and viscosity-induced dilation of arterioles in vitro. *Circ Res* 72, 1276-1284.

Kossatz, U., Dietrich, N., Zender, L., Buer, J., Manns, M.P., and Malek, N.P. (2004). Skp2-dependent degradation of p27kip1 is essential for cell cycle progression. *Genes Dev* 18, 2602-2607.

Kotake, Y., Nakayama, K., Ishida, N., and Nakayama, K.I. (2005). Role of serine 10 phosphorylation in p27 stabilization revealed by analysis of p27 knock-in mice harboring a serine 10 mutation. *J Biol Chem* 280, 1095-1102.

Kudo, I., and Murakami, M. (2005). Prostaglandin E synthase, a terminal enzyme for prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biochem Mol Biol* 38, 633-638.

Kunkel, E.J., and Ley, K. (1996). Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo. *Circ Res* 79, 1196-1204.

Labib, K., and De Piccoli, G. (2011). Surviving chromosome replication: the many roles of the S-phase checkpoint pathway. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366, 3554-3561.



Legler, D.F., Bruckner, M., Uetz-von Allmen, E., and Krause, P. (2010). Prostaglandin E2 at new glance: novel insights in functional diversity offer therapeutic chances. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 198-201.

Ley, K., and Huo, Y. (2001). VCAM-1 is critical in atherosclerosis. *J Clin Invest* 107, 1209-1210.

Ley, K., and Reutershan, J. (2006). Leucocyte-endothelial interactions in health and disease. *Handb Exp Pharmacol*, 97-133.

Li, A.C., and Glass, C.K. (2002). The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med* 8, 1235-1242.

Li, P.L., Zou, A.P., and Campbell, W.B. (1997). Regulation of potassium channels in coronary arterial smooth muscle by endothelium-derived vasodilators. *Hypertension* 29, 262-267.

Liang, J., Shao, S.H., Xu, Z.X., Hennessy, B., Ding, Z., Larrea, M., Kondo, S., Dumont, D.J., Gutterman, J.U., Walker, C.L., *et al.* (2007). The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol* 9, 218-224.

Liang, J., Zubovitz, J., Petrocelli, T., Kotchetkov, R., Connor, M.K., Han, K., Lee, J.H., Ciarallo, S., Catzavelos, C., Beniston, R., *et al.* (2002). PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 8, 1153-1160.

Libby, P., Ridker, P.M., and Maseri, A. (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105, 1135-1143.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.

Lopez-Candales, A., Holmes, D.R., Liao, S., Scott, M.J., Wickline, S.A., and Thompson, R.W. (1997). Decreased vascular smooth muscle cell density in medial degeneration of human abdominal aortic aneurysms. *Am J Pathol* 150, 993-1007.

Lyons, C.R., Orloff, G.J., and Cunningham, J.M. (1992). Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem* 267, 6370-6374.

Malumbres, M. (2005). Revisiting the "Cdk-centric" view of the mammalian cell cycle. *Cell Cycle* 4, 206-210.

Malumbres, M. (2011). Physiological relevance of cell cycle kinases. *Physiol Rev* 91, 973-1007.

Mallat, Z., Gojova, A., Sauzeau, V., Brun, V., Silvestre, J.S., Esposito, B., Merval, R., Groux, H., Loirand, G., and Tedgui, A. (2003). Rho-associated protein kinase contributes to early atherosclerotic lesion formation in mice. *Circ Res* 93, 884-888.

Mallat, Z., Hugel, B., Ohan, J., Leseche, G., Freyssinet, J.M., and Tedgui, A. (1999). Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 99, 348-353.

Mao, D., Lee, J.K., VanVickle, S.J., and Thompson, R.W. (1999). Expression of collagenase-3 (MMP-13) in human abdominal aortic aneurysms and vascular smooth muscle cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 261, 904-910.

Mathers, C.D., and Loncar, D. (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 3, e442.

Matouk, C.C., and Marsden, P.A. (2008). Epigenetic regulation of vascular endothelial gene expression. *Circ Res* 102, 873-887.

McAllister, S.S., Becker-Hapak, M., Pintucci, G., Pagano, M., and Dowdy, S.F. (2003). Novel p27(kip1) C-terminal scatter domain mediates Rac-dependent cell migration independent of cell cycle arrest functions. *Mol Cell Biol* 23, 216-228.

McMillan, W.D., and Pearce, W.H. (1999). Increased plasma levels of metalloproteinase-9 are associated with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 29, 122-127; discussion 127-129.

Meeking, D.R., Browne, D.L., Allard, S., Munday, J., Chowienczyk, P.J., Shaw, K.M., and Cummings, M.H. (2000). Effects of cyclo-oxygenase inhibition on vasodilatory response to acetylcholine in patients with type 1 diabetes and nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 23, 1840-1843.

Mestas, J., and Ley, K. (2008). Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 18, 228-232.

Miralles, M., Wester, W., Sicard, G.A., Thompson, R., and Reilly, J.M. (1999). Indomethacin inhibits expansion of experimental aortic aneurysms via inhibition of the cox2 isoform of cyclooxygenase. *J Vasc Surg* 29, 884-892; discussion 892-883.

Moeller, S.J., Head, E.D., and Sheaff, R.J. (2003). p27Kip1 inhibition of GRB2-SOS formation can regulate Ras activation. *Mol Cell Biol* 23, 3735-3752.

Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., and Vane, J.R. (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263, 663-665.

Moncada, S., Herman, A.G., Higgs, E.A., and Vane, J.R. (1977). Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI<sub>2</sub>) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb Res* 11, 323-344.

Moncada, S., and Vane, J.R. (1978). Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub>, and prostacyclin. *Pharmacol Rev* 30, 293-331.

Morgan, D.O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 261-291.

Morinelli, T.A., Walker, L.P., and Ullian, M.E. (2008). COX-2 expression stimulated by Angiotensin II depends upon AT1 receptor internalization in vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1783, 1048-1054.

Moulton, K.S., Vakili, K., Zurakowski, D., Soliman, M., Butterfield, C., Sylvan, E., Lo, K.M., Gillies, S., Javaherian, K., and Folkman, J. (2003). Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4736-4741.

Mulvany, M.J., and Halpern, W. (1976). Mechanical properties of vascular smooth muscle cells in situ. *Nature* 260, 617-619.

Muller, W.A. (2003). Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol* 24, 327-334.

Murakami, M., Nakatani, Y., Tanioka, T., and Kudo, I. (2002). Prostaglandin E synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69, 383-399.

Murata, T., Ushikubi, F., Matsuoka, T., Hirata, M., Yamasaki, A., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Aze, Y., Tanaka, T., Yoshida, N., *et al.* (1997). Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature* 388, 678-682.

Musacchio, A. (2011). Spindle assembly checkpoint: the third decade. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366, 3595-3604.

Nacci, C., Tarquinio, M., De Benedictis, L., Mauro, A., Zigrino, A., Carratu, M.R., Quon, M.J., and Montagnani, M. (2009). Endothelial dysfunction in mice with streptozotocin-induced type 1 diabetes is opposed by compensatory overexpression of cyclooxygenase-2 in the vasculature. *Endocrinology* 150, 849-861.

Nacusi, L.P., and Sheaff, R.J. (2006). Akt1 sequentially phosphorylates p27kip1 within a conserved but non-canonical region. *Cell Div* 1, 11.

Nakahata, N. (2008). Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther* 118, 18-35.

Nakayama, K., Ishida, N., Shirane, M., Inomata, A., Inoue, T., Shishido, N., Horii, I., Loh, D.Y., and Nakayama, K. (1996). Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 85, 707-720.

Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y.A., Miyake, S., Ishida, N., Hatakeyama, S., Kitagawa, M., Iemura, S., Natsume, T., and Nakayama, K.I. (2004). Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. *Dev Cell* 6, 661-672.

Nallamshetty, S., Crook, M., Boehm, M., Yoshimoto, T., Olive, M., and Nabel, E.G. (2005). The cell cycle regulator p27Kip1 interacts with MCM7, a DNA replication licensing factor, to inhibit initiation of DNA replication. *FEBS Lett* 579, 6529-6536.

Narumiya, S., Sugimoto, Y., and Ushikubi, F. (1999). Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 79, 1193-1226.

Newcomb, E.W., Sosnow, M., Demopoulos, R.I., Zeleniuch-Jacquotte, A., Sorich, J., and Speyer, J.L. (1999). Expression of the cell cycle inhibitor p27KIP1 is a new prognostic marker associated with survival in epithelial ovarian tumors. *Am J Pathol* 154, 119-125.

Newman, K.M., Ogata, Y., Malon, A.M., Irizarry, E., Gandhi, R.H., Nagase, H., and Tilson, M.D. (1994). Identification of matrix metalloproteinases 3 (stromelysin-1) and 9 (gelatinase B) in abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb* 14, 1315-1320.

Nishijo, N., Sugiyama, F., Kimoto, K., Taniguchi, K., Murakami, K., Suzuki, S., Fukamizu, A., and Yagami, K. (1998). Salt-sensitive aortic aneurysm and rupture in hypertensive transgenic mice that overproduce angiotensin II. *Lab Invest* 78, 1059-1066.

Nitti, D., Belluco, C., Mammano, E., Marchet, A., Ambrosi, A., Mencarelli, R., Segato, P., and Lise, M. (2002). Low level of p27(Kip1) protein expression in gastric adenocarcinoma is associated with disease progression and poor outcome. *J Surg Oncol* 81, 167-175; discussion 175-166.

Norata, G.D., Callegari, E., Inoue, H., and Catapano, A.L. (2004). HDL3 induces cyclooxygenase-2 expression and prostacyclin release in human endothelial cells

via a p38 MAPK/CRE-dependent pathway: effects on COX-2/PGI-synthase coupling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 871-877.

Nordon, I., Brar, R., Taylor, J., Hinchliffe, R., Loftus, I.M., and Thompson, M.M. (2009). Evidence from cross-sectional imaging indicates abdominal but not thoracic aortic aneurysms are local manifestations of a systemic dilating diathesis. *J Vasc Surg* 50, 171-176 e171.

Norman, K.E., Moore, K.L., McEver, R.P., and Ley, K. (1995). Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood* 86, 4417-4421.

Norman, P.E., and Powell, J.T. (2007). Abdominal aortic aneurysm: the prognosis in women is worse than in men. *Circulation* 115, 2865-2869.

Norman, P.E., and Powell, J.T. (2010). Site specificity of aneurysmal disease. *Circulation* 121, 560-568.

O'Farrell, P.H. (2001). Triggering the all-or-nothing switch into mitosis. *Trends Cell Biol* 11, 512-519.

Ohashi, Y., Kawashima, S., Hirata, K., Yamashita, T., Ishida, T., Inoue, N., Sakoda, T., Kurihara, H., Yazaki, Y., and Yokoyama, M. (1998). Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 102, 2061-2071.

Ohnaka, K., Numaguchi, K., Yamakawa, T., and Inagami, T. (2000). Induction of cyclooxygenase-2 by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 35, 68-75.

Olschewski, A., Li, Y., Tang, B., Hanze, J., Eul, B., Bohle, R.M., Wilhelm, J., Morty, R.E., Brau, M.E., Weir, E.K., *et al.* (2006). Impact of TASK-1 in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 98, 1072-1080.

OpenStax-College (2013). *Anatomy & Physiology*

Orie, N.N., Fry, C.H., and Clapp, L.H. (2006). Evidence that inward rectifier K<sup>+</sup> channels mediate relaxation by the PGI<sub>2</sub> receptor agonist cicaprost via a cyclic AMP-independent mechanism. *Cardiovasc Res* 69, 107-115.

Pan, M.R., Chuang, L.Y., and Hung, W.C. (2001). Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit matrix metalloproteinase-2 expression via repression of transcription in lung cancer cells. *FEBS Lett* 508, 365-368.

Papapetropoulos, A., Desai, K.M., Rudic, R.D., Mayer, B., Zhang, R., Ruiz-Torres, M.P., Garcia-Cardena, G., Madri, J.A., and Sessa, W.C. (1997). Nitric

oxide synthase inhibitors attenuate transforming-growth-factor-beta 1-stimulated capillary organization in vitro. *Am J Pathol* 150, 1835-1844.

Papapetropoulos, A., Rudic, R.D., and Sessa, W.C. (1999). Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 43, 509-520.

Park, J.Y., Pillinger, M.H., and Abramson, S.B. (2006). Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin Immunol* 119, 229-240.

Parkington, H.C., Coleman, H.A., and Tare, M. (2004). Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization. *Pharmacol Res* 49, 509-514.

Pasinetti, G.M., and Aisen, P.S. (1998). Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neuroscience* 87, 319-324.

Pasterkamp, G., de Kleijn, D.P., and Borst, C. (2000). Arterial remodeling in atherosclerosis, restenosis and after alteration of blood flow: potential mechanisms and clinical implications. *Cardiovasc Res* 45, 843-852.

Pasterkamp, G., Galis, Z.S., and de Kleijn, D.P. (2004). Expansive arterial remodeling: location, location, location. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 650-657.

Paulsson, G., Zhou, X., Tornquist, E., and Hansson, G.K. (2000). Oligoclonal T cell expansions in atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 10-17.

Pearce, W.H., Sweis, I., Yao, J.S., McCarthy, W.J., and Koch, A.E. (1992). Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha release in normal and diseased human infrarenal aortas. *J Vasc Surg* 16, 784-789.

Peters, S.L., and Michel, M.C. (2007). The RhoA/Rho kinase pathway in the myocardium. *Cardiovasc Res* 75, 3-4.

Pippa, R., Espinosa, L., Gundem, G., Garcia-Escudero, R., Dominguez, A., Orlando, S., Gallastegui, E., Saiz, C., Besson, A., Pujol, M.J., *et al.* (2012). p27Kip1 represses transcription by direct interaction with p130/E2F4 at the promoters of target genes. *Oncogene* 31, 4207-4220.

Piqueras, L., Kubes, P., Alvarez, A., O'Connor, E., Issekutz, A.C., Esplugues, J.V., and Sanz, M.J. (2000). Angiotensin II induces leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via AT(1) and AT(2) receptor-mediated P-selectin upregulation. *Circulation* 102, 2118-2123.

Plump, A.S., Smith, J.D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J.G., Rubin, E.M., and Breslow, J.L. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71, 343-353.

Pollock, J.S., Forstermann, U., Mitchell, J.A., Warner, T.D., Schmidt, H.H., Nakane, M., and Murad, F. (1991). Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10480-10484.

Pyo, R., Lee, J.K., Shipley, J.M., Curci, J.A., Mao, D., Ziporin, S.J., Ennis, T.L., Shapiro, S.D., Senior, R.M., and Thompson, R.W. (2000). Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest* 105, 1641-1649.

Radomski, M.W., Palmer, R.M., and Moncada, S. (1987a). Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol* 92, 181-187.

Radomski, M.W., Palmer, R.M., and Moncada, S. (1987b). The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 148, 1482-1489.

Raghavan, M.L., Kratzberg, J., Castro de Tolosa, E.M., Hanaoka, M.M., Walker, P., and da Silva, E.S. (2006). Regional distribution of wall thickness and failure properties of human abdominal aortic aneurysm. *J Biomech* 39, 3010-3016.

Rajakariar, R., Yaqoob, M.M., and Gilroy, D.W. (2006). COX-2 in inflammation and resolution. *Mol Interv* 6, 199-207.

Ratz, P.H., Berg, K.M., Urban, N.H., and Miner, A.S. (2005). Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, C769-783.

Reddick, R.L., Zhang, S.H., and Maeda, N. (1994). Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Thromb* 14, 141-147.

Reed, D., Reed, C., Stemmermann, G., and Hayashi, T. (1992). Are aortic aneurysms caused by atherosclerosis? *Circulation* 85, 205-211.

Reed, S.I. (2003). Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 855-864.

Rivard, N., L'Allemain, G., Bartek, J., and Pouyssegur, J. (1996). Abrogation of p27Kip1 by cDNA antisense suppresses quiescence (G0 state) in fibroblasts. *J Biol Chem* 271, 18337-18341.

Rodier, G., Montagnoli, A., Di Marcotullio, L., Coulombe, P., Draetta, G.F., Pagano, M., and Meloche, S. (2001). p27 cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation on Ser10 and is not a prerequisite for its proteolysis. *EMBO J* 20, 6672-6682.

Rohde, L.E., Arroyo, L.H., Rifai, N., Creager, M.A., Libby, P., Ridker, P.M., and Lee, R.T. (1999). Plasma concentrations of interleukin-6 and abdominal aortic diameter among subjects without aortic dilatation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 1695-1699.

Ross, R. (1999). Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 138, S419-420.

Rush, C., Nyara, M., Moxon, J.V., Trollope, A., Cullen, B., and Golledge, J. (2009). Whole genome expression analysis within the angiotensin II-apolipoprotein E deficient mouse model of abdominal aortic aneurysm. *BMC Genomics* 10, 298.

Russo, A.A., Jeffrey, P.D., Patten, A.K., Massague, J., and Pavletich, N.P. (1996). Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* 382, 325-331.

Saito, S., Zempo, N., Yamashita, A., Takenaka, H., Fujioka, K., and Esato, K. (2002). Matrix metalloproteinase expressions in arteriosclerotic aneurysmal disease. *Vasc Endovascular Surg* 36, 1-7.

Sans, M., Panes, J., Ardite, E., Elizalde, J.I., Arce, Y., Elena, M., Palacin, A., Fernandez-Checa, J.C., Anderson, D.C., Lobb, R., *et al.* (1999). VCAM-1 and ICAM-1 mediate leukocyte-endothelial cell adhesion in rat experimental colitis. *Gastroenterology* 116, 874-883.

Santamaria, D., and Ortega, S. (2006). Cyclins and CDKS in development and cancer: lessons from genetically modified mice. *Front Biosci* 11, 1164-1188.

Sanz-Gonzalez, S.M., Melero-Fernandez de Mera, R., Malek, N.P., and Andres, V. (2006). Atheroma development in apolipoprotein E-null mice is not regulated by phosphorylation of p27(Kip1) on threonine 187. *J Cell Biochem* 97, 735-743.

Sase, K., and Michel, T. (1995). Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. *Life Sci* 57, 2049-2055.

Schaper, W., and Ito, W.D. (1996). Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ Res* 79, 911-919.

Seibert, K., and Masferrer, J.L. (1994). Role of inducible cyclooxygenase (COX-2) in inflammation. *Receptor* 4, 17-23.



Seibold, S., Schurle, D., Heinloth, A., Wolf, G., Wagner, M., and Galle, J. (2004). Oxidized LDL induces proliferation and hypertrophy in human umbilical vein endothelial cells via regulation of p27Kip1 expression: role of RhoA. *J Am Soc Nephrol* 15, 3026-3034.

Sekimoto, T., Fukumoto, M., and Yoneda, Y. (2004). 14-3-3 suppresses the nuclear localization of threonine 157-phosphorylated p27(Kip1). *EMBO J* 23, 1934-1942.

Sessa, W.C., Harrison, J.K., Barber, C.M., Zeng, D., Durieux, M.E., D'Angelo, D.D., Lynch, K.R., and Peach, M.J. (1992). Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 267, 15274-15276.

Seye, C.I., Yu, N., Gonzalez, F.A., Erb, L., and Weisman, G.A. (2004). The P2Y2 nucleotide receptor mediates vascular cell adhesion molecule-1 expression through interaction with VEGF receptor-2 (KDR/Flk-1). *J Biol Chem* 279, 35679-35686.

Shah, A.M. (2000). Inducible nitric oxide synthase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 45, 148-155.

Shah, P.K., and Galis, Z.S. (2001). Matrix metalloproteinase hypothesis of plaque rupture: players keep piling up but questions remain. *Circulation* 104, 1878-1880.

Shen, R.F., and Tai, H.H. (1998). Thromboxanes: synthase and receptors. *J Biomed Sci* 5, 153-172.

Shimokawa, H., Morishige, K., Miyata, K., Kandabashi, T., Eto, Y., Ikegaki, I., Asano, T., Kaibuchi, K., and Takeshita, A. (2001). Long-term inhibition of Rho-kinase induces a regression of arteriosclerotic coronary lesions in a porcine model in vivo. *Cardiovasc Res* 51, 169-177.

Shin, I., Yakes, F.M., Rojo, F., Shin, N.Y., Bakin, A.V., Baselga, J., and Arteaga, C.L. (2002). PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* 8, 1145-1152.

Shiokoshi, T., Ohsaki, Y., Kawabe, J., Fujino, T., and Kikuchi, K. (2002). Downregulation of nitric oxide accumulation by cyclooxygenase-2 induction and thromboxane A2 production in interleukin-1beta-stimulated rat aortic smooth muscle cells. *J Hypertens* 20, 455-461.

Silence, J., Collen, D., and Lijnen, H.R. (2002). Reduced atherosclerotic plaque but enhanced aneurysm formation in mice with inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene. *Circ Res* 90, 897-903.

Silence, J., Lupu, F., Collen, D., and Lijnen, H.R. (2001). Persistence of atherosclerotic plaque but reduced aneurysm formation in mice with stromelysin-1 (MMP-3) gene inactivation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 1440-1445.

Skalen, K., Gustafsson, M., Rydberg, E.K., Hulten, L.M., Wiklund, O., Innerarity, T.L., and Boren, J. (2002). Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* 417, 750-754.

Smith, J.D., Trogan, E., Ginsberg, M., Grigaux, C., Tian, J., and Miyata, M. (1995). Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8264-8268.

Smyth, E.M., and FitzGerald, G.A. (2002). Human prostacyclin receptor. *Vitam Horm* 65, 149-165.

Sparks, M.A., Makhanova, N.A., Griffiths, R.C., Snouwaert, J.N., Koller, B.H., and Coffman, T.M. (2013). Thromboxane receptors in smooth muscle promote hypertension, vascular remodeling, and sudden death. *Hypertension* 61, 166-173.

Sugimoto, Y., and Narumiya, S. (2007). Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem* 282, 11613-11617.

Sugiyama, Y., Tomoda, K., Tanaka, T., Arata, Y., Yoneda-Kato, N., and Kato, J. (2001). Direct binding of the signal-transducing adaptor Grb2 facilitates down-regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. *J Biol Chem* 276, 12084-12090.

Sun, D., Huang, A., Smith, C.J., Stackpole, C.J., Connetta, J.A., Shesely, E.G., Koller, A., and Kaley, G. (1999). Enhanced release of prostaglandins contributes to flow-induced arteriolar dilation in eNOS knockout mice. *Circ Res* 85, 288-293.

Sun, J., Marx, S.O., Chen, H.J., Poon, M., Marks, A.R., and Rabbani, L.E. (2001). Role for p27(Kip1) in Vascular Smooth Muscle Cell Migration. *Circulation* 103, 2967-2972.

Surks, H.K. (2007). cGMP-dependent protein kinase I and smooth muscle relaxation: a tale of two isoforms. *Circ Res* 101, 1078-1080.

Szekanecz, Z., Shah, M.R., Pearce, W.H., and Koch, A.E. (1994). Human atherosclerotic abdominal aortic aneurysms produce interleukin (IL)-6 and interferon-gamma but not IL-2 and IL-4: the possible role for IL-6 and interferon-gamma in vascular inflammation. *Agents Actions* 42, 159-162.

Taba, Y., Sasaguri, T., Miyagi, M., Abumiya, T., Miwa, Y., Ikeda, T., and Mitsumata, M. (2000). Fluid shear stress induces lipocalin-type prostaglandin D(2) synthase expression in vascular endothelial cells. *Circ Res* 86, 967-973.

Tall, A.R., Jiang, X., Luo, Y., and Silver, D. (2000). 1999 George Lyman Duff memorial lecture: lipid transfer proteins, HDL metabolism, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1185-1188.

Tanaka, A., Hasegawa, T., Chen, Z., Okita, Y., and Okada, K. (2009). A novel rat model of abdominal aortic aneurysm using a combination of intraluminal elastase infusion and extraluminal calcium chloride exposure. *J Vasc Surg* 50, 1423-1432.

Tang, E.H., and Vanhoutte, P.M. (2008). Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. *Physiol Genomics* 32, 409-418.

Tanner, F.C., Boehm, M., Akyurek, L.M., San, H., Yang, Z.Y., Tashiro, J., Nabel, G.J., and Nabel, E.G. (2000). Differential effects of the cyclin-dependent kinase inhibitors p27(Kip1), p21(Cip1), and p16(INK4) on vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* 101, 2022-2025.

Teismann, P., Vila, M., Choi, D.K., Tieu, K., Wu, D.C., Jackson-Lewis, V., and Przedborski, S. (2003). COX-2 and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991, 272-277.

Thompson, R.W., Holmes, D.R., Mertens, R.A., Liao, S., Botney, M.D., Mecham, R.P., Welgus, H.G., and Parks, W.C. (1995). Production and localization of 92-kilodalton gelatinase in abdominal aortic aneurysms. An elastolytic metalloproteinase expressed by aneurysm-infiltrating macrophages. *J Clin Invest* 96, 318-326.

Thornton, B., and Basu, C. (2011). Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochem Mol Biol Educ* 39, 145-154.

Tilson, M.D. (1992). Aortic aneurysms and atherosclerosis. *Circulation* 85, 378-379.

Todaka, T., Yokoyama, C., Yanamoto, H., Hashimoto, N., Nagata, I., Tsukahara, T., Hara, S., Hatae, T., Morishita, R., Aoki, M., *et al.* (1999). Gene transfer of human prostacyclin synthase prevents neointimal formation after carotid balloon injury in rats. *Stroke* 30, 419-426.

Tomoda, K., Kubota, Y., and Kato, J. (1999). Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature* 398, 160-165.

Torrecillas, G., Diez-Marques, M.L., Garcia-Escribano, C., Bosch, R.J., Rodriguez-Puyol, D., and Rodriguez-Puyol, M. (2000). Mechanisms of cGMP-

dependent mesangial-cell relaxation: a role for myosin light-chain phosphatase activation. *Biochem J* 346 Pt 1, 217-222.

Toschi, V., Gallo, R., Lettino, M., Fallon, J.T., Gertz, S.D., Fernandez-Ortiz, A., Chesebro, J.H., Badimon, L., Nemerson, Y., Fuster, V., *et al.* (1997). Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 95, 594-599.

Touyz, R.M. (2005). Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Exp Physiol* 90, 449-455.

Toyoshima, H., and Hunter, T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78, 67-74.

Vardulaki, K.A., Walker, N.M., Day, N.E., Duffy, S.W., Ashton, H.A., and Scott, R.A. (2000). Quantifying the risks of hypertension, age, sex and smoking in patients with abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg* 87, 195-200.

Versari, D., Daghini, E., Viridis, A., Ghiadoni, L., and Taddei, S. (2009). Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. *Br J Pharmacol* 157, 527-536.

Vessieres, E., Belin de Chantemele, E.J., Guihot, A.L., Jardel, A., Toutain, B., Loufrani, L., and Henrion, D. (2013). Cyclooxygenase-2-derived prostanoids reduce inward arterial remodeling induced by blood flow reduction in old obese Zucker rat mesenteric arteries. *Vascul Pharmacol* 58, 356-362.

Vidal, A., and Koff, A. (2000). Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 247, 1-15.

Viglietto, G., Motti, M.L., Bruni, P., Melillo, R.M., D'Alessio, A., Califano, D., Vinci, F., Chiappetta, G., Tschlis, P., Bellacosa, A., *et al.* (2002). Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med* 8, 1136-1144.

Virmani, R., Narula, J., and Farb, A. (1998). When neoangiogenesis ricochets. *Am Heart J* 136, 937-939.

Wang, H.W., Liu, P.Y., Oyama, N., Rikitake, Y., Kitamoto, S., Gitlin, J., Liao, J.K., and Boisvert, W.A. (2008a). Deficiency of ROCK1 in bone marrow-derived cells protects against atherosclerosis in LDLR<sup>-/-</sup> mice. *Faseb J* 22, 3561-3570.

Wang, L.H., and Kulmacz, R.J. (2002). Thromboxane synthase: structure and function of protein and gene. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69, 409-422.

Wang, M., Lee, E., Song, W., Ricciotti, E., Rader, D.J., Lawson, J.A., Pure, E., and FitzGerald, G.A. (2008b). Microsomal prostaglandin E synthase-1 deletion suppresses oxidative stress and angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation* 117, 1302-1309.

Ward, M.R., Pasterkamp, G., Yeung, A.C., and Borst, C. (2000). Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications. *Circulation* 102, 1186-1191.

Watanabe, K. (2002). Prostaglandin F synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69, 401-407.

Worthylake, R.A., and Burridge, K. (2003). RhoA and ROCK promote migration by limiting membrane protrusions. *J Biol Chem* 278, 13578-13584.

Wu, K.K., and Liou, J.Y. (2005). Cellular and molecular biology of prostacyclin synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 45-52.

Wu, M.H., Shi, Q., Bhattacharya, V., and Sauvage, L.R. (2001). Development of a symmetric canine abdominal aortic aneurysm model with clinical relevance for endovascular graft studies. *J Invest Surg* 14, 235-239.

Xiao, C.Y., Hara, A., Yuhki, K., Fujino, T., Ma, H., Okada, Y., Takahata, O., Yamada, T., Murata, T., Narumiya, S., *et al.* (2001). Roles of prostaglandin I(2) and thromboxane A(2) in cardiac ischemia-reperfusion injury: a study using mice lacking their respective receptors. *Circulation* 104, 2210-2215.

Xu, C., Zarins, C.K., and Glagov, S. (2001). Aneurysmal and occlusive atherosclerosis of the human abdominal aorta. *J Vasc Surg* 33, 91-96.

Yang, R.M., Naitoh, J., Murphy, M., Wang, H.J., Phillipson, J., deKernion, J.B., Loda, M., and Reiter, R.E. (1998). Low p27 expression predicts poor disease-free survival in patients with prostate cancer. *J Urol* 159, 941-945.

Yasui, Y., Amano, M., Nagata, K., Inagaki, N., Nakamura, H., Saya, H., Kaibuchi, K., and Inagaki, M. (1998). Roles of Rho-associated kinase in cytokinesis; mutations in Rho-associated kinase phosphorylation sites impair cytokinetic segregation of glial filaments. *J Cell Biol* 143, 1249-1258.

Yu, Y., Ricciotti, E., Scalia, R., Tang, S.Y., Grant, G., Yu, Z., Landesberg, G., Crichton, I., Wu, W., Pure, E., *et al.* (2012). Vascular COX-2 modulates blood pressure and thrombosis in mice. *Sci Transl Med* 4, 132ra154.

Yui, Y., Hattori, R., Kosuga, K., Eizawa, H., Hiki, K., and Kawai, C. (1991). Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. *J Biol Chem* 266, 12544-12547.

Zalewski, A., Shi, Y., and Johnson, A.G. (2002). Diverse origin of intimal cells: smooth muscle cells, myofibroblasts, fibroblasts, and beyond? *Circ Res* 91, 652-655.

Zatina, M.A., Zarins, C.K., Gewertz, B.L., and Glagov, S. (1984). Role of medial lamellar architecture in the pathogenesis of aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 1, 442-448.

Zhang, S.H., Reddick, R.L., Piedrahita, J.A., and Maeda, N. (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258, 468-471.

Zhou, Q., and Liao, J.K. (2009). Rho kinase: an important mediator of atherosclerosis and vascular disease. *Curr Pharm Des* 15, 3108-3115.

Zygmunt, P.M., Plane, F., Paulsson, M., Garland, C.J., and Hogestatt, E.D. (1998). Interactions between endothelium-derived relaxing factors in the rat hepatic artery: focus on regulation of EDHF. *Br J Pharmacol* 124, 992-1000.

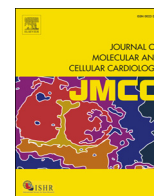












## Original article

## Loss of p27 phosphorylation at Ser10 accelerates early atherogenesis by promoting leukocyte recruitment via RhoA/ROCK

P. Molina-Sánchez<sup>1</sup>, R. Chèvre<sup>1</sup>, C. Rius, J.J. Fuster<sup>2</sup>, V. Andrés<sup>\*</sup>

Laboratory of Molecular and Genetic Cardiovascular Pathophysiology, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC), Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 19 September 2014

Received in revised form 23 March 2015

Accepted 14 April 2015

Available online 20 April 2015

## Keywords:

Atherosclerosis

Endothelial cell

Leukocyte recruitment

p27

RhoA

## ABSTRACT

Reduced phosphorylation of the tumor suppressor p27<sup>Kip1</sup> (p27) at serine 10 (Ser10) is a hallmark of advanced human and mouse atherosclerosis. Apolipoprotein E-null mice defective for this posttranslational modification (apoE<sup>-/-</sup>p27Ser10Ala) exhibited increased atherosclerosis burden at late disease states. Here, we investigated the regulation of p27 phosphorylation in Ser10 at the very initial stages of atherosclerosis and its impact on endothelial-leukocyte interaction and early plaque formation. Hypercholesterolemia in fat-fed apoE<sup>-/-</sup> mice is associated with a rapid downregulation of p27-phospho-Ser10 in primary endothelial cells (ECs) and in aorta prior to the development of macroscopically-visible lesions. We find that lack of p27 phosphorylation at Ser10 enhances the expression of adhesion molecules in aorta of apoE<sup>-/-</sup> mice and ECs, and augments endothelial-leukocyte interactions and leukocyte recruitment *in vivo*. These effects correlated with increased RhoA/Rho-associated coiled-coil containing protein kinase (ROCK) signaling in ECs, and inhibition of this pathway with fasudil reduced leukocyte-EC interactions to control levels in the microvasculature of p27Ser10Ala mice. Moreover, apoE<sup>-/-</sup>p27Ser10Ala mice displayed increased leukocyte recruitment and homing to atherosusceptible arteries and augmented early plaque development, which could be blunted with fasudil. In conclusion, our studies demonstrate a very rapid reduction in p27-phospho-Ser10 levels at the onset of atherogenesis, which contributes to early plaque build-up through RhoA/ROCK-induced integrin expression in ECs and enhanced leukocyte recruitment.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Atherosclerosis and associated ischemic events are the leading cause of morbidity and mortality in Western societies and are predicted to soon become the leading health problem worldwide [1]. Several

cardiovascular risk factors have been identified (dyslipidemia, hypertension, diabetes, smoking, aging, sedentary life style, etc.), which promote a chronic inflammatory state that leads to dysfunction of the endothelial cell (EC) monolayer lining the inner arterial surface [2]. One of the earliest manifestations of atherosclerosis is the expression of adhesion molecules by ECs, which triggers the recruitment of circulating leukocytes that normally do not interact with the 'healthy' vessel wall [3–9]. Leukocytes are considered important mediators of all phases of atherosclerosis, from the initiation and progression of asymptomatic lesions to the establishment of complex vulnerable plaques that can rupture and provoke acute ischemic events. Luminal recruitment appears to be the central route of leukocyte infiltration in the subendothelial space during early atherosclerosis since at these stages no *vasa vasora* can be detected, contrary to their reported abundance in late-stage atheromata [10]. Leukocytes roll and adhere to the endothelium to finally extravasate, and monocytes (the predominant leukocyte subset recruited in the damaged vessel wall) differentiate into macrophages that critically contribute to plaque development by secreting an array of inflammatory mediators [3–9].

Studies in animals and humans have identified excessive neointimal cell proliferation as a characteristic of atherosclerosis; consequently, regulation of hyperplastic growth of neointimal cells by tumor suppressors has emerged as a prominent mechanism regulating plaque

**Abbreviations:** apoE<sup>-/-</sup>, apolipoprotein E-null; apoE<sup>-/-</sup>p27Ser10Ala, apolipoprotein E-null p27 Serine-10-Alanine; BM, bone marrow; CKI, cyclin-dependent kinase inhibitor; DMEM, Dulbecco's modified eagle medium; EC(s), endothelial cell(s); ECGS, endothelial cell growth supplement; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; ERM, ezrin/radixin/moesin; E-Sel, E-selectin; FBS, fetal bovine serum; GFP, green fluorescent protein; HBSS, Hank's Balanced Salt Solution; HFD, high fat diet; HRP, horseradish peroxidase; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; IV, intravenous; L-Sel, L-selectin; mAECs, mouse aorta endothelial cells; Mafia, Macrophage Fas-Induced Apoptosis; P-Sel, P-selectin; p27, p27<sup>Kip1</sup>; p27-phospho-Ser-10, p27 phosphorylation at serine 10; p27Ser10Ala, p27 serine-10-alanine; PBS, phosphate buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; qPCR, quantitative real-time PCR; ROCK, Rho-associated coiled-coil containing protein kinase; Ser10, serine 10; SDS, sodium dodecyl sulfate; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1.

<sup>\*</sup> Corresponding author at: Laboratory of Molecular and Genetic Cardiovascular Pathophysiology, CNIC, Melchor Fernández Almagro 3, 28029 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 453 12 00x1502; fax: +34 91 453 12 65.

E-mail address: [vandres@cnic.es](mailto:vandres@cnic.es) (V. Andrés).

<sup>1</sup> Authors with equal contribution.

<sup>2</sup> Current address: Whitaker Cardiovascular Institute, Boston University School of Medicine, Boston, USA.

development [11]. The oncosuppressor p27<sup>Kip1</sup> (p27) is a cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) that attenuates the proliferation of both vascular smooth muscle cells and macrophages, and also neointimal thickening in animal models of vasculoproliferative disease [11–16]. Interestingly, a micro-RNA-based strategy has been recently developed to selectively inhibit vascular smooth muscle cell hyperplasia while preserving EC proliferation and function, which attenuates restenosis post-angioplasty but allows complete reendothelialization [17].

Compelling evidence has emerged supporting a role for p27 beyond cell cycle control, including modulation of actin cytoskeleton, cell motility, and gene transcription [18–22]. A number of important functional aspects of p27 are regulated through its phosphorylation status [23–31]. We recently reported that sparse phosphorylation of p27 at serine 10 (p27-phospho-Ser10), the most common post-translational modification of p27 [23], is a hallmark of mouse and human atherosclerosis [32]. Moreover, apolipoprotein E-null mice defective for this post-translational modification (apoE<sup>-/-</sup>p27Ser10Ala) did not show alterations in neointimal cell proliferation, yet they had an increased atherosclerosis burden at advanced disease states, at least in part due to increased macrophage foam cell formation [32].

Since p27-phospho-Ser10 is involved in neointimal thickening by modulating proliferation-independent processes, we hypothesized that it could also promote EC dysregulation, which is thought to initiate and sustain atherosclerosis development [2,5–7]. To address this issue, we have used complementary approaches with primary ECs and genetically-engineered mice. Our results demonstrate that loss of p27-phospho-Ser10 occurs rapidly in fat-fed apoE<sup>-/-</sup> mice and promotes VCAM-1 expression in ECs and leukocyte adhesion *in vivo*. Further, this defect also stimulates the formation of incipient atherosclerotic lesions through activation of the RhoA/Rho-associated coiled-coil containing protein kinase (ROCK) pathway.

## 2. Material and methods

### 2.1. Mice and diets

apoE<sup>-/-</sup>p27Ser10Ala mice were generated by crossing non-phosphorylatable p27Ser10Ala knock-in mice [30] with apoE<sup>-/-</sup> mice (The Jackson laboratory, Madison, WI). Macrophage Fas-Induced Apoptosis (Mafia)-apoE<sup>-/-</sup> mice [3] were generated by crossing Mafia transgenic mice [33] (which express GFP in the myeloid lineage) with apoE<sup>-/-</sup> mice. Mafia apoE<sup>-/-</sup>p27Ser10Ala mice were generated by crossing Mafia-apoE<sup>-/-</sup> mice with apoE<sup>-/-</sup>p27Ser10Ala mice. All mice were on C57BL/6 background. Mice were maintained on a low-fat standard diet (2.8% fat; Panlab, Barcelona, Spain). For studies of diet-induced atherosclerosis, mice were placed on atherogenic high-fat diet (HFD) (10.8% total fat, 0.75% cholesterol, S4892-E010, Ssniff, Germany) for the indicated periods of time. *In vivo* studies were performed with 3-month-old mice. Care of animals was in accordance with institutional guidelines and regulations.

### 2.2. Blood and serum collection and cholesterol analysis

Mouse blood was extracted by submandibular puncture as described [34]. To obtain serum, 100  $\mu$ l of blood was collected in polypropylene tubes, the blood was allowed to clot by leaving it undisturbed at room temperature for 30 min, and the clot was removed by centrifugation at 2000  $\times$ g for 15 min at 4 °C. The serum was recovered and stored at –80 °C until analyzed. Total and free cholesterol levels were measured using the automated analyzer Dimension RxL Max Clinical System (Siemens) in serum from mice which were starved overnight.

### 2.3. Mouse anesthesia and euthanasia

For intravital microscopy experiments (see below), mice were anesthetized with a mixture of ketamine and medetomidine (50 mg/kg and

0.5 mg/kg, respectively; intraperitoneal injection). Mice were euthanized by carbon dioxide inhalation.

### 2.4. Isolation and culture of mouse aorta endothelial cells (mAECs)

mAECs from p27Ser10Ala mice and wild-type counterparts (both on C57BL/6 background) were isolated as described [35]. Briefly, 8 mice (8 weeks of age) were culled and aortas were rapidly harvested. After removing adipose tissue and adventitia layer, aortas were cut into 1 mm rings. Aortic rings were placed in gelatin (0.5%) pre-coated plates and incubated in mAEC medium: DMEM:F12 (Lonza) containing 1% of penicillin/streptomycin, L-glutamine, 10 mM HEPES, Fungizone, 10% fetal bovine serum (FBS), 0.1 mg/ml of heparin (Sigma-Aldrich) and 50  $\mu$ g/ml of endothelial cell growth supplement (ECGS, BD). After 7–12 days, mAECs were selected with CD102 antibody (Purified Rat Anti-Mouse CD102-ICAM-2 Monoclonal Antibody, BD Pharmingen) and with a secondary antibody linked to magnetic beads (Dynabeads Sheep anti-Rat IgG, Invitrogen) using a magnetic platform (DynaMag-15 Magnet, Life Technologies). These cells (passage 0) were expanded in gelatin-coated plates containing mAEC medium. All cells used for assays were between passages 4 and 7.

### 2.5. Isolation of bone marrow (BM) cells

BM cells were harvested from apoE<sup>-/-</sup>, apoE<sup>-/-</sup>p27Ser10Ala and Mafia-apoE<sup>-/-</sup> mice as described [36]. Briefly, femurs and tibiae were obtained from mice after carefully removing the surrounding skeletal muscle and fat tissue. Both ends of each bone were trimmed to expose the interior and the BM was flushed with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) containing 2 mM EDTA using a 1-ml insulin syringe with a 27 G needle. The collected BM was disaggregated by pipetting and red blood cells were eliminated by 5 min incubation with cold lysis buffer (KH<sub>4</sub>Cl 0.15 M, KHCO<sub>3</sub> 0.01 M, EDTA.N<sub>2</sub> 0.01 M, pH 7.4). After washing with PBS, BM nucleated cells were kept on ice until used.

### 2.6. Leukocyte adhesion in cremasteric vessels

Mice were anesthetized and the cremaster muscle was dissected free of surrounding tissues and exteriorized onto an optical clear viewing pedestal. The muscle was cut longitudinally with a cautery and held extended at the corners of the exposed tissue using surgical suture. To maintain the correct temperature and physiological conditions, the muscle was perfused continuously with warmed Tyrode's buffer. Four hours before surgery, animals were injected with 100  $\mu$ l of TNF $\alpha$  (0.5  $\mu$ g in 0.3 ml saline) to promote leukocyte–endothelial cell interactions. The cremasteric microcirculation was then observed using a Leica DM6000-FS intravital microscopy with an Apo 40 $\times$  NA 1.0 water-immersion objective equipped with a DFC350-FX camera. LAS-AF software was employed for acquisition and image processing. Five randomly-selected arterioles were analyzed per mouse, and leukocyte adhesion was measured in 150- $\mu$ m vessel segments for 5 min. When indicated, IgG isotype control (AB-108-C, R&D Systems) or polyclonal anti-VCAM-1 antibodies (sc-1504, Santa Cruz Biotechnology) were injected intravenously prior to intravital microscopy (100  $\mu$ g/mouse).

### 2.7. Intravital imaging of carotid artery and rolling

Mice were anesthetized, the neck was shaved, and animals were immobilized in decubitus position. The right carotid artery was exposed and carefully dissected from the surrounding tissues [37] to perform intravital imaging as described [3]. In brief, sutures were used to maintain the salivary gland and adjacent muscles away from the artery, and the right vague nerve was carefully separated from the artery. Throughout the procedure, warm saline was applied to the tissues. The carotid artery was stabilized and placed under the water-dipping objective of an epifluorescence microscope with constant perfusion with warm

saline buffer. Images were captured with an Apo 63 × NA 0.9 water-immersion objective in cy3 channel. For analysis, luminal cells of the carotid artery were labeled by intravenous (IV) injection of 50 µg of rhodamine 6G (Sigma), and the number of rolling cells was determined by counting the number of rhodamine-positive leukocytes crossing an imaginary line perpendicular to the vessel during at least 30 s. Several fields (typically 3–4) were imaged from the carotid artery, and each data point represents one field. Although the appearance of plaques in the carotid artery is heterogeneous, for visualization we chose areas from the carotid bifurcation, which is prone to plaque development. Data were normalized to the number of rolling cells per 1000 frames.

### 2.8. In vivo leukocyte homing

To study leukocyte homing into the aorta, apoE<sup>-/-</sup>p27Ser10Ala mice and apoE<sup>-/-</sup> counterparts were injected twice for two days (IV) with five million nucleated BM cells (in a 200 µl volume) from Mafia-apoE<sup>-/-</sup> mice, to allow detection of GFP-positive myeloid leukocytes (e.g. neutrophils and monocytes). After 48 h, the mice were killed, the aortic tissue was perfused in situ with PBS, harvested and immediately frozen. GFP expression in aortas was analyzed by quantitative real-time PCR.

### 2.9. Atherosclerosis studies

For the quantification of atherosclerosis burden of aortic sinus, the mice were sacrificed and the heart was harvested after in situ perfusion with PBS. The hearts were fixed overnight with 4% paraformaldehyde/PBS at 4 °C. An operator blinded to genotype quantified the extent of atherosclerosis by computer-assisted morphometric analysis (ImageJ, National Institutes of Health) of hematoxylin/eosin-stained cross-sections of heart tissue, as described [38].

For quantification of infiltrated myeloid cells, Mafia-apoE<sup>-/-</sup>p27Ser10Ala mice and Mafia-apoE<sup>-/-</sup> counterparts were used, allowing the detection of GFP-positive myeloid cells (e.g. neutrophils, monocytes and macrophages). The mice were killed, and the aortic tissue was perfused carefully in situ with PBS, harvested and immediately frozen. VCAM-1 and GFP expression was by quantitative real-time PCR (qPCR).

Macrophage detection in atheromata of aortic sinus was performed by F4/80 immunostaining. After deparaffinization, antigen retrieval and blocking of non-specific interactions (5% horse serum in PBS, 45 min), histological sections were incubated overnight at 4 °C with anti-F4/80-Alexa Fluor 488 antibody (1/500, MCA497A488-AbD, Serotec). Cell nuclei were stained with DAPI (Invitrogen). Slides were mounted with Slow-Fade Gold Antifade reagent (S36936, Invitrogen) and images were acquired on a Leica TCS/SP2 confocal microscope with a 40× oil immersion objective.

### 2.10. Fasudil administration

Animals were treated orally with a dose of 40 mg/kg/day of fasudil dissolved in drinking water. In the leukocyte-adhesion experiments in cremasteric arterioles and in the leukocyte homing assay in aorta, fasudil was administered daily, starting 4 days prior to surgery or sacrifice, respectively. For atherosclerosis studies, fasudil treatment started 4 days before putting the mice on HFD and continued for 28 days.

### 2.11. Gene expression analysis by quantitative real-time PCR (qPCR)

RNA from mouse aortic tissue or mAECs was obtained using TRIzol Reagent (Invitrogen). RNA (0.5–1 µg) was retrotranscribed and amplified, respectively, with Superscript III First Strand Synthesis Supermix (Invitrogen) and Power Syber Green PCR Master Mix

(Applied Biosystems). The following primers (Forward: Fw; Reverse: Rv) were used (5′ → 3′ sequences):

Selp\_Fw GGTATCCGAAAGATCAACAATAAGTG  
 Selp\_Rv GTTACTCTTGATGTAGATCTCCACACA  
 Sell\_Fw AAACGAAAGGCAGCTCTCTG  
 Sell\_Rv CCCGTAATACCCTGCATCAC  
 Icam1\_Fw GGACCACGGAGCCAATTTCT  
 Icam1\_Rv CTCGGAGACATTAGAGAACAAATGC  
 Vcam1\_Fw GACCTGTTCAGCGAGGGTCTA  
 Vcam1\_Rv CTTCATCCTCATAGCAATTAAGGTG  
 E-GFP\_Fw CCAGGAGCGACCATCTTCTT  
 E-GFP\_Rv GTAGTGGTTGTCGGGCAGCAG  
 Gapdh\_Fw TGTGTCCGTCGTGGATCTGA  
 Gapdh\_Rv CCTGCTTACCACCTTCTTGAT  
 Hprt1\_Fw CCTAAGATGAGCGCAAGTTGAA  
 Hprt1\_Rv CCACAGGACTAGAACACCTGTAA  
 36b4\_Fw ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG  
 36b4\_Rv TCCCACCTTGCTCCAGTCT

Reactions were run on an ABI Prism 7500 Fast thermal cycler and results were analyzed with SDS 2.3 software (Applied Biosystems). Gene expression in both genotypes was normalized to the expression of the housekeeping genes *Hprt1*, *36b4* and *Gapdh* using Qbase software (Biogazelle).

### 2.12. Western blot analysis

Proteins from cultured mAECs and mouse aorta were extracted in an ice-cold lysis buffer containing 50 mM Tris·Cl, pH 7.2, 1% (w/v) Triton X-100, 0.1% (w/v) SDS, 500 mM NaCl and 10 mM MgCl<sub>2</sub>, supplemented with phosphatase and protease inhibitors (Roche). Polyacrylamide gel-electrophoresis and western blot analysis of whole cell extracts prepared in lysis buffer were performed as reported [39] and detection of proteins was carried out with the following antibodies: anti-p27 (610242) from BD Transduction Laboratories; anti-α-tubulin (sc-8035), anti-α-actin (sc-32251), anti-β-actin (sc-130657), and anti-VCAM-1 (sc-1504) from Santa Cruz Biotechnology; anti-ERM (3142) and anti-phospho-ERM (3149) from Cell Signaling Technology; anti-mCD54 ICAM (BE0020-1) and anti-CD62P P-selectin (clone RB40.34) from BioXcell and anti-p27-phospho-S10 (ab62364) from Abcam. HRP-conjugated secondary antibodies were from Santa Cruz Biotechnology. Immunocomplexes were detected with Luminata Forte Western HRP substrate (Millipore).

For the preparation of cytoplasmic lysates, mAECs were incubated for 15 min in ice-cold buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5% Triton X-100, 137.5 mM NaCl, 10% Glycerol, 1 mM sodium vanadate, 50 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, 5 mM EDTA, and protease inhibitors (1 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin). Lysates were centrifuged at 3000 rpm for 5 min, and the supernatant was stored at −80 °C until western blot analysis.

### 2.13. Flow cytometry analysis

White blood cells were stained for Mac-1 (CD11b-APC (M1/70), TOMBO Biosciences), VLA-4 (CD49d-biotin (PS/2)/Streptavidin-APC, in-house and eBioscience, respectively), L-selectin, and PSGL1 (CD62L-APC (MEL-14) and PSGL1-PE (2PH1), respectively, both from BD Biosciences). Mafia-p27Ser10Ala apoE<sup>-/-</sup> mice and Mafia-apoE<sup>-/-</sup> counterparts were used to discriminate GFP+ myeloid cells and GFP− lymphocytes. The anti-Ly6G antibody (clone 1A8, BioXcell) was used to discriminate GFP+ Ly6G+ neutrophils and GFP+ Ly6G− monocytes. The anti-Ly-6G antibody was labeled using DyLight 405 Antibody Labeling Kit (ThermoScientific). Cytometric analyses were performed using a FACS Canto flow cytometer equipped with DIVA software (BD Biosciences). Data were analyzed with FlowJo

software (Ashland, OR). Experiments were conducted at the CNIC-Cellomics Unit. White blood cell populations in mice were analyzed using the Abacus junior 30 system (Diatron Group).

2.14. Statistical analysis

Data are presented as mean ± SEM. In experiments comparing two groups, statistical significance was evaluated using unpaired Student's t-test. For multigroup comparisons, a two-way ANOVA with Bonferroni's post-hoc test was performed. The GraphPad Prism 5 software was used for all statistical analyses. P values below 0.05 were deemed significant.

3. Results

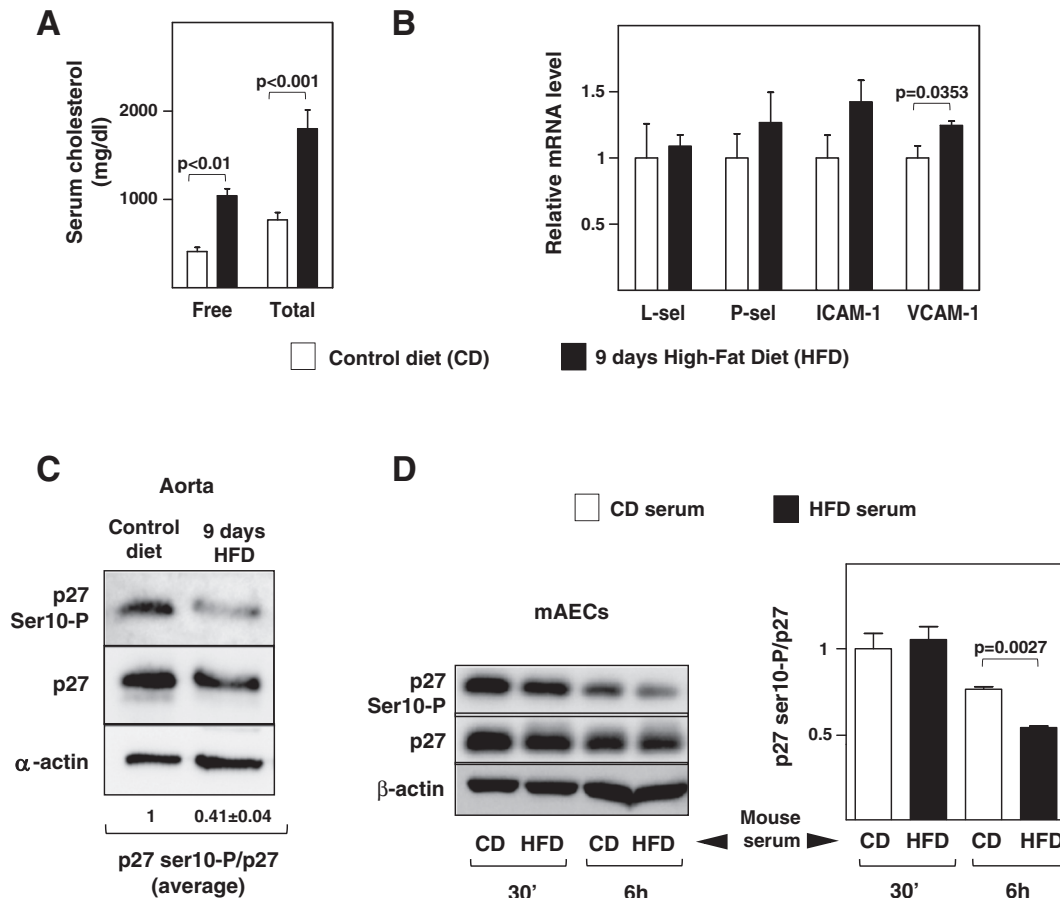
3.1. Diet-induced hypercholesterolemia causes a rapid loss of p27 phosphorylation at Ser10 in ECs and aorta that precedes atheroma formation

It is well established that dyslipidemia causes endothelial dysfunction/activation, triggering the very first steps of atherogenesis [2,5–7]. To examine whether hypercholesterolemia influences the phosphorylation status of p27 at Ser10, we challenged apoE<sup>-/-</sup> mice with a high-fat diet (HFD) for a very short period (9 days). Under these conditions, fat-fed apoE<sup>-/-</sup> mice developed hypercholesterolemia (Fig. 1A) but, similar to control mice fed standard chow, they did not present grossly visible atheromata (data not shown). Consistent with the absence of atherosclerotic

plaques, qPCR analysis did not reveal changes in the expression of the leukocyte-specific L-selectin in aorta of control and fat-fed apoE<sup>-/-</sup> mice (Fig. 1B). Likewise, expression of adhesion molecules associated with endothelial activation was unchanged when comparing aorta from control and fat-fed mice, with the only exception of VCAM-1 (P = 0.0353, Fig. 1B). Notably, short term exposure of apoE<sup>-/-</sup> mice to HFD caused a marked loss of p27 phosphorylation at Ser10 in the aortic arch, as revealed by western blotting using anti-p27-phospho-Ser10 (Fig. 1C). In agreement with this result, primary mAECs treated with serum from mice fed HFD for 4 days showed a significant reduction of p27 phosphorylation compared with cells treated with control serum (Fig. 1D). Of note, both free and total cholesterol levels in serum of mice fed HFD for 4 and 9 days were undistinguishable from those observed after longer exposure to HFD (Supplementary Figure S1). These results demonstrate that, preceding the appearance of macroscopically detectable lesions, high levels of cholesterol in blood are associated with a rapid decrease in p27-phospho-Ser10 in mAECs and aorta of apoE<sup>-/-</sup> mice.

3.2. Lack of p27 phosphorylation at Ser10 enhances expression of endothelial adhesion molecules

To further investigate the role of p27-phospho-Ser10 during early atherogenesis, we generated apoE<sup>-/-</sup>p27Ser10Ala mice homozygous for a knock-in alanine substitution at Ser10 that blocks phosphorylation in this residue [30]. These mice exhibit increased atherosclerosis at advanced stages of disease progression [32]. Western blot analysis

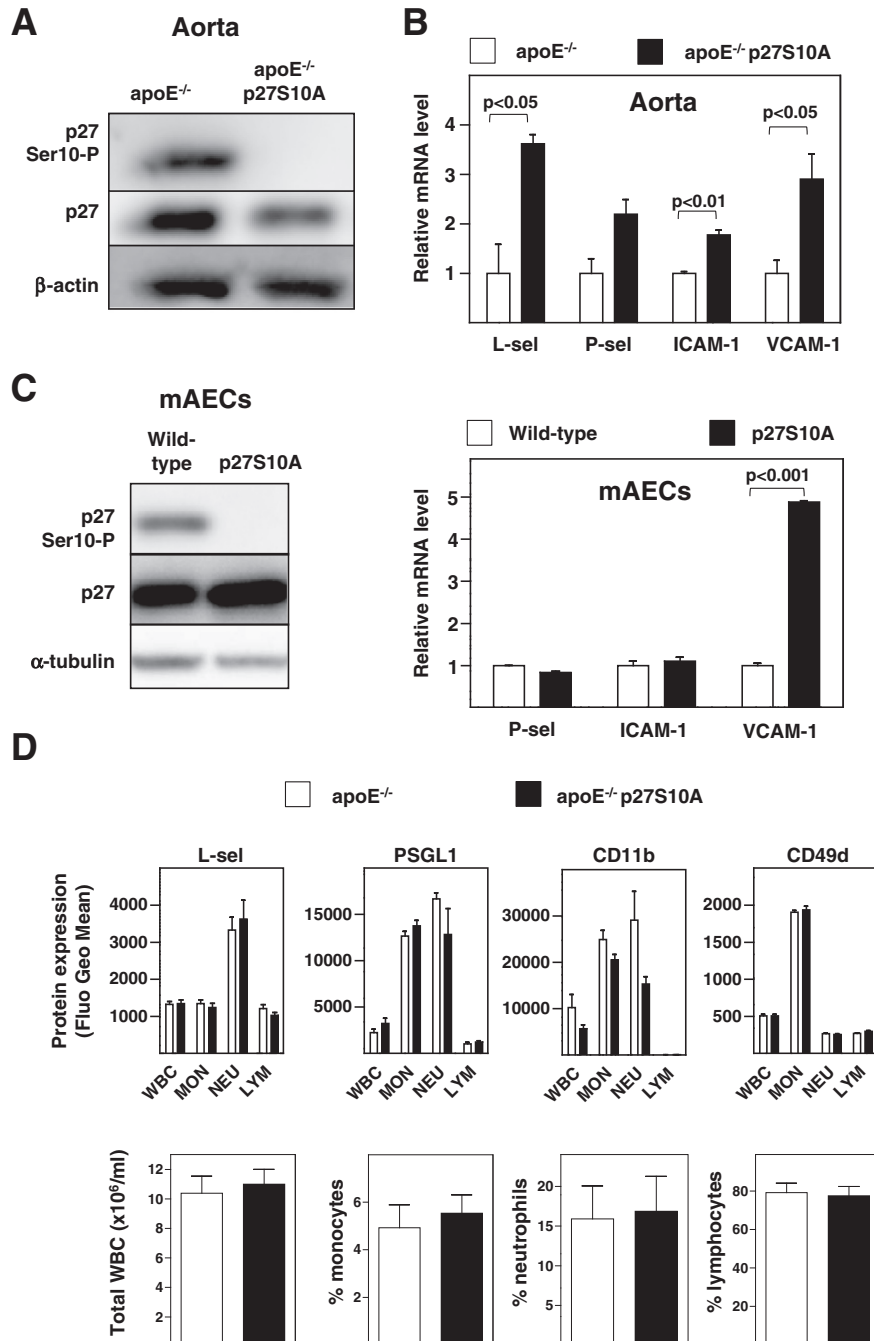


**Fig. 1.** Hypercholesterolemia in apoE<sup>-/-</sup> mice is associated with reduced phosphorylation of p27 at Ser10. (A, B) apoE<sup>-/-</sup> mice were fed either control diet (CD, n = 6) or a high-fat diet (HFD, n = 5) for 9 days. (A) Serum cholesterol level. (B) qPCR analysis of adhesion molecules in the aortic arch. (C) Representative western blot of aortic arch (tissue essentially free of atheroma and pooled from 6 mice of each group). The relative p27-phospho-S10/p27 ratio is indicated below (mean ± SEM of 3 blots performed with the same pools). Results are normalized to control diet (= 1). p27 ser10-P: p27 phosphorylated in Ser10. (D) Representative western blot of serum-starved mAECs treated for 30 min and 6 h with medium containing 10% of serum from apoE<sup>-/-</sup> mice fed CD or HFD for 4 days. The graph shows the p27 ser10-P/p27 ratio averaged from two independent experiments (each using serum pooled from two mice in each condition).



confirmed the lack of p27-phospho-Ser10 in the aorta of apoE<sup>-/-</sup> p27Ser10Ala mice (Fig. 2A). The results of qPCR analysis showed elevated L-selectin, P-selectin, ICAM-1, and VCAM-1 expression in aortas of apoE<sup>-/-</sup> p27Ser10Ala mice fed control diet compared with apoE<sup>-/-</sup> littermates, which reached statistical significance for L-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 (Fig. 2B). These results suggest that endothelial dysfunction develops in apoE<sup>-/-</sup> p27Ser10Ala mice even in the absence of a proatherogenic dietary challenge.

We next cultured mAECs from p27Ser10Ala and wild-type mice to assess whether impaired p27-phospho-Ser10 was causally linked to early endothelial dysfunction. Western blot analysis confirmed the absence of p27-phospho-Ser10 in mAECs from p27Ser10Ala mice (Fig. 2C, left). Results from qPCR analysis showed no differences in P-selectin or ICAM-1 mRNA expression between cells from both genotypes, however, VCAM-1 mRNA expression was significantly increased in p27Ser10Ala mAECs compared with controls (Fig. 2C, right). This



**Fig. 2.** Lack of p27 phosphorylation at Ser10 increases adhesion molecule expression in aorta and primary endothelial cells. (A, B) apoE<sup>-/-</sup> and apoE<sup>-/-</sup> p27Ser10Ala mice were fed standard chow. (A) Aortic arch tissue essentially free of atheroma was obtained from 3 mice of each genotype and analyzed by western blot. A representative blot of one aorta of each genotype is shown. (B) qPCR analysis of adhesion molecule expression in aortic arch (n = 2 pools from 2–3 mice). (C) Wild-type and p27Ser10Ala mAEC protein extracts were assessed by western blot (left) or qPCR (right, n = 2 pools from 8 mice). (D) Top: Flow cytometry analysis of adhesion molecule expression: L-selectin (CD62L), Mac-1 (CD11b), VLA-4 (CD49d) and PSGL-1 in total white blood cells (WBC) and in different leukocyte subsets from Mafia-apoE<sup>-/-</sup> and Mafia-apoE<sup>-/-</sup> p27Ser10Ala mice (n = 5–6 mice). MON: monocytes; NEU: neutrophils; LYM: lymphocytes. Bottom: Total number of WBC and percentage of monocytes, neutrophils and lymphocytes in blood of apoE<sup>-/-</sup> (n = 9) and apoE<sup>-/-</sup> p27Ser10Ala (n = 7) mice.

change in VCAM-1 expression was not accompanied by significant alterations in the protein level of adhesion molecules in different subsets of circulating leukocytes (Fig. 2D, top). Likewise, lack of p27-phospho-Ser10 did not alter the number of circulating leukocytes in apoE<sup>-/-</sup> (Fig. 2D, bottom) and wild-type (Supplementary Figure S2) backgrounds.

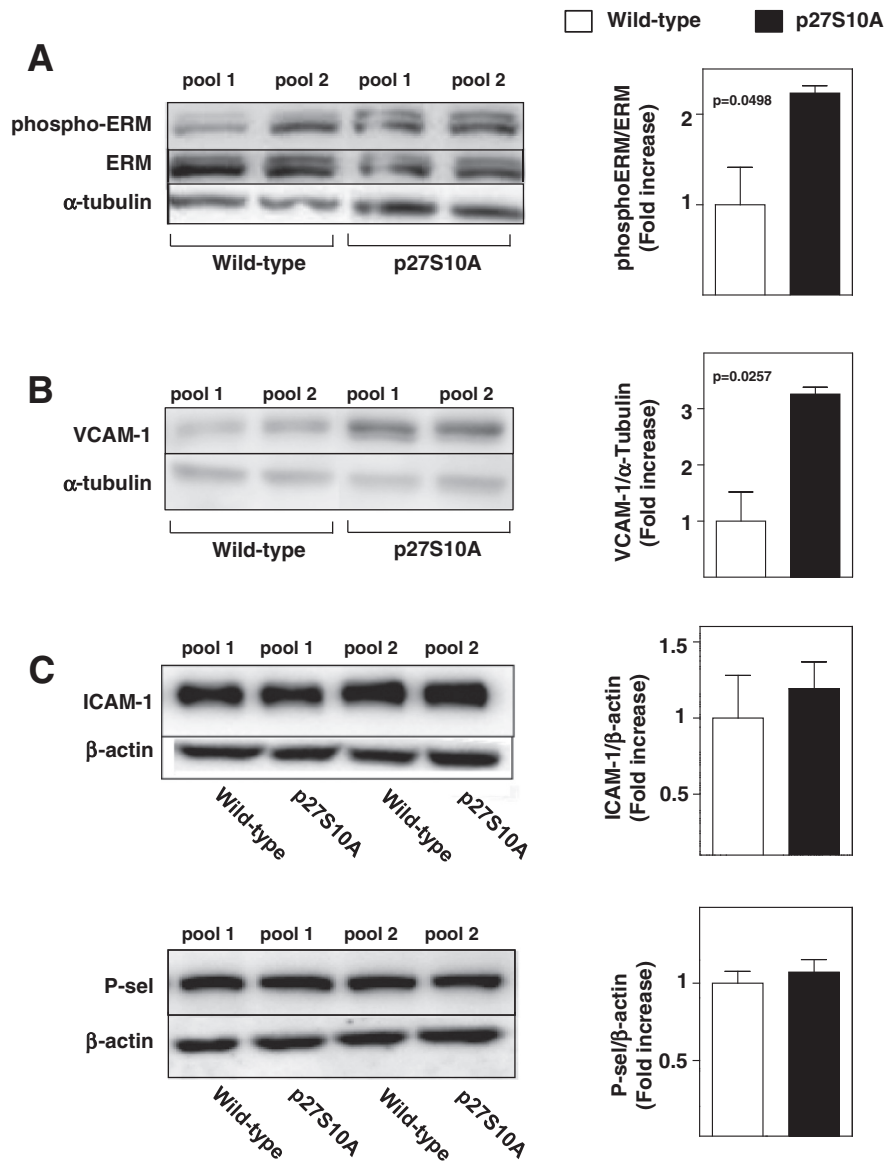
**3.3. Lack of p27 phosphorylation at Ser10 in endothelial cells increases VCAM-1 protein expression and RhoA/ROCK signaling**

We next explored what mechanisms might produce increased VCAM-1 expression in mAECs with defective p27-phospho-Ser10. Given that loss of this phosphorylation activates RhoA/ROCK-dependent signaling in aorta [32], and that this pathway promotes the activation of integrins [40], we examined whether RhoA/ROCK could modulate VCAM-1 over-expression in p27Ser10Ala mAECs. We evaluated by western blotting

the phosphorylation status of the ezrin/radixin/moesin proteins (ERM), a reliable marker of RhoA/ROCK signaling [41]. We found an increased phospho-ERM-to-ERM ratio in p27Ser10Ala mutant mAECs relative to wild-type cells (Fig. 3A). In accord with mRNA expression studies, we also found increased VCAM-1 protein in p27Ser10Ala mAECs (Fig. 3B) without changes in ICAM-1 and P-selectin (Fig. 3C). Since RhoA/ROCK induces VCAM-1 expression [40], these findings suggest that defective p27-phospho-Ser10 enhances the expression of VCAM-1 via RhoA/ROCK-dependent signaling in mAECs.

**3.4. Lack of p27 phosphorylation at Ser10 stimulates leukocyte-endothelium interaction in arterioles and atherosusceptible arteries via RhoA/ROCK activation**

The above findings suggested that leukocyte-EC interactions might be enhanced upon loss of p27-phospho-Ser10. Consistent with this



**Fig. 3.** Lack of p27 phosphorylation at Ser10 increases RhoA/ROCK signaling and VCAM-1 expression in primary endothelial cells. Protein was extracted from wild-type and p27Ser10Ala mAECs and levels of the indicated proteins were assessed by western blot. Two independent cultures of mAECs were obtained for each genotype. Each culture was prepared from a pool of 6 aortas (pool 1 and pool 2) and was analyzed in 2 western blots which were quantified as follows. Each blot included lanes loaded with samples prepared from each of the two wild-type cell pools and each of the two p27Ser10Ala pools, so that conditions were replicated within the blot. In addition, the blot was repeated with the same samples, giving methodological replicates between the duplicate blots. Mean values were first calculated for the methodological replicates from the corresponding lanes in blot 1 and blot 2 (e.g. wild-type pool 1 from blot 1 and wild-type pool 1 from blot 2). These values were then used to calculate the overall mean value for each condition (= the mean of the mean values for pool 1 and pool 2) with its error bars, as shown in the graph. The bands shown in A and B belong to the same gel but lanes were reorganized for easier comprehension.



notion, expression of the leukocyte marker, L-selectin, was increased in the aorta of apoE<sup>-/-</sup>p27Ser10Ala mutant mice (Fig. 2B). To assess the impact of defective p27-phospho-Ser10 on leukocyte-EC interactions *in vivo*, we next performed intravital microscopy in the cremaster muscle. These studies demonstrated a significant increase in the number of adhered leukocytes in cremasteric arterioles of p27Ser10Ala mice compared with wild-type littermates (Fig. 4A).

We next assessed whether higher VCAM-1 expression induced by p27Ser10Ala expression is required for increased leukocyte-EC interactions. To this end, we performed intravital microscopy experiments in mice treated with either control IgG or anti-VCAM-1 antibodies. These experiments revealed that anti-VCAM-1 antibody but not control IgG blunts the excess of leukocyte-EC interactions in p27Ser10Ala mice (Fig. 4B). Because p27Ser10Ala mAECs displayed greater VCAM-1 expression, and RhoA/ROCK-dependent signaling induces VCAM-1 expression and promotes leukocyte-EC interactions [42–45], we also investigated the impact of RhoA inhibition. Treatment of p27Ser10Ala mice with the selective RhoA/ROCK inhibitor fasudil significantly reduced leukocyte adhesion to the levels seen in wild-type controls (Fig. 4A).

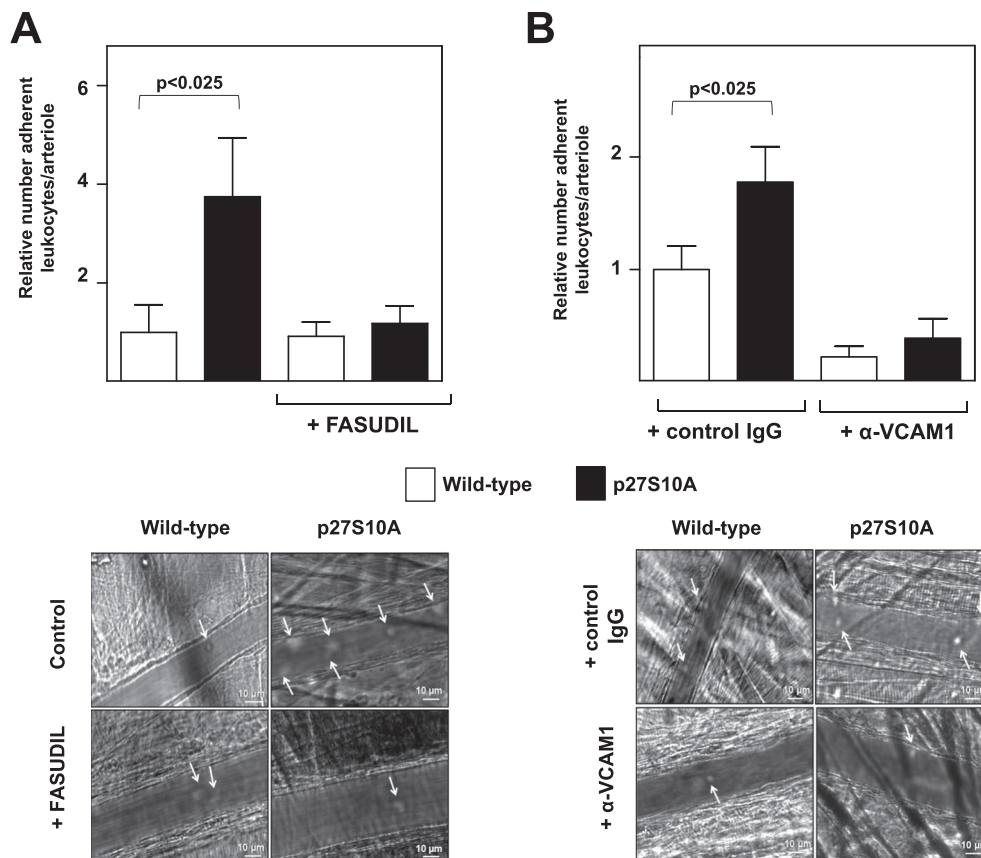
Luminal recruitment appears to be the major route of leukocyte infiltration in the subendothelial space, which precedes early atheroma build-up [3–9]. Using high-speed intravital fluorescent microscopy and rhodamine 6G labeling *in vivo* [3], we quantified leukocyte rolling within carotid arteries of apoE<sup>-/-</sup>p27Ser10Ala and apoE<sup>-/-</sup> mice fed either control diet or HFD for 2 weeks. As expected, high-fat feeding significantly increased leukocyte rolling activity in apoE<sup>-/-</sup> mice expressing either wild-type or mutant p27, but we noted greater rolling

in p27Ser10Ala mice fed either type of diet compared with their wild-type counterparts (Fig. 5A).

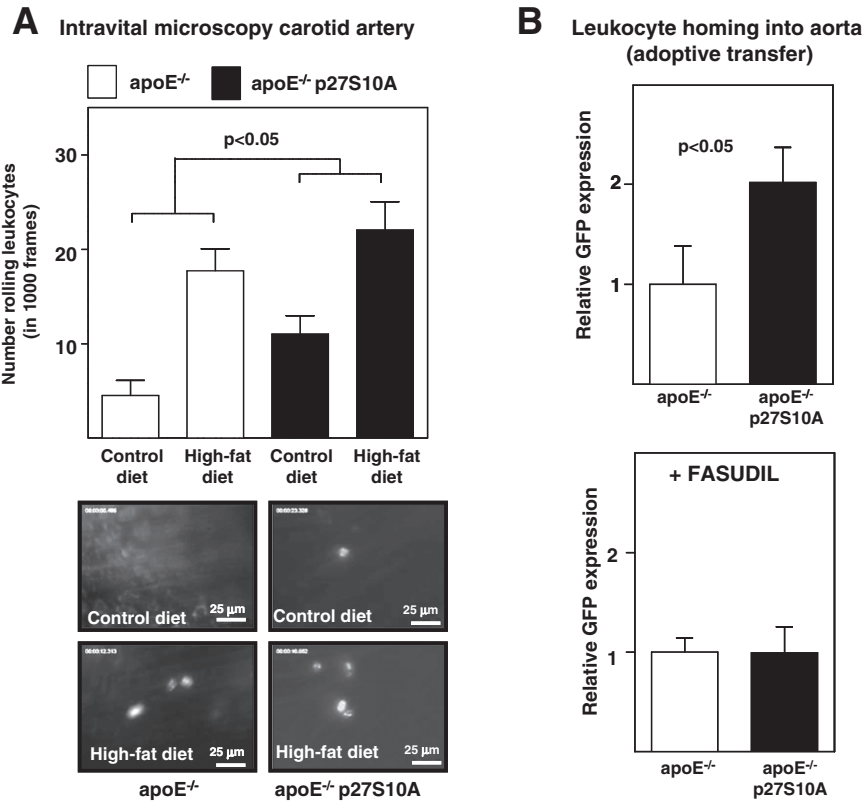
After rolling, leukocytes adhere firmly to the endothelium and rapidly change their morphology and redistribute specific receptors [3–9]. At later stages, leukocytes crawl on the endothelium in search of areas permissive for extravasation, and are finally recruited into the intima of the artery [3–9]. To assess whether increased leukocyte rolling upon loss of p27-phospho-Ser10 was accompanied by augmented leukocyte recruitment into atherogenic arteries, we performed adoptive transfer experiments using bone marrow-derived leukocytes from Mafia-apoE<sup>-/-</sup> mice, which express GFP in myeloid cells [3,33]. Thus, cells were transferred into apoE<sup>-/-</sup>p27Ser10Ala and apoE<sup>-/-</sup> mice, and GFP expression in the aorta was determined as a metric of homing of Mafia-apoE<sup>-/-</sup> leukocytes. qPCR analysis demonstrated significantly greater GFP expression in aorta from apoE<sup>-/-</sup>p27Ser10Ala relative to apoE<sup>-/-</sup> mice, and this difference was abolished upon treatment with fasudil (Fig. 5B).

### 3.5. Lack of p27 phosphorylation at Ser10 accelerates early atherosclerosis development via RhoA/ROCK activation

The *in vivo* studies presented thus far were performed in mice fed standard chow or challenged with HFD for very short periods of time; consequently, mice did not exhibit significant plaque build-up. To investigate whether increased leukocyte recruitment upon loss of p27-phospho-Ser10 accelerates early atherosclerotic lesion development, Mafia-apoE<sup>-/-</sup> and Mafia-apoE<sup>-/-</sup>p27Ser10Ala mice were challenged with HFD for 4 weeks, and aortic sinus cross-sections were



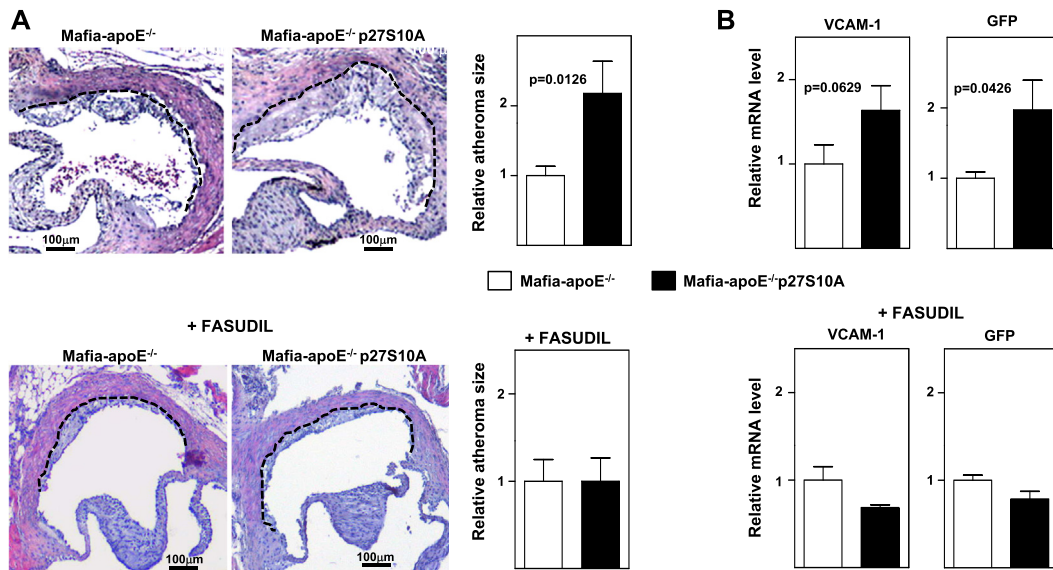
**Fig. 4.** Lack of p27 phosphorylation at Ser10 promotes the adhesion of leukocytes in arterioles through a mechanism mediated by RhoA/ROCK and VCAM-1. Intravital microscopy of cremaster muscle from p27Ser10Ala or wild-type mice to quantify leukocyte–arteriole wall interactions 4 h after TNF $\alpha$  injection. (A) The experiment was performed in animals untreated ( $n = 11$  wild-type and  $n = 10$  p27Ser10Ala arterioles from 4 animals each group) or treated with fasudil ( $n = 21$  wild-type and  $n = 21$  p27Ser10Ala arterioles from 7 animals each group). Results are represented relative to control wild-type mice ( $= 1$ ). (B) The experiment was performed in animals treated with either IgG isotype control ( $n = 12$  arterioles from 4 wild-type mice and  $n = 9$  arterioles from 3 p27Ser10Ala mice) or  $\alpha$ -VCAM-1 antibody ( $n = 12$  arterioles from 4 mice of each genotype). The images show representative fields with leukocytes adhered to endothelium identified with white arrows.



**Fig. 5.** Lack of p27 phosphorylation at Ser10 promotes the adhesion of leukocytes in atherosusceptible arteries through RhoA/ROCK signaling. (A) High-speed intravital fluorescent microscopy to quantify leukocyte recruitment into carotid artery during early atherogenesis. Three-month-old apoE<sup>-/-</sup> and apoE<sup>-/-</sup>p27Ser10Ala mice were fed HFD for 2 weeks and were injected with rhodamine 6G to label blood cells prior to intravital microscopy. Images show representative fields with leukocytes rolling on the endothelium at the level of the carotid bifurcation. Scale bar: 25 μm. The graph shows the number of rolling leukocytes in the carotid bifurcation (n = 7–21 fields from 5 mice in each group). (B) GFP+ myeloid leukocytes isolated from bone marrow of apoE<sup>-/-</sup> Mafia mice were intravenously injected into apoE<sup>-/-</sup> or apoE<sup>-/-</sup>p27Ser10Ala mice to study their homing into aorta. Two days after adoptive transfer, the level of GFP mRNA in the aortic arch of recipient mice was quantified by qPCR. Experiments were performed in untreated and in fasudil-treated mice (n = 4–6 mice).

analyzed. Under these conditions, both groups of mice presented early lesions consisting of fatty streaks containing predominantly F4/80-immunoreactive macrophages (Supplementary Figure S4). Importantly, atherosclerosis burden was significantly augmented in Mafia-apoE<sup>-/-</sup>

p27Ser10Ala mice compared with controls (Fig. 6A, top). Moreover, aortic VCAM-1 expression and the accumulation of GFP+ leukocytes were increased in fat-fed Mafia-apoE<sup>-/-</sup>p27Ser10Ala mice (Fig. 5B, top). In agreement with our earlier findings, fasudil treatment blunted



**Fig. 6.** Lack of p27 phosphorylation at Ser10 accelerates early atherogenesis through RhoA/ROCK signaling. Mafia-apoE<sup>-/-</sup> and Mafia-apoE<sup>-/-</sup>p27Ser10Ala mice were fed HFD for 4 weeks to quantify early atherosclerosis. Mafia background was used to quantify the accumulation of GFP+ myeloid cells in aorta. Top: control mice; bottom: mice treated with fasudil during HFD. (A) Representative images of atherosclerotic aortic sinus cross-sections stained with hematoxylin/eosin and quantification of atherosclerosis burden (n = 9 control and n = 10–11 fasudil-treated mice). (B) qPCR analysis of VCAM-1 and GFP expression in aorta (n = 4–5 control and fasudil-treated mice).

the increase of atherosclerosis (Fig. 6A, bottom) and aortic VCAM-1 expression and GFP + leukocyte accumulation (Fig. 6B, bottom) associated with loss of p27-phospho-Ser10.

#### 4. Discussion

Previous studies have demonstrated a protective role of p27 in the development of advanced atherosclerotic plaques in apoE<sup>-/-</sup> mice through proliferation-dependent and proliferation-independent mechanisms [12,13,16,32]. However, whether p27 regulates atherosclerosis development at initial stages when neointimal cell proliferation is not yet prominent, was unknown. Therefore, examining p27 proliferation-independent functions, including those regulated through posttranslational modifications, are of interest in this particular context. In the present study, we investigated the role of p27-phospho-Ser10 in early atherosclerosis by challenging apoE<sup>-/-</sup> mice with HFD for different periods of time: very short exposure (4, 9 days), which was sufficient to cause maximum hypercholesterolemia but failed to induce the appearance of macroscopically visible lesions; short exposure (14 days) to quantify leukocyte-EC interactions *in vivo* in very incipient plaques; and long exposure (28 days) to quantify atherosclerosis burden at early stages of disease progression. We initially observed that hypercholesterolemia induced by short-term exposure (9 days) to HFD was associated with a reduction in p27-phospho-Ser10 in the aorta of apoE<sup>-/-</sup> mice. This loss occurred very rapidly, preceding both the upregulation of adhesion molecules that trigger leukocyte recruitment and also the development of macroscopically visible lesions. Downregulation of p27 phosphorylation was also observed in mAECs challenged with serum from apoE<sup>-/-</sup> mice fed HFD for 4 days, suggesting that hypercholesterolemia may be a factor contributing to p27 dephosphorylation. Importantly, our findings in mAECs and aorta expressing the non-phosphorylated form of p27 establish a causal relationship between defective p27-phospho-Ser10 and EC activation since expression of VCAM-1, a key positive regulator of leukocyte-endothelium interactions in atherosclerotic arteries [3–9], is increased in p27Ser10Ala aorta and mAECs.

The finding that defective p27-phospho-Ser10 leads to increased expression of VCAM-1 and of the leukocyte marker L-selectin (CD62L) in the aorta of apoE<sup>-/-</sup>p27Ser10Ala mutant mice, prompted us to examine whether loss of this post-translational modification increases leukocyte infiltration. *In vivo* intravital microscopy in carotid artery and cremaster muscle arterioles, and *in vivo* homing studies in aorta revealed augmented leukocyte-EC interactions and leukocyte recruitment upon expression of p27Ser10Ala. It is noteworthy that the increase in leukocyte rolling in the carotid artery induced by defective p27-phospho-Ser10 expression was diminished in apoE<sup>-/-</sup>p27Ser10Ala and apoE<sup>-/-</sup> mice challenged with HFD, when compared with identical groups fed standard chow. This is presumably due to the loss of p27-phospho Ser10 that occurs rapidly in fat-fed apoE<sup>-/-</sup> mice. The pathological relevance of increased aortic VCAM-1 expression and leukocyte-EC interaction upon loss of p27-phospho-Ser10 is underscored by the observation that apoE<sup>-/-</sup>p27Ser10Ala mice fed HFD for 4 weeks exhibited larger macrophage-rich fatty streaks. This increase in macrophage accumulation correlated with enhanced aortic VCAM-1 expression, and augmented GFP + myeloid leukocyte homing into the aortic arch of apoE<sup>-/-</sup>p27Ser10Ala-Mafia mice. The use of the Mafia GFP-reporter mouse in adoptive transfer studies allowed us to demonstrate a causal relationship between p27Ser10Ala expression and increased recruitment of leukocytes into early fatty streaks since transfer of GFP + myeloid cells was significantly increased in aorta of recipient apoE<sup>-/-</sup>p27Ser10Ala mice.

During vascular inflammation, the VCAM-1 integrin is one of a plethora of induced adhesion molecules (e.g. selectins, chemokines, integrins) that differentially mediate interactions during the distinct phases of recruitment [8]. We have shown here that treatment with anti-VCAM-1 antibody blunts the excess of leukocyte-EC

interactions in cremasteric arterioles of p27Ser10Ala mice. Activation of the RhoA/ROCK pathway has been linked to vascular inflammation, leukocyte recruitment, and expression of adhesion molecules in ECs, particularly those involved in the slow rolling and arrest phases [40,42–44,46–49]. Disruption of RhoA/ROCK signaling, using pharmacological inhibitors or through genetic ablation of individual components of the pathway, significantly reduces neointimal thickening in rat and mouse models of atherosclerosis, balloon angioplasty and artery ligation [45,50–53]. We demonstrate here that the absence of p27-phospho-Ser10 leads to an increase in the phospho-ERM/ERM ratio in mAECs. The increase in this *bona fide* marker of RhoA/ROCK signaling coincided with higher levels of VCAM-1 expression and enhanced adhesion of leukocytes to p27Ser10Ala mAECs *in vitro* and in cremaster muscle arterioles *in vivo*. These differences were abolished after treatment with the RhoA/Rock inhibitor fasudil. Similarly, fasudil abolished the increase of aortic VCAM-1 expression, leukocyte homing and atherosclerosis burden in apoE<sup>-/-</sup>p27Ser10Ala mice.

Regarding the mechanism through which lack of p27-phospho-Ser10 leads to increased RhoA/ROCK-dependent signaling, it has been shown that p27 interacts directly with RhoA and inhibits its function [18,54]. Moreover, lack of p27-phospho-Ser10 in several cell types restrains p27's exit from the nucleus to the cytoplasm leading to reduced level of this tumor suppressor in the cytoplasm [24,25,27,31,32,55], where the interaction p27-RhoA occurs. This could explain, at least in part, the enhancement of RhoA/ROCK activity in cells expressing p27Ser10Ala. Consistent with this possibility, we found less accumulation of p27 in the cytoplasm of mAECs lacking p27-phospho-Ser10 (Supplementary Figure S3). Taken together, these results suggest that reduced level of cytoplasmic p27 in p27Ser10Ala mAECs may enhance RhoA/ROCK activity and the ensuing VCAM-1 induction by diminishing the interaction between p27 and RhoA. However, further studies are required to ascertain the exact mechanism by which p27 phosphorylation at Ser10 modulates the RhoA/ROCK pathway.

In summary, our findings establish for the first time a causal link between defective p27 phosphorylation and RhoA/ROCK activation that promotes EC dysregulation, leukocyte recruitment and the development of early atherosclerotic lesions. These observations extend the results of previous studies by others demonstrating that p27 regulates the RhoA/ROCK pathway [18]. They also build on our recent studies showing that loss of p27-phospho-Ser10 exacerbates advanced atherosclerosis in apoE<sup>-/-</sup>p27Ser10Ala mice coinciding with augmented foam cell formation owing to increased RhoA/ROCK activity in macrophages [32]. It is also important to note that our present findings, taken together with previous studies in apoE<sup>-/-</sup> mice lacking p27 [12,13,16] or p27-phospho-Ser10 [32], demonstrate that p27 affects all stages of plaque formation: from the early fatty streaks to complex plaques, through cell cycle-dependent and cell cycle-independent mechanisms that operate in different cell types (vascular smooth muscle cells, macrophages and ECs). These properties could therefore be exploited to develop versatile therapeutics targeting p27 to inhibit atherogenesis at all stages of lesion development.

#### 5. Conclusions

p27 undergoes rapid dephosphorylation at Ser10 in aorta of fat-fed apoE<sup>-/-</sup> preceding development of macroscopically-visible lesions. Defective p27-phospho-Ser10 enhances the expression of adhesion molecules in aorta of apoE<sup>-/-</sup> mice and endothelial cells, and augments endothelial-leukocyte interactions, leukocyte recruitment and the development of early atherosclerosis development. Treatment with the RhoA/ROCK inhibitor fasudil blunts the pro-atherogenic effects of defective p27-phospho-Ser10.



## Conflict of interest

None.

## Acknowledgments

We thank V. Zorita, I. Ortega, J. Mateos, the Cellomic and Comparative Medicine Units at CNIC for the animal care, A. Hidalgo for the help in the experimental design and for providing access to the intravital microscopy platform, and Kenneth McCreath for the English editing. Work supported by grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) (SAF2010-16044, SAF2013-46663-R), Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), and Instituto de Salud Carlos III (RD12/0042/0028). P.M.-S. is supported by a FPU predoctoral fellowship from MINECO. The Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC) is supported by the MINECO and the Pro-CNIC Foundation.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.04.013>.

## References

- [1] Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics—2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2012;125(1):188–97.
- [2] Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011;473(7347):317–25.
- [3] Chevre R, Gonzalez-Granado JM, Megens RT, Sreeramkumar V, Silvestre-Roig C, Molina-Sanchez P, et al. High-resolution imaging of intravascular atherogenic inflammation in live mice. *Circ Res* 2014;114(5):770–9.
- [4] Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, Miller YI, Hartvigsen K, Dewan A, et al. Innate and acquired immunity in atherosclerosis. *Nat Med* 2002;8(11):1218–26.
- [5] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352(16):1685–95.
- [6] Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407(6801):233–41.
- [7] Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell* 2001;104:503–16.
- [8] Galkina E, Ley K. Leukocyte influx in atherosclerosis. *Curr Drug Targets* 2007;8(12):1239–48.
- [9] Swirski FK, Nahrendorf M. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science* 2013;339(6116):161–6.
- [10] Eriksson EE. Intravital microscopy on atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice establishes microvessels as major entry pathways for leukocytes to advanced lesions. *Circulation* 2011;124(19):2129–38.
- [11] Fuster JJ, Fernandez P, Gonzalez-Navarro H, Silvestre C, Abu Nabah YN, Andres V. Control of cell proliferation in atherosclerosis: insights from animal models and human studies. *Cardiovasc Res* 2010;86:254–64.
- [12] Diez-Juan A, Andres V. The growth suppressor p27Kip1 protects against diet-induced atherosclerosis. *FASEB J* 2001;15(11):1989–95.
- [13] Diez-Juan A, Perez P, Aracil M, Sancho D, Bernad A, Sanchez-Madrid F, et al. Selective inactivation of p27Kip1 in hematopoietic progenitor cells increases neointimal macrophage proliferation and accelerates atherosclerosis. *Blood* 2004;103(1):158–61.
- [14] Chen D, Krasinski K, Sylvester A, Chen J, Nisen PD, Andrés V. Downregulation of cyclin-dependent kinase 2 activity and cyclin A promoter activity in vascular smooth muscle cells by p27(KIP1), an inhibitor of neointima formation in the rat carotid artery. *J Clin Invest* 1997;99:2334–41.
- [15] Tanner FC, Boehm M, Akyurek LM, San H, Yang Z-Y, Tashiro J, et al. Differential Effects of the cyclin-dependent kinase inhibitors p27Kip1, p21Cip1, and p16Ink4 on vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* 2000;101(17):2022–5.
- [16] Akyurek LM, Boehm M, Olive M, Zhou A-X, San H, Nabel EG. Deficiency of cyclin-dependent kinase inhibitors p21Cip1 and p27Kip1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;396(2):359–63.
- [17] Santulli G, Wronska A, Uryu K, Diacovo TG, Gao M, Marx SO, et al. A selective microRNA-based strategy inhibits restenosis while preserving endothelial function. *J Clin Invest* 2014;124(9):4102–14.
- [18] Besson A, Gurian-West M, Schmidt A, Hall A, Roberts JM. p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes Dev* 2004;18(8):862–76.
- [19] Diez-Juan A, Andres V. Coordinate control of proliferation and migration by the p27Kip1/Cyclin-Dependent Kinase/Retinoblastoma pathway in vascular smooth muscle cells and fibroblasts. *Circ Res* 2003;92(4):402–10.
- [20] McAllister SS, Becker-Hapak M, Pintucci G, Pagano M, Dowdy SF. Novel p27kip1 C-terminal scatter domain mediates Rac-dependent cell migration independent of cell cycle arrest functions. *Mol Cell Biol* 2003;23(1):216–28.
- [21] Pippa R, Espinosa L, Gundem G, Garcia-Escudero R, Dominguez A, Orlando S, et al. p27Kip1 represses transcription by direct interaction with p130/E2F4 at the promoters of target genes. *Oncogene* 2012;31(38):4207–20.
- [22] Castro C, Diez-Juan A, Cortes MJ, Andres V. Distinct regulation of mitogen-activated protein kinases and p27Kip1 in smooth muscle cells from different vascular beds. A potential role in establishing regional phenotypic variance. *J Biol Chem* 2003;278(7):4482–90.
- [23] Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* 2008;14(2):159–69.
- [24] Besson A, Gurian-West M, Chen X, Kelly-Spratt KS, Kemp CJ, Roberts JM. A pathway in quiescent cells that controls p27Kip1 stability, subcellular localization, and tumor suppression. *Genes Dev* 2006;20(1):47–64.
- [25] Boehm M, Yoshimoto T, Crook MF, Nallamshetty S, True A, Nabel GJ, et al. A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27Kip1 and regulates cell cycle progression. *EMBO J* 2002;21(13):3390–401.
- [26] Deng X, Mercer SE, Shah S, Ewton DZ, Friedman E. The cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is stabilized in G0 by Mirk/dyrk1B kinase. *J Biol Chem* 2004;279(21):22498–504.
- [27] Ishida N, Hara T, Kamura T, Yoshida M, Nakayama K, Nakayama KI. Phosphorylation of p27 Kip1 on Serine 10 is required for its binding to CRM1 and nuclear export. *J Biol Chem* 2002;277(17):14355–8.
- [28] Ishida N, Kitagawa M, Hatakeyama S, Nakayama K-i. Phosphorylation at serine 10, a major phosphorylation site of p27Kip1, increases its protein stability. *J Biol Chem* 2000;275(33):25146–54.
- [29] Kawachi T, Chihama K, Nabeshima Y-i, Hoshino M. Cdk5 phosphorylates and stabilizes p27kip1 contributing to actin organization and cortical neuronal migration. *Nat Cell Biol* 2006;8(1):17–26.
- [30] Kotake Y, Nakayama K, Ishida N, Nakayama KI. Role of serine 10 phosphorylation in p27 stabilization revealed by analysis of p27 knock-in mice harboring a serine 10 mutation. *J Biol Chem* 2005;280(2):1095–102.
- [31] Rodier G, Montagnoli A, Di Marcotullio L, Coulombe P, Draetta GF, Pagano M, et al. p27 cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation on Ser10 and is not a prerequisite for its proteolysis. *EMBO J* 2001;20(23):6672–82.
- [32] Fuster JJ, Gonzalez-Navarro H, Vinue A, Molina-Sanchez P, Andres-Manzano MJ, Nakayama KI, et al. Deficient p27 phosphorylation at serine 10 increases macrophage foam cell formation and aggravates atherosclerosis through a proliferation-independent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31(11):2455–63.
- [33] Burnett SH, Kershen EJ, Zhang J, Zeng L, Straley SC, Kaplan AM, et al. Conditional macrophage ablation in transgenic mice expressing a Fas-based suicide gene. *J Leukoc Biol* 2004;75(4):612–23.
- [34] Golde WT, Gollub P, Rodriguez LL. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab Anim (NY)* 2005;34(9):39–43.
- [35] Mahabeleshwar GH, Somanath PR, Byzova TV. Methods for isolation of endothelial and smooth muscle cells and in vitro proliferation assays. *Methods Mol Med* 2006;129:197–208.
- [36] Soleimani M, Nadri S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nat Protoc* 2009;4(1):102–6.
- [37] Doring Y, Drechsler M, Wantha S, Kemmerich K, Lievens D, Vijayan S, et al. Lack of neutrophil-derived CRAMP reduces atherosclerosis in mice. *Circ Res* 2012;110(8):1052–6.
- [38] Sanz-González SM, Melero-Fernández-de-Mera R, Malek NP, Andrés V. Atheroma development in apolipoprotein E-null mice is not regulated by phosphorylation of p27Kip1 on threonine 187. *J Cell Biochem* 2006;97(4):735–43.
- [39] Gonzalez-Navarro H, Vinue A, Vila-Caballer M, Fortuno A, Beloqui O, Zalba G, et al. Molecular mechanisms of atherosclerosis in metabolic syndrome: role of reduced IRS2-dependent signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28(12):2187–94.
- [40] Kawanami D, Matoba K, Okada R, Tsukamoto M, Kinoshita J, Ishizawa S, et al. Fasudil inhibits ER stress-induced VCAM-1 expression by modulating unfolded protein response in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;435(2):171–5.
- [41] Rekhter M, Chandrasekhar K, Gifford-Moore D, Huang X, Rutherford P, Hanson J, et al. Immunohistochemical analysis of target proteins of Rho-kinase in a mouse model of accelerated atherosclerosis. *Exp Clin Cardiol* 2007;12(4):169–74.
- [42] Slotta JE, Braun OO, Menger MD, Thorlacius H. Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, inhibits leukocyte adhesion in inflamed large blood vessels in vivo. *Inflamm Res* 2006;55(9):364–7.
- [43] Thorlacius K, Slotta JE, Laschke MW, Wang Y, Menger MD, Jeppsson B, et al. Protective effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, on chemokine expression, leukocyte recruitment, and hepatocellular apoptosis in septic liver injury. *J Leukoc Biol* 2006;79(5):923–31.
- [44] Wang QM, Stalker TJ, Gong Y, Rikitake Y, Scalia R, Liao JK. Inhibition of Rho-kinase attenuates endothelial-leukocyte interaction during ischemia-reperfusion injury. *Vasc Med* 2012;17(6):379–85.
- [45] Wu DJ, Xu JZ, Wu YJ, Jean-Charles L, Xiao B, Gao PJ, et al. Effects of fasudil on early atherosclerotic plaque formation and established lesion progression in apolipoprotein E-knockout mice. *Atherosclerosis* 2009;207(1):68–73.
- [46] Loirand G, Guerin P, Pacaud P. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ Res* 2006;98(3):322–34.
- [47] Rolfe BE, Worth NF, World CJ, Campbell JH, Campbell GR. Rho and vascular disease. *Atherosclerosis* 2005;183(1):1–16.
- [48] Zhou Q, Liao JK. Rho Kinase: an important mediator of atherosclerosis and vascular disease. *Curr Pharm Des* 2009;15(27):3108–15.
- [49] Wang H-W, Liu P-Y, Oyama N, Rikitake Y, Kitamoto S, Gitlin J, et al. Deficiency of ROCK1 in bone marrow-derived cells protects against atherosclerosis in LDLR<sup>-/-</sup> mice. *FASEB J* 2008;22(10):3561–70.
- [50] Ma Z, Zhang J, Du R, Ji E, Chu L. Rho kinase inhibition by fasudil has anti-inflammatory effects in hypercholesterolemic rats. *Biol Pharm Bull* 2011;34(11):1684–9.
- [51] Noma K, Rikitake Y, Oyama N, Yan G, Alcáide P, Liu P-Y, et al. ROCK1 mediates leukocyte recruitment and neointima formation following vascular injury. *J Clin Invest* 2008;118(5):1632–44.

- [52] Sawada N, Itoh H, Ueyama K, Yamashita J, Doi K, Chun T-H, et al. Inhibition of Rho-associated kinase results in suppression of neointimal formation of balloon-injured arteries. *Circulation* 2000;101(17):2030–3.
- [53] Mallat Z, Gojova A, Sauzeau V, Brun V, Silvestre J-S, Esposito B, et al. Rho-associated protein kinase contributes to early atherosclerotic lesion formation in mice. *Circ Res* 2003;93(9):884–8.
- [54] Larrea MD, Hong F, Wander SA, da Silva TG, Helfman D, Lannigan D, et al. RSK1 drives p27Kip1 phosphorylation at T198 to promote RhoA inhibition and increase cell motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(23):9268–73.
- [55] Gui P, Labrousse A, Van Goethem E, Besson A, Maridonneau-Parini I, Le Cabec V. Rho/ROCK pathway inhibition by the CDK inhibitor p27(kip1) participates in the onset of macrophage 3D-mesenchymal migration. *J Cell Sci* 2014;127(Pt 18):4009–23.

## **SUPPLEMENTAL MATERIAL**

### **Loss of p27 phosphorylation at Ser10 accelerates early atherogenesis by promoting leukocyte recruitment via RhoA/ROCK**

Molina-Sánchez P.\*, Chèvre R.\*, Rius C., Fuster J.J.<sup>†</sup>, and Andrés V.<sup>‡</sup>

Laboratory of Molecular and Genetic Cardiovascular Pathophysiology, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid, Spain

\* Authors with equal contribution

<sup>†</sup> Current address: Whitaker Cardiovascular Institute, Boston University School of Medicine, Boston, US

<sup>‡</sup> Corresponding author:

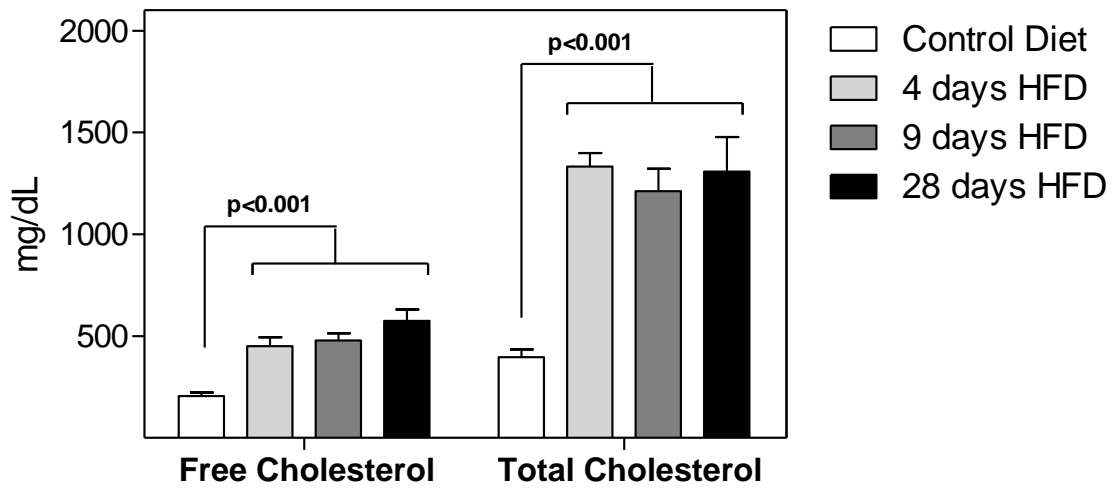
Laboratory of Molecular and Genetic Cardiovascular Pathophysiology  
CNIC

Melchor Fernández Almagro 3, 28029 Madrid (Spain)

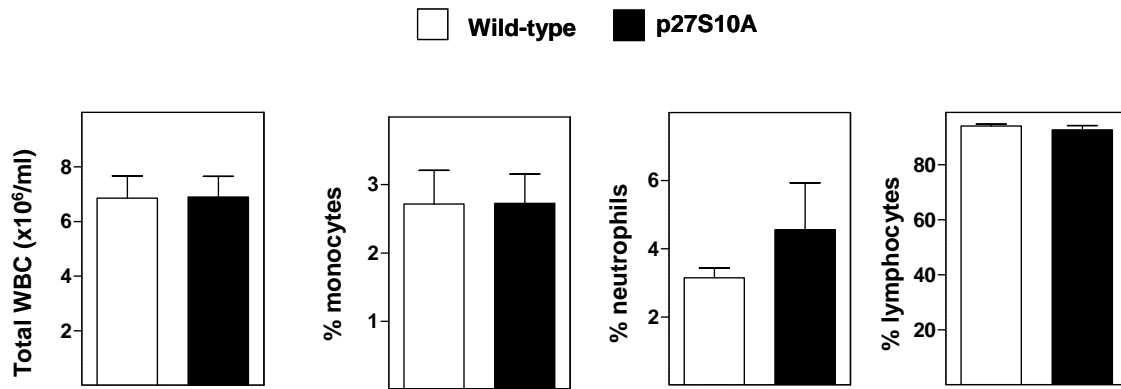
Phone: +34-91 453 12 00 (Ext. 1502)

Fax: +34-91 453 12 65

E-mail: vandres@cnic.es

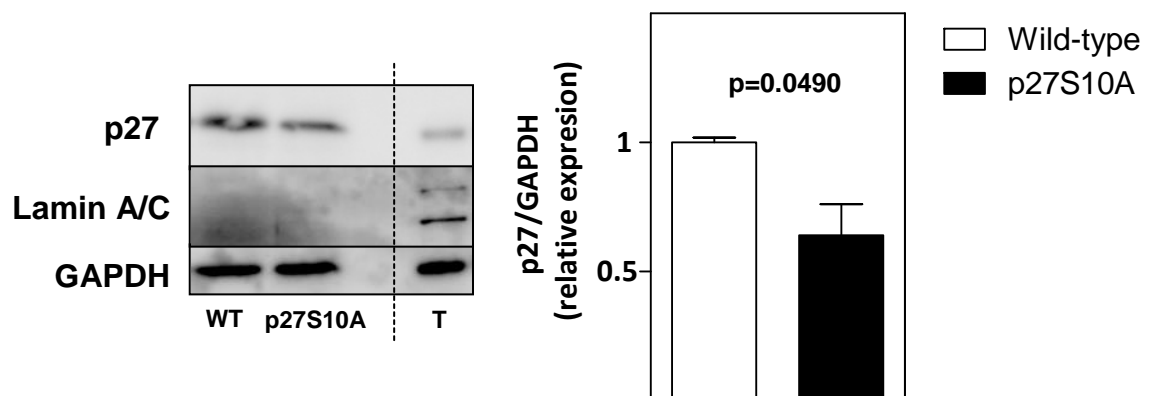


**Figure S1: Free and total cholesterol levels in serum of apoE<sup>-/-</sup> mice fed either control diet or high-fat diet (HFD) for 4, 9 and 28 days. Five mice were analyzed per each condition.**



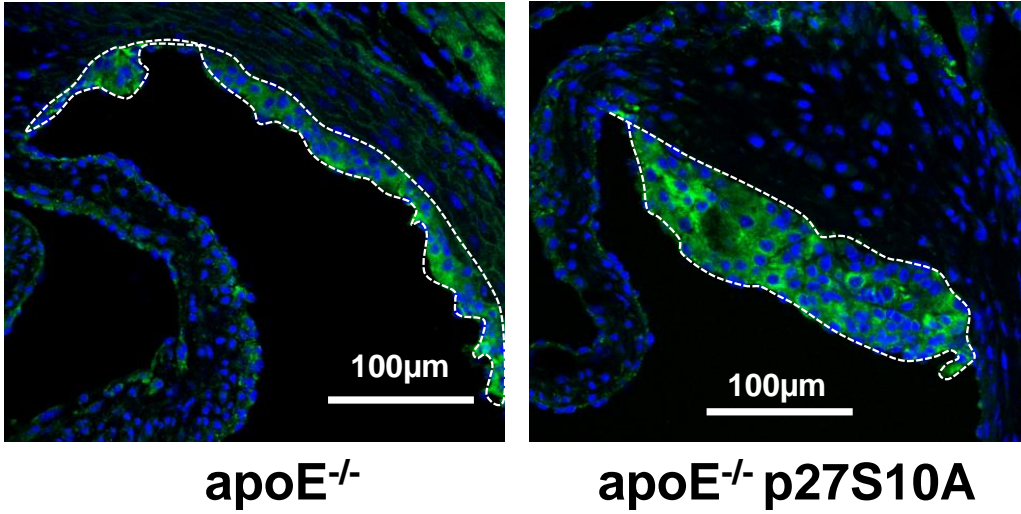
**Figure S2: Lack of phosphorylation at Ser10 does not affect total number of circulating white blood cells (WBC) and percentage of monocytes, neutrophils and lymphocytes.** Analysis was performed with blood obtained from 8-week-old wild-type and p27S10A mice (n=5 each genotype).





**Figure S3: Expression of p27Ser10Ala is associated with reduced level of cytoplasmic p27.** Western blot to examine p27 levels in cytoplasmic extracts of mAECs obtained from wild-type and p27Ser10Ala mice. Expression of nuclear Lamin A/C and cytoplasmic GAPDH was analyzed to check the quality of cytoplasmic extracts. Note that all proteins were detected in total protein extract (T). Two independent mAEC cultures of each genotype (each prepared from a pool of 6 aortas) were analyzed in two western blots and quantified essentially as described in Figure 3. One representative blot of one of the two mAEC cultures of each genotype is shown.

DAPI F4/80



**Figure S4: Early atherosclerotic lesions consisting of fatty streaks containing predominantly F4/80-immunoreactive macrophages.** Representative images of F4-80 positive macrophages in aortic sinus sections of apoE<sup>-/-</sup> and apoE<sup>-/-</sup> p27S10A mice challenged for 4 weeks with HFD (shown in green). Nuclei were counterstained with DAPI shown in blue).









**Capítulo de libro aceptado en: Methods in Mouse Atherosclerosis  
(Methods in Molecular Biology Series, Springer)**

**Isolation of mouse primary aortic endothelial cells by selection with  
specific antibodies**

Pedro Molina-Sánchez and Vicente Andrés\*  
Laboratory of Molecular and Genetic Cardiovascular Pathophysiology  
Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid, Spain

\*Address correspondence to:

Dr. Vicente Andrés  
Laboratory of Molecular and Genetic Cardiovascular Pathophysiology  
CNIC  
C/ Melchor Fernández Almagro 3, 28029 Madrid (Spain)  
Telephone: +34-91 453 12 00 (Ext. 1502)  
FAX: +34-91 453 12 65  
Email: vandres@cnic.es

Running head: Mouse endothelial cell culture.

**Summary**

Endothelial cells (ECs) are key blood-vessel-wall components that play critical roles in the regulation of many physiological processes, including angiogenesis, coagulation and vascular tone control, and in pathological events such as vessel inflammation and leukocyte infiltration. EC dysfunction is one of the first events associated with the development of atherosclerosis and is sustained throughout progression of the disease. The study of ECs *in vitro* has become an invaluable tool for investigating these vascular processes at the molecular level, and is widely used in the search for therapeutic targets and strategies. This chapter describes a protocol for the isolation and culture of primary mouse aortic ECs based on antibody-mediated EC selection.

**Key words**

Endothelial cells, isolation, culture, antibody-mediated selection, mouse aorta, atherosclerosis.

## 1. Introduction

The endothelium is the thin cell layer that faces the blood-vessel lumen and is in direct contact with flowing blood. The key functional components of any vascular endothelium are the endothelial cells (ECs). First described as a simple passive barrier, the endothelium is now viewed as a complex and active participant in the regulation of diverse vascular processes, including inflammation and leukocyte infiltration (1) vascular tone (2), and coagulation (3, 4). In the particular case of atherosclerosis, risk factors such as hypercholesterolemia, diabetes and smoking trigger an inflammatory response that causes the accumulation of dysfunctional ECs, characterized by the expression of adhesion molecules that promote leukocyte recruitment to the artery wall (5). This endothelial dysfunction is the first step in atherogenesis, preceding the formation of fatty streaks, and is sustained throughout disease progression, thus contributing to the eventual generation of gross atheromatous plaques (6). Since the endothelium is also involved in the regulation of vascular tone, EC dysfunction may contribute to atherosclerosis development by increasing blood pressure, a well-known proatherogenic risk factor.

Today, a variety of approaches for studying EC function and its relation to vascular disease are available, ranging from *ex-vivo* systems such as wire and pressure myography (7) to highly sophisticated genetically-modified mouse models in which gene expression in the endothelium is specifically disrupted or augmented (8-13). However, *in vitro* studies with primary EC cultures remain an essential tool for investigating critical processes in EC pathobiology at the molecular level (e.g. proliferation, migration, apoptosis, angiogenesis, release of vasoactive molecules, expression of adhesion molecules, etc). Here we describe a simple procedure for obtaining ECs from mouse aorta based on selection for specific markers.

## 2. Materials

1. Young mice (8-12 weeks old) (e.g. C57BL/6J).
2. Surgical material: fine forceps (e.g. Dumont Medical Biology Forceps, FST Cat. No. 11254-20) and scissors (e.g. Extra Fine Bonn Scissors, FST Cat. No. 14084-08).
3. Anesthetics: Ketamine (e.g. Imalgene 1000, Merial) and Medetomidine (e.g. Medeson, Urano). Alternatively, CO<sub>2</sub> chamber.
4. Phosphate-buffered saline (PBS): 8.0 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 1.44.g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in distilled water.
5. Saline solution: 0.90% (w/v) NaCl in distilled water.
6. Stereo microscope (e.g. Olympus SZX10).
7. DMEM-F12 medium (e.g. Lonza, Cat. No. BE04-687Q).
8. Heparin sodium salt (heparin) from porcine intestinal mucosa (e.g. Sigma, Cat. No. 9041-08-1).
9. Fetal bovine serum (FBS, e.g. ThermoScientific, Cat. No. SV30160.03) inactivated by heating at 56°C for 30 minutes.
10. Penicillin and streptomycin (Pen/Strep) solution for culture media (e.g. Pen/Strep stock 10K/10K, Lonza, Cat. No. DE 17-602E).
11. L-glutamine (e.g. Lonza, Cat. 17-605C).
12. EC growth factor (ECGF) (e.g. Sigma, Cat. No. E2759).



13. EC medium: DMEM-F12 supplemented with 1% Pen/Strep, 0.4mM L-glutamine, 10 mM heparin and 50 µg/mL ECGF.
14. HEPES (1M stock in normal saline; e.g. Lonza, Cat. No. 17-737E).
15. 0.25% Trypsin/EDTA 1X (e.g. Gibco, Cat. No. 25200-072).
16. Anti-mouse-CD102 antibody (e.g. rat anti-mouse-CD102, BD Pharmigen, Cat. No.553326).
17. Secondary antibody bound to magnetic beads (e.g. Dynabeads® sheep anti-rat IgG, Life Technologies, Cat. No. 110.35).
18. Magnet (e.g. DynaMag™-15 Magnet, Life Technologies, Cat. No 12301D).
19. 24-well culture plates.
20. Matrigel (e.g. Corning, Cat. No 354234).
21. Gelatin (e.g. Sigma, Cat. No. G9382).
22. Collagen (e.g Sigma, Cat. No C8919).
23. Gelatin coating solution: PBS supplemented with 0.5% gelatin and 0.1mg/ml collagen.
24. Ice, fridge, or cold-room.
25. Three-dimensional laboratory shaker.

### 3. Method

1. Euthanize five to eight mice using any ethically approved method (see Note 1).
2. Place the mice in *decubitus supine* position and dissect them to remove the thoracic aorta (see Note 2 and Figures 1A and 1B).
3. Place the aortas in cold PBS or saline solution (see Note 3 and Figure 1C).
4. Under a stereo microscope, use fine forceps to carefully remove all fat tissue from the aorta (see Note 4 and Figure 1D).
5. Dissect aortas longitudinally with a scalpel to obtain 0.5-0.8-mm-wide strips (see Figure 1E).
6. In sterile conditions (see Note 5) place the aortic strips lumen-face down in the wells of a 24-well culture plate coated with unset Matrigel. Incubate the plates in a humidified cell culture incubator at 37°C until the Matrigel solidifies (at least 2 h) (see Notes 6 and 7).
7. Cover the wells with 2 mL of EC medium and culture the aortic strips for a minimum of one week (see Note 8 and Figure 1F). When cell colonies are formed (see Figure 1G), remove the remaining aortic tissue from the well and collect the cells as follows:
  - Wash the attached cells with PBS at least three times.
  - Add trypsin and incubate at 37°C to detach the cells (usually 5 min).
  - Block trypsin activity by adding EC medium supplemented with 10% FBS, and pellet the cells by centrifugation at approximately 200xg for 5 min.
8. Resuspend the cells in EC medium containing 10% of FBS and plate them in gelatin-coated plates (see Note 9). Incubate the cells to expand the culture (see Note 10).
9. Select the ECs from the culture as follows:
  - To each well add anti-CD102 antibody (3.5 µL/mL EC medium) and incubate for 30 min at 4°C in in a shaker set at low velocity (see Notes 11 and 12).
  - Remove the medium containing the anti-CD102 antibody and wash the cells 2-3 times with PBS.
10. To each well add EC medium containing an appropriate secondary antibody linked to magnetic beads (e.g., anti-rat IgG if using rat IgG anti-mouse CD102 as primary

antibody). Secondary antibody should be diluted 3.5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  EC medium. Incubate for 30 min at 4° C (see Note 13).

11. Wash the cells with PBS (2-3 times) and detach them with trypsin (as described in step 7).
12. Use a magnet to retrieve cells bound to magnetic beads.
13. Wash the ECs retained on the magnet with PBS and culture them in EC medium in gelatin-coated plates (as described in step 8).
14. Expand the ECs culture as necessary (see Note 14).

#### **4. Notes**

1. For this procedure several euthanasia methods can be used, for example, CO<sub>2</sub> inhalation or chemical anaesthetics overdose. Cervical dislocation carries a significant risk of damaging the aorta and therefore of losing useful material for EC extraction.

2. The abdominal aorta can also be used for endothelial cell isolation, but its extraction and cleaning requires additional time that prolongs the protocol. The duration of the procedure strongly influences extraction efficiency and EC viability, and therefore the shorter the dissection and cleaning time the better the result.

3. In many dissection procedures mice are transcardially perfused with buffer to flush out blood from organs and tissues. However, this procedure can damage or even remove the endothelium, and therefore for EC extraction this step should either be omitted or performed with extreme care.

4. For this procedure, it is important that the aorta be dissected as cleanly as possible from the beginning; this avoids excessive handling in subsequent steps and thus increases final cell viability. To maintain endothelium integrity during cleaning, it is important to avoid pinching the aorta as much as possible.

5. Working in sterile conditions is recommended throughout the procedure in order to avoid contamination of the cell culture. Unfortunately, sometimes this is not possible due to technical limitations, especially during aorta isolation and cleaning.

6. Prepare the coated plates ahead of time by chilling them on ice and covering the wells with a solution of 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of cold Matrigel; this will solidify upon incubation at 37°C in the cell culture incubator once the aortic strips are added.

7. Usually the strips derived from 2-3 aortas are pooled together in one well. Correct attachment of the aorta strips to the well surface is critical for the success of the procedure. Therefore try not to shake the culture plates accidentally when placing them in the incubator or transporting them back to the culture hood.

8. EC medium should be changed at least once every 3 days and always with extreme care to avoid detaching the artery explants. Cell colonies should start to appear before day 7; however, due to technical variability, this can take up to 2 weeks.

9. ECs need to be cultured on gelatin-coated plates. The plates can be prepared as follows: pour gelatin coating solution (see item # 23 in Materials) into each well to

cover the surface (0.5 ml per well for a 24-well plate), place the plates for at least 1 hour at 37°C in a cell culture incubator, and remove the leftover of gelatin by aspiration just before using the plates.

10. ECs are not the most abundant cell type in the aorta, and their proliferation rate is relatively low compared with other cells from the same blood vessel. To ensure a reasonable yield of ECs at the end of the procedure, it is advisable to expand the culture as much as possible before selection. However, it is also important to consider that the other cell types present in the culture can colonize the plate before ECs. In our hands, a good quantity of ECs is obtained by expanding the cells until 60-70% confluence before selection.

11. ECs can be selected with different antibodies (e.g. CD102, CD31, CD106, or CD146) with similar results. Before choosing an antibody, check that it is optimal for your particular set of experiments. The procedure described here is based on selection with an antibody to CD102, which is specifically expressed in ECs and leukocytes. However, this antibody may not be appropriate if you do not work in an inflammatory context, because expression of CD102 is very low in aorta in basal conditions.

12. Although low temperatures can be harmful to cultured cells, we have found that the final yield of viable ECs increases if the incubation with the specific primary antibody is performed at 4°C. This temperature improves recognition of the specific antigen at the cell surface and avoids loss of efficiency due to antibody internalization.

13. In addition to selection with magnetic beads as described here, many other systems are available for selection of a specific cell population from a mixture of cell types, for example, use of fluorescent-labeled antibodies followed by flow cytometry sorting.

14. With prolonged time in culture, primary ECs undergo processes of cell senescence and dedifferentiation, and therefore should not be used for in vitro studies after more than 7-8 passages.

## **Acknowledgements**

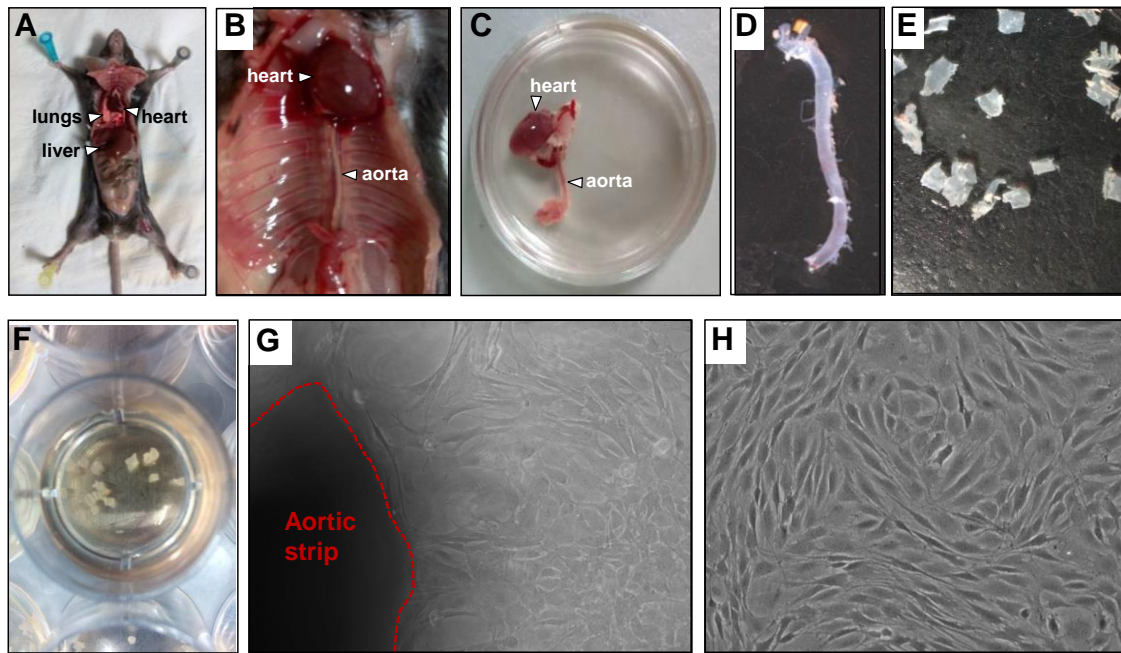
We thank Simon Bartlett for English editing. Work in V.A.'s laboratory is supported by grants from the Spanish Ministry for Economy and Competitiveness (MINECO) (SAF2013-46663-R), the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), the Instituto de Salud Carlos III (RD12/0042/0028), the Progeria Research Foundation (Innovator Award 2012, Established Investigator Award 2014), and the European Union (Liphos, Grant Agreement 317916). P.M-S. is supported by an FPU predoctoral fellowship from MINECO. The Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) is supported by the MINECO and the Pro-CNIC Foundation.

## **References**

1. Pober, J. S., and Sessa, W. C. (2007) Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol* 7, 803-815

2. Félétou, M. (2011) Chapter 4: Endothelium-Dependent Regulation of Vascular Tone. *The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators* Morgan & Claypool Life Sciences
3. van Hinsbergh, V. W. (2012) Endothelium--role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol* 34, 93-106
4. Wu, K. K., and Thiagarajan, P. (1996) Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu Rev Med* 47, 315-331
5. Libby, P., Ridker, P. M., and Hansson, G. K. (2011) Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473, 317-325
6. Hansson, G. K. (2005) Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352, 1685-1695
7. Spiers, A., and Padmanabhan, N. (2005) A guide to wire myography. *Methods Mol Med* 108, 91-104
8. Alva, J. A., Zovein, A. C., Monvoisin, A., et al. (2006) VE-Cadherin-Cre-recombinase transgenic mouse: a tool for lineage analysis and gene deletion in endothelial cells. *Dev Dyn* 235, 759-767
9. Terry, R. W., Kwee, L., Baldwin, H. S., et al. (1997) Cre-mediated generation of a VCAM-1 null allele in transgenic mice. *Transgenic Res* 6, 349-356
10. Licht, A. H., Raab, S., Hofmann, U., et al. (2004) Endothelium-specific Cre recombinase activity in flk-1-Cre transgenic mice. *Dev Dyn* 229, 312-318
11. Gothert, J. R., Gustin, S. E., Hall, M. A., et al. (2005) In vivo fate-tracing studies using the Scl stem cell enhancer: embryonic hematopoietic stem cells significantly contribute to adult hematopoiesis. *Blood* 105, 2724-2732
12. Gustafsson, E., Brakebusch, C., Hietanen, K., et al. (2001) Tie-1-directed expression of Cre recombinase in endothelial cells of embryoid bodies and transgenic mice. *J Cell Sci* 114, 671-676
13. Kisanuki, Y. Y., Hammer, R. E., Miyazaki, J., et al. (2001) Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Dev Biol* 230, 230-242

**Figure 1**



**Figure 1. Steps in mouse aortic endothelial cell extraction and culture.**

A. Dissection of the animal to expose the thoracic and abdominal cavities. B. Isolation of the aorta and heart in the thoracic cavity. C. Petri dish containing aorta and heart in saline solution or PBS. D. Cleaned aorta. E. Aortic strips in a Petri dish. F. Aortic strips in Matrigel-coated plates. G. Migration of primary cell from an aortic strip (outlined by the red dashed line) onto the surface of the culture plate. H. Confluent EC monolayer.



