



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Animal

TESIS DOCTORAL:
IDENTIFICACIÓN DE CEPAS CONSANGUÍNEAS DE ROEDORES COMO
MODELOS PARA ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Presentado por Don Alejandro López García para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Málaga


Director:
Francisco Borja Fernández Corujo
Málaga, Enero 2017





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Alejandro López García

 <http://orcid.org/0000-0002-2864-3433>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Dr. Francisco de Borja Fernández Corujo, Profesor Titular de Biología Animal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

ACREDITA:

Que Don Alejandro López García, Licenciado en Biología por la Universidad de Málaga, ha realizado las investigaciones de la presente memoria de Tesis Doctoral en el Departamento de Biología Animal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga. Dicha tesis lleva por título: “IDENTIFICACIÓN DE CEPAS CONSANGUÍNEAS DE ROEDORES COMO MODELOS PARA ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES”.

Que como director de la misma, considero que la presente memoria reúne todos los requisitos para ser presentada como tesis por compendio de publicaciones y que las publicaciones que avalan la tesis no han sido utilizadas en tesis anteriores. Por consiguiente, esta memoria puede ser sometida a juicio de la comisión correspondiente, por lo que autorizo su exposición y defensa para la obtención del grado de Doctor.

Y para que conste a efectos de lo establecido en el artículo 18 del Real Decreto 1993/2007, regulador de las Enseñanzas de Doctorado, autorizo la defensa de esta Memoria de Tesis Doctoral.

Málaga, Enero de 2017

Prof. Dr. Francisco de Borja Fernández Corujo



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

A mis padres
A mi hermana
A Cristina



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Agradecimientos

Esta tesis doctoral, si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación por parte del autor y su director de tesis, no hubiese sido posible su finalización sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación citaré y muchas de las cuales han sido un soporte muy fuerte en momentos de angustia y desesperación.

Agradecer en primer lugar a mi director de tesis, el Prof. Dr. Francisco de Borja Fernández Corujo, por acogerme en mis inicios como investigador y guiarme de manera desinteresada y generosa a lo largo de todos estos años. Sin su orientación y apoyo esta tesis no hubiera sido posible. Su papel de trabajador incansable me ha hecho sinceramente ser consciente de los esfuerzos que ha realizado para que pueda formarme durante estos años de una manera digna, y me siento realmente agradecido y orgulloso de haber formado parte de su grupo de investigación durante estos años.

A la Prof.^a Dra. Ana Carmen Durán Boyero por transmitirme con cariño sus enseñanzas sobre histología, fotografía científica y otras técnicas. Y porque a lo largo de estos años ha crecido en mí una profunda admiración hacia su persona y ha sido referente en lo profesional.

Al Prof. Dr. Valentín Sans Coma, por sus consejos y fascinante conversación. Por su ayuda en la elaboración de estos trabajos y por ser una figura ejemplar en lo profesional desde mis inicios como estudiante de Biología hasta estos últimos como investigador.

Agradecimiento también a los profesores del Departamento de Biología Animal de la Universidad de Málaga.

Al Prof. Dr Luis Javier Palomo Muñoz, por su amabilidad y predisposición ejemplar y sincera dentro y fuera del ámbito profesional.

A los Profs. Dra. Carmen Salas Casanova por su insistencia cariñosa en los momentos difíciles de dudas y desánimo y al Dr. Ramón Muñoz-Chapulli por su ayuda generosa en las primeras etapas de mi tesina.

Mi gratitud, para el Prof. Dr. Antonio de Vicente, del Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga, por haberme escuchado y aconsejado en la toma de decisiones trascendentales en mi futuro profesional y personal, transmitiendo su ilusión para despertar en mí el entusiasmo por la investigación.

De forma muy especial quiero dejar constancia de mi agradecimiento a la Dra. María Carmen Fernández Domínguez, investigadora del Grupo “Estudios Cardiovasculares en Vertebrados”, por su inestimable ayuda incondicional para la elaboración de este trabajo y porque trabajar codo con codo junto a ella ha sido un auténtico placer, y estoy seguro que lo echaré de menos en el futuro.

Al resto de compañeros que forman o han formado parte del Grupo de Investigación “Estudios Cardiovasculares en Vertebrados” en especial, J. Manuel Márquez, Javier Moncayo, Cristina Rodríguez y Agustina Torres porque con ellos he compartido momentos de alegrías y tristeza pero siempre ha sido un apoyo del que coger fuerzas. Por supuesto, también quisiera agradecer a Alejandro, Andrea, Miguel Lorenzale, Miguel Unzu, Mari Tere y Ángela haberme dejado formar parte en sus inicios, acogiendo con gratitud mis elementales consejos y dejándome aprender de ellos renovadoras ideas.

A D. Luis Vida, por su ayuda en el día a día, siendo pilar indispensable en el buen funcionamiento de este grupo. A D. José Zamora por ser tan profesional y servicial en cualquier momento.

A D. David Navas del Servicio de Microscopía Confocal y Citometría del S.C.A.I por ser tan comprensivo después de cientos de pruebas.

Finalmente me gustaría dar las gracias desde lo más profundo de mi corazón a mi familia y a mi mujer. A mis padres por su entrega altruista durante todos mis años de formación. Porque la educación y valores que me han transmitido me han hecho ser una persona afortunada y agradecida. Y porque espero que este trabajo pueda devolverles una ínfima parte de gratitud por todo el esfuerzo realizados por ellos. A mi hermana por su apoyo y porque aunque hoy una larga distancia nos separa, cada día que pasa te siento más cerca y más te echo de menos.

Y por supuesto, a mi esposa Cristina, mi más sentido agradecimiento y todo mi amor. Por su inestimable apoyo y comprensión para sobrellevar los duros momentos de desánimo. Espero con todo deseo encontrar la manera de recompensarle las horas que no he podido dedicarle la atención que se merece.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Índice



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

I. La estructura de esta tesis.....	1
II Introducción.....	5
1. Modelos animales.	7
2. Tres modelos animales de investigación cardiovascular. Contexto histórico.....	11
2.1. Contexto histórico en el que se desarrolla esta tesis.....	11
2.2. Hitos de investigación para el desarrollo de esta tesis.....	12
2.3. Tres modelos animales de investigación cardiovascular.....	15
2.3.1. El modelo de ratones doble mutantes, deficientes en ApolipoproteínaE y Osteoglicina.....	15
2.3.2. El modelo consanguíneo de ratones con anomalías congénitas en el origen de las arterias coronarias.....	19
2.3.3. El modelo consanguíneo de hámsteres con anomalías congénitas de las válvulas semilunares.....	22
III. Objetivos.....	25
IV. Resumen global de los resultados y la discusión.....	29
<u>Publicación 1</u> Osteoglycin deficiency does not affect atherosclerosis in mice.....	31
<u>Publicación 2</u> Unusual anatomical origins of the coronary arteries in C57BL/6 mice. Are they strain specific?.....	35
<u>Publicación 3</u> Quadricuspid aortic valves in Syrian hamsters and their formation according to current knowledge on valvulogenesis	39
Ventajas y limitaciones de los modelos animales estudiados	43
V. Conclusiones finales.....	49

VI. Publicaciones. 53

Publicación 1 Osteoglycin deficiency does not affect atherosclerosis in mice. 55

Javier Moncayo-Arlandi, Alejandro López-García, M. Carmen Fernández, Ana Carmen

Durán, Borja Fernández (2014) *Atherosclerosis* 237 418-425.

Publicación 2 Unusual anatomical origins of the coronary arteries in C57BL/6 mice.

Are they strain specific?..... ' (

Alejandro López-García, M. Teresa Soto-Navarrete, M. Carmen Fernández, Javier Moncayo-Arlandi, Ana Carmen Durán, Miguel A. López-Unzu, Juan H. Alonso-Briales, Borja Fernández

(2014) *Journal of Anatomy* 229(5):418-425.

Publicación 3 Quadricuspid aortic valves in Syrian hamsters and their formation according to current knowledge on valvulogenesis ')

Alejandro López-García, M. Carmen Fernández, Ana Carmen Durán, Valentín Sans-Coma,

Borja Fernández (2015) *Japanese Journal of Veterinary Research* 63(1):37- 43

VII. Bibliografía..... ' +

I. La estructura de la tesis



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

El formato de esta tesis es por compendio de publicaciones, con tres textos centrales que se corresponden, cada uno, con una publicación (Capítulo VI). De acuerdo con lo establecido para este formato de tesis, se ha hecho preceder dicho capítulo por una introducción general para el conjunto del trabajo (Capítulo II), seguida de los objetivos (Capítulo III) y sendos resúmenes de los resultados y la discusión detallados en las tres publicaciones (Capítulo IV), así como un capítulo de conclusiones (Capítulo V). Aunque cada publicación se acompaña de su propia bibliografía, al final de la tesis se incluye una sección bibliográfica (Capítulo VII) que recoge las referencias para los cinco primeros capítulos.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

II. Introducción



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Modelos animales

Uno de los ámbitos científicos en los que el uso de modelos animales ha supuesto un particular progreso para la investigación es la biomedicina. Los modelos animales de enfermedad, en los que los individuos manifiestan una enfermedad o patología similar a la que se presenta en el hombre, han supuesto avances clave para el descubrimiento de factores etiológicos, fisiopatológicos y terapéuticos de las enfermedades. Mucho de lo que conocemos hasta el momento sobre las enfermedades humanas procede de la investigación básica y preclínica, en la que los modelos animales han sido indispensables para los avances terapéuticos. Los modelos animales proporcionan un control genético y experimental preciso, y también proporcionan una ruta para descubrir y validar la prevención y el tratamiento de enfermedades.

Los modelos animales de pequeño tamaño, sobre todo los roedores y, en particular, los ratones, han sido y siguen siendo los más utilizados en la investigación biomédica. Los roedores son susceptibles a muchos de los problemas de salud que afectan a los seres humanos. Tienen un ciclo de vida más corto y, como resultado, se pueden estudiar a lo largo de toda su vida o en varias generaciones. Los científicos pueden controlar fácilmente el entorno alrededor de los animales (dieta, temperatura, iluminación). Además, suelen ser de fácil disponibilidad, tienen un bajo coste de mantenimiento y el impacto ético es menor frente al uso de modelos animales de mayor tamaño. Un aspecto de especial relevancia que favorece el empleo de los roedores como modelos animales, sobre todo el ratón de laboratorio, es la buena caracterización de su anatomía, fisiología, embriología, genética, etc. En realidad, cuanto más se conoce sobre un animal, más útil resulta éste como modelo.

Las colonias de roedores para la experimentación se mantienen en los institutos de investigación formando cepas o líneas de animales de laboratorio. Desde un punto de vista genético, las cepas de animales de laboratorio se clasifican en 1) cepas o líneas consanguíneas, isogénicas, endogámicas o endocriadas (“inbred strains”) y 2) cepas o líneas no consanguíneas, no isogénicas, exogámicas o exocriadas (“outbred strains” o “stocks”).

Las cepas consanguíneas están compuestas por animales genéticamente estandarizados. Se desarrollan mediante cruzamientos endogámicos (hermano con hermana o, eventualmente, padre/madre con cría) durante 20 o más generaciones consecutivas, hasta hacerse isogénicas, es decir, todos los individuos de una misma cepa son homocigotos para la mayoría de sus alelos (se comportan genéticamente como clones) (Festing, 1979, 1993). Estos animales se caracterizan por tener la misma composición genética, ser uniformes fenotípicamente y ser sensibles a cambios del ambiente. Asimismo, los individuos de dos cepas distintas tienen una composición alélica (fondo genético) diferente, lo que lleva asociado diferencias fenotípicas y de susceptibilidad ambiental. La homogeneidad genética de los animales que conforman una cepa consanguínea permite que la composición genética no tenga que ser considerada como una variable contundente en las investigaciones, por lo que la variabilidad de los resultados de las investigaciones solo se puede deber a factores ambientales o metodológicos. Esto confiere dos características clave a este tipo de cepas. Por un lado, reduce al mínimo la variabilidad de los resultados experimentales y, por otro lado, hace posible la comparación de resultados experimentales entre animales de diferentes laboratorios. La asociación de las características genotípicas y fenotípicas fijadas en cada cepa genera una individualidad en relación a sus cualidades, particularidad que deberá tomarse en cuenta en el momento de elegir el modelo para un trabajo de investigación.

Las cepas o líneas no consanguíneas se desarrollan mediante cruzamientos entre animales no emparentados, lo que favorece la heterocigosis genética y minimiza la endogamia, que normalmente no debe exceder el 1% por generación. Las poblaciones fundadoras deben ser lo suficientemente grandes para asegurar la heterogeneidad de las colonias a largo plazo, que se mantienen mediante apareamientos al azar usando al menos 25 pares reproductores por generación. Estos animales son los que mejor representan la variabilidad genética de una población natural, por lo que se han utilizado ampliamente en la investigación biomédica, sobre todo en los ámbitos de la toxicología y la farmacología.

Los modelos animales biomédicos de enfermedad se pueden definir como aquellos en

los que se desarrolla espontánea o experimentalmente una situación patológica similar o equivalente a una patología humana. Dependiendo de su origen, estos modelos pueden ser espontáneos o inducidos. En los primeros, los animales desarrollan enfermedades o afecciones similares a los humanos de manera espontánea, mientras que en los segundos, las patologías se inducen mediante manipulación genética, quirúrgica o de cualquier elemento ambiental.

Los modelos espontáneos son especialmente útiles para estudiar las causas subyacentes o la etiología de las enfermedades. A diferencia de los modelos inducidos, la aparición de una enfermedad en un modelo espontáneo tiene una causa natural, que suele afectar de manera similar a diferentes especies. Existen numerosos ejemplos de modelos animales espontáneos que han ayudado a conocer las causas etiológicas de enfermedades humanas (Hau, 2008). Uno de ellos es el modelo de hámsteres con malformaciones valvulares (Fernández et al., 2009), utilizado para la realización de la presente tesis, que se comentará más adelante.

Los modelos inducidos, por su parte, son útiles para investigar la fisiopatología de las enfermedades y para testar estrategias terapéuticas. Los modelos inducidos por manipulación genética, sobre todo ratones, tienen una utilidad adicional: investigar el papel de proteínas específicas en los procesos patogenéticos. Los animales “knockout”, deficientes en una proteína, son especialmente importantes en este contexto, al poner de manifiesto un fenotipo (enfermedad) causado por la ausencia de una proteína, constituyendo modelos relevantes para enfermedades genéticas humanas causadas por mutaciones de pérdida de función. Una utilidad adicional de los modelos knockout reside en la posibilidad de generar animales doble mutantes, mediante cruces entre cepas de ratones deficientes en proteínas diferentes. En muchos casos se utiliza una de las mutaciones para generar un modelo de enfermedad y la otra para explorar el papel de una proteína en esa enfermedad. Los modelos de aterosclerosis son buenos ejemplos del empleo de animales doble mutante en investigaciones biomédicas de enfermedades humanas. Los ratones knockout para la ApolipoproteínaE desarrollan aterosclerosis de manera espontánea. Al cruzarlos con ratones knockout para otra proteína se obtienen, en la segunda generación, ratones doble mutante homocigotos,

que desarrollan aterosclerosis en ausencia de la proteína de interés (Jawien et al., 2004; Glass and Witztum, 2001), lo que permite explorar el papel de proteínas específicas en la aterogénesis.

La bondad de un modelo animal viene determinada por la capacidad de extrapolar los resultados obtenidos con ese modelo a la especie humana. La extrapolabilidad está limitada por las diferencias inter-específicas, es decir, diferencias biológicas entre la especie humana y otras especies. Por ejemplo, el corazón del ratón late entre 300-600 veces por minuto frente a la franja aproximada de 60-150 latidos por minutos en el humano. Esta y otras muchas características deben ser tenidas en cuenta cuando se pretende extrapolar los resultados obtenidos a partir de un modelo animal al hombre. Incluso cuando podemos asegurar que no existen diferencias inter-específicas o estas son insignificantes para un rasgo específico o proceso biológico, debemos considerar otras posibles restricciones intrínsecas de nuestro modelo animal. Una de ellas puede denominarse diferencias intra-específicas y se refiere a las diferencias biológicas entre individuos pertenecientes a diferentes poblaciones de la especie modelo. Las diferencias intra-específicas son particularmente relevantes en la investigación biomédica, donde la mayoría de los estudios que involucran modelos animales se basan en unas pocas cepas endogámicas de ratón de laboratorio. Por definición, una cepa endogámica (isogénica) es la población animal con la menor variación posible genética y fenotípica, ya que, como se ha comentado anteriormente, cada cepa es genéticamente uniforme, con todos los animales portando el mismo genotipo, siendo comparable a clones (Festing, 1979, 1993). Por lo tanto, cuando extrapolamos los resultados experimentales obtenidos con una cepa endogámica a la especie humana, estamos comparando una población muy uniforme y genéticamente restringida, con el amplio espectro de genotipos y la heterogeneidad de las poblaciones humanas.

2. Tres modelos animales de investigación cardiovascular. Contexto histórico

2.1. Contexto histórico en el que se desarrolla esta tesis

El grupo de investigación con el que he podido colaborar y formarme durante varios años, en el seno del cual he tenido la posibilidad de realizar esta tesis doctoral, recibe el nombre de “Estudios Cardiovasculares en Vertebrados” y está adscrita al Departamento de Biología Animal de la Universidad de Málaga. La actividad investigadora del grupo se centra en el sistema cardiovascular, utilizando modelos animales relevantes para estudios de índole zoológica, evolutiva y biomédica. Durante el tiempo de realización de esta tesis he colaborado, en mayor o menor grado, en la realización de trabajos sobre diversos temas de índole biomédico, utilizando dos modelos animales, el ratón de laboratorio (*Mus musculus*) y el hámster sirio (*Mesocricetus auratus*), lo que ha dado finalmente lugar a esta tesis por compendio de publicaciones. A continuación resumiré la historia del grupo de investigación, con la intención de clarificar el origen de los modelos animales, los objetivos generales de la investigación con estos modelos y el contexto en el que se llevó a cabo esta tesis.

El origen de las investigaciones del grupo data de los años 80 del siglo pasado, cuando se inició el estudio de los patrones arteriales coronarios normales de especies de roedores de vida libre, incluyendo también algunas especies de uso común en el laboratorio, como el hámster sirio y el ratón de laboratorio (Duran AC, 1990). Además de describir los distintos patrones arteriales coronarios normales que aparecen en las distintas especies, este estudio puso de manifiesto la existencia de patrones anómalos en el hámster, lo que suscitó un especial interés desde el punto de vista biomédico (Arqué et al. 1985, 1986, 1989; Sans-Coma et al. 1988). Se diseñó un protocolo de cruces entre varios ejemplares de hámster con el objetivo de averiguar si los diversos patrones arteriales coronarios estaban sujetos a un determinado modelo hereditario. En el curso de estos estudios, se detectaron algunos casos de anomalías congénitas de las válvulas semilunares con relevancia clínica para el ser humano, confirmándose su heredabilidad y su asociación con las anomalías coronarias (Arqué

et al. 1993; Fernández et al. 1994; Sans-Coma et al. 1991, 1992, 1993a). Durante las siguientes dos décadas, una buena parte de las actividades del grupo se ha dedicado al estudio de la anatomía, la patología, la histología, la embriología y la etiología de las anomalías congénitas de las válvulas semilunares y las arterias coronarias y al desarrollo de modelos animales relevantes (Cardo et al. 1994, 1995; Sans-Coma et al. 1994, 1996, 2005, 2012; Franco et al. 1994; Durán et al. 1995, 1998, 2005, 2006, 2007, 2009, 2012; Fernández et al. 1994, 1998, 1999, 2000, 2008, 2009, 2012).

2.2. Hitos de investigación para el desarrollo esta tesis

Respecto al desarrollo de la presente Tesis Doctoral, hay tres hitos en la historia del grupo que han hecho posible su realización:

Como se acaba de comentar, una de las actividades principales del grupo de investigación fue el desarrollo de modelos animales relevantes para la investigación cardiovascular. El primero de estos modelos fue una cepa consanguínea de hámsteres, caracterizada por presentar una elevada incidencia de anomalías congénitas de las válvulas semilunares y de las arterias coronarias. La anomalía valvular más frecuente en esta cepa era la válvula aórtica bicúspide (VAB) que, de hecho, constituye la malformación cardíaca congénita más frecuente en el ser humano. En este contexto se llevaron a cabo estudios sobre el desarrollo embrionario de la VAB, para lo que se examinaron los primordios valvulares de un considerable número de embriones de hámster de la cepa afecta. En un embrión en particular se detectaron defectos en los primordios valvulares que no se correspondían con el patrón de formación de una VAB, sino que parecían corresponderse con el de una válvula aórtica cuadrícúspide (VAC). Este hallazgo dio lugar a la publicación de un artículo científico en el que se proponía un posible mecanismo morfogénético responsables de la VAC (Fernández et al. 1994). Años más tarde, se describió otro embrión anómalo que reforzaba la hipótesis propuesta (Fernández et al. 1999).

Un hándicap de esta hipótesis es sin duda la escasez de evidencias sobre las que se sustenta, tan solo dos embriones representando dos estadios embrionarios concretos. Aunque este hándicap es asumible, ya que los estudios morfogénéticos sobre defectos

congénitos raros cuentan, por definición, con pocas evidencias empíricas, la falta de datos sobre la anatomía adulta de esta malformación valvular en el hámster dejaba un hueco en el puzzle del conocimiento sobre la etiología de la VAC. Este ha sido el punto de partida para uno de los estudios que conforma la presente tesis (Publicación 3), cuyo objetivo es identificar válvulas aórticas con morfología cuatricúspide en el hámster, describir su anatomía e interpretar su origen embriológico en base a la hipótesis propuesta. Este estudio ha sido posible merced a la preservación y registro de gran parte de las válvulas semilunares de los hámsteres desarrollados por el grupo en los últimos años.

Otro hito del grupo de investigación respecto al planteamiento de esta tesis fue la adquisición de un segundo modelo animal para investigaciones cardiovasculares. Se trata de una cepa de ratones modificados genéticamente (knockout), deficientes en la glicoproteína Osteoglicina/Mimecan (Ogn).

Algunos estudios previos sugerían que la Ogn juega un papel en el proceso aterosclerótico (Shanahan et al., 1997; Fernandez et al., 2003; Strom et al., 2004). La disponibilidad de los ratones deficientes en Ogn (Ogn-ko) permitió plantear un estudio sobre el efecto de la ausencia de esta glicoproteína en el desarrollo de la aterosclerosis, utilizando un modelo experimental de inducción de la enfermedad. Este constituye el objetivo general de otro de los estudios que conforman la presente tesis (Publicación 1). La estrategia experimental consistió en la generación de un modelo de ratones doble mutantes (ApoE/Ogn-ko), mediante el cruzamiento entre ratones ApoE-ko y Ogn-ko, seguido del análisis cualitativo y cuantitativo de la progresión de las lesiones ateróscleróticas (tamaño y composición) en ratones doble mutantes (ApoE/Ogn-ko) y ratones control (ApoE-ko).

El tercer hito que ha hecho posible la realización de la presente tesis tiene que ver con el estudio que se acaba de plantear, sobre los ratones Ogn-ko. Trabajos previos con este modelo habían puesto de manifiesto que, aunque Ogn es particularmente abundante en la matriz extracelular de la piel, la córnea o la cóclea, estas estructuras presentan una anatomía e histología normales en los ratones Ogn-ko (Tasheva et al., 2002; Beecher et al., 2005; Williamson et al., 2008). Sin embargo, un estudio en

particular mostró que, a nivel ultraestructural, las fibras de colágeno de la piel de los ratones mutantes mostraban un grosor alterado, lo que resultaba en una reducción de la resistencia a la tracción (Tasheva et al., 2002). Este estudio demostraba que al menos un fenotipo asociado a la ausencia de Ogn era detectable solo bajo condiciones experimentales o de estrés. Por un lado, estos datos justificaban más aun el estudio del efecto de la ausencia de Ogn en una situación de estrés del sistema vascular como es la aterosclerosis. Por otro lado, se hacía imperativo realizar un examen fenotípico del sistema vascular, en general, y de las arterias en las que se pretendía evaluar las lesiones ateromatosas (aorta ascendente, cayado aórtico y arterias coronarias), en particular, a fin de validar el modelo animal para estudios sobre aterosclerosis.

El estudio preliminar sobre el fenotipo vascular de los ratones Ogn-ko puso de manifiesto que la anatomía e histología generales del sistema cardiovascular, incluyendo el corazón, las arterias torácicas y abdominal, los sistemas porta hepático y renal y el sistema vascular de las extremidades, eran normales, similares a la de los ratones control (salvajes, cepa C57BL/6). Sin embargo, se detectaron anomalías congénitas en el origen de las arterias coronarias en algunos ratones Ogn-ko. Estas anomalías aparecen también en la especie humana y, aunque ocurren con una baja incidencia, confieren cierto riesgo a los portadores de sufrir muerte súbita cardiaca.

Pronto se comprobó que, en el modelo murino, estas anomalías no aparecían exclusivamente en los ratones Ogn-ko, sino que también estaban presentes en los animales control (hermanos de camada no mutantes). Es decir, las anomalías detectadas no se asociaban a la mutación, sino al fondo genético C57BL/6 de los ratones Ogn-ko.

En estudios sucesivos se describieron con detalle las diferentes anomalías coronarias y se cuantificó su incidencia en la cepa C57BL/6 (Fernandez et al., 2008). Los resultados de este estudio mostraban su relevancia a dos niveles: 1) se presentaba un modelo animal espontáneo (cepa C57BL/6) apropiado para el estudio de la etiología de anomalías congénitas de las arterias coronarias con relevancia clínica; 2) se advertía a los investigadores del sistema arterial coronario que existen diferencias en el patrón coronario entre cepas de ratones de laboratorio, lo que, de no tenerse en cuenta, puede llevar a malinterpretaciones de los resultados de la investigación.

Parece evidente que la utilidad del hallazgo de anomalías coronarias en ratones de la cepa C57BL/6 pasaba por elucidar si estas anomalías están presentes en otras cepas de ratón de laboratorio o si, por el contrario, son exclusivas de la cepa C57BL/6. Este ha sido el objetivo principal del tercer estudio (Publicación 2) que completa el compendio de publicaciones que constituye la presente tesis.

2.3. Tres modelos animales de investigación cardiovascular

A continuación, una vez resumido el contexto histórico en el que se ha desarrollado la investigación de la presente tesis, se introducen, con más detalle, los modelos animales utilizados. También se introducen los conceptos básicos necesarios para plantear los estudios correspondientes a las tres publicaciones que conforman el compendio. Por lo tanto, los siguientes párrafos sirven como introducción de las tres publicaciones, cuyos principales resultados y su discusión se han resumido en el capítulo IV.

Cabe aclarar que el orden de los estudios que se introducen a continuación se corresponde con el de los capítulos IV (Resumen global de los resultados y la discusión), V (Conclusiones finales) y VI (Publicaciones). Sin embargo este orden es distinto del seguido en los párrafos anteriores sobre el contexto histórico, en los que se ha pretendido exponer cómo, en qué orden y por qué se desarrollaron las investigaciones a las que se refiere esta tesis.

2.3.1.- El modelo de ratones doble mutantes, deficientes en ApolipoproteínaE y Osteoglicina (Publicación 1)

La familia de proteoglicanos pequeños ricos en leucina (“small leucine-rich proteoglycans”, SLRP) se compone de 18 miembros de proteínas de la matriz extracelular. Cada SLRP consta de dos componentes estructurales principales, un núcleo proteico conservado y numerosas cadenas laterales de diferentes tipos de glicosaminoglicano: condroitín, keratán, dermatán o heparán-sulfato (Iozzo et al., 1997; Hocking et al., 1998; Iozzo, 1998). La proteína del núcleo contiene un número variable de repeticiones ricas en leucina (LRRs), que consisten en la secuencia de consenso LXXLXLXXNXL, donde X es cualquier aminoácido, L es

leucina, isoleucina o valina, y N es asparagina, cisteína o treonina. Las LRRs están generalmente flanqueadas por secuencias de cuatro residuos de cisteína en el extremo N-terminal y de dos residuos de cisteína en el extremo C-terminal. Basado en el número de LRRs, de la separación de los residuos de cisteína N-terminal y de la organización de los genes que codifican para las diferentes SLRPs en los cromosomas, esta familia de proteínas se ha dividido en cinco clases (Tabla 1) (Iozzo et al., 1999; Henry et al., 2001).

Tabla 1. Clasificación de las SLRPs.

Class I	Class II	Class III	Class IV	Class V
Biglycan	Fibromudilin	Epiphycan	Chondroadherin	Podocan
Decorin	Lumican	Opticin	Nyctalopin	Podocan like protein1
Asporin	PRELP	Osteoglycin	Tsukushi	
ECM2	Keratocan			
HCMX	Osteondherin			

Extraído de Iozzo et al., 1999; Henry et al., 2001.

Los diferentes miembros de la familia SLRP tienen funciones comunes en la regulación de la homeostasis de la matriz extracelular (ECM) y el remodelado tisular. Cabe destacar su función reguladora en la fibrillogénesis del colágeno y en la disponibilidad de citoquinas en la matriz. Como en el caso de otras SLRPs, la Ogn es un componente de la ECM que tiene como funciones principales regular la fibrillogénesis del colágeno tipo I. Ogn es particularmente abundante en la matriz extracelular de la piel, la córnea o la cóclea. Sin embargo, estas estructuras presentan una anatomía e histología normales en los ratones mutantes Ogn-ko (Tasheva et al., 2002; Beecher et al., 2005; Williamson et al., 2008). No obstante, un estudio en

particular mostró que, a nivel ultraestructural, las fibras de colágeno de la piel de los ratones mutantes mostraban un grosor alterado, lo que resultaba en una reducción de la resistencia a la tracción (Tasheva et al., 2002). Este estudio demostraba que al menos un fenotipo asociado a la ausencia de Ogn era detectable solo bajo condiciones experimentales o de estrés.

La Ogn también es abundante en el sistema vascular, sobre todo en la adventicia y media de vasos normales y de lesiones ateroscleróticas y restenóticas en humanos y en algunos modelos animales (Shanahan et al., 1997; Fernandez et al., 2003; Strom et al., 2004). En el sistema vascular, la Ogn interviene en la regulación, no solo de la fibrillogénesis del colágeno, sino también de la proliferación de las células musculares lisas. Se ha comprobado que, durante la progresión de la aterosclerosis, Ogn cambia de localización y de nivel de expresión en lesiones de conejos. Esta serie de datos sugiere que Ogn juega un papel relevante en el proceso aterosclerótico.

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica de los vasos sanguíneos que se caracteriza por la acumulación de lípidos y elementos fibróticos, formando la placa aterosclerótica, que aparece en la parte más interna de los vasos. Esta inflamación suele desarrollarse en las arterias del corazón (coronarias), cerebro (carótidas y cerebrales) y extremidades inferiores (ilíaca y femoral) produciendo complicaciones en dichos órganos. Tales complicaciones pueden producirse de manera crónica, como la estenosis (disminución progresiva de la luz del vaso) o de manera aguda, como la trombosis (por la rotura de una placa aterosclerótica) que provocan isquemia en los tejidos que irrigan (Lahoz and Mostaza, 2007). Se trata de la primera causa de enfermedad cardíaca en occidente (Lusis, 2000). En España mueren cada año 124000 personas como consecuencia directa o indirecta de la enfermedad (Lahoz and Mostaza, 2007).

Uno de los avances más notables en la investigación de la aterosclerosis ha sido la creación de modelos animales capaces de reproducir algunas características clínicas y fisiopatológicas de la enfermedad humana. Se trata, sin duda, de una herramienta de investigación fundamental para entender la enfermedad y para avanzar en el diseño y ensayo de nuevas estrategias terapéuticas. La primera evidencia de que la aterosclerosis

podía ser inducida en animales de laboratorio fue demostrado por Ignatowski en 1908, quien demostró la formación de lesiones en la pared aórtica de conejos sometidos a una dieta rica en proteína animal (leche entera, huevos y carne). Desde entonces, varias especies de animales han sido utilizadas como modelo experimental de aterosclerosis incluyendo ratones, ratas, cerdos, hámsteres, perros y primates. Sin embargo, algunas de estas especies tales como la rata y el ratón son especialmente resistentes al desarrollo de aterosclerosis, apareciendo en ellos únicamente pequeñas lesiones, correspondientes a estados iniciales de la enfermedad (Jawien et al., 2004; Ohashi et al., 2004). Como alternativa a la estrategia de inducción mediante dietas, se han desarrollado diferentes modelos de animales modificados genéticamente, en los que la aparición y la progresión, hasta estadios finales, de lesiones ateroscleróticas, se produce de manera espontánea, sin necesidad de aportar dietas específicas (Jawien et al., 2004). El modelo de ratón aterosclerótico deficiente en ApolipoproteínaE (ApoE-ko) es uno de los más usados para el estudio de esta enfermedad. El gen *ApoE* genera la ApolipoproteínaE, glicoproteína presente en las partículas de quilomicrones y las partículas de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) circulantes en sangre. Esta glicoproteína permite el empaquetamiento del colesterol y los triglicéridos y media la endocitosis de estas partículas en el hígado. La ausencia de la proteína ApoE provoca la acumulación en sangre de estas partículas, lo que genera la aterosclerosis espontánea en los ratones mutantes (Zhang et al., 1992).

El cruzamiento de ratones ApoE-ko con ratones mutantes para otros genes, obteniendo así ratones doble mutante, ha constituido una estrategia experimental muy usada durante las últimas décadas para investigar el papel (pro- o anti-aterosclerótico) de diversas proteínas en la aterogénesis (Jawien et al., 2004; Glass and Witztum, 2001). Esta ha sido la estrategia utilizada en el presente estudio para explorar el papel de Ogn en la aterosclerosis: investigar el efecto de la ausencia de Ogn sobre la progresión de la aterosclerosis en ratones ApoE/Ogn-ko. Una ventaja adicional de esta estrategia es que la caracterización de la evolución de las lesiones ateromatosas en los ratones ApoE-ko está bastante estandarizada, lo que ha facilitado el estudio comparativo de la evolución de las lesiones entre ratones ApoE/Ogn-ko y ratones control (ApoE-ko).

2.3.2.- El modelo consanguíneo de ratón con anomalías congénitas en el origen de las arterias coronarias (Publicación 2)

Las arterias coronarias son las arterias que irrigan el corazón. Todos los mamíferos presentan arterias coronarias, que se originan una en el seno izquierdo y otra en el derecho de la válvula aórtica. En el ser humano, se han descrito diversos tipos de anomalías congénitas en el origen y curso de las arterias coronarias, que presentan una incidencia relativamente baja en la población (0.21-5.79 %; Pérez-Pomares et al., 2016). Algunas se consideran benignas por no tener relevancia fisiológica o hemodinámica, es decir, no afectan significativamente al flujo de sangre que irriga el corazón. Las anomalías consideradas malignas pueden reducir eventualmente el flujo de sangre, lo que conduce a isquemia miocárdica y, en ocasiones, a muerte súbita cardíaca (Pérez-Pomares et al., 2016). Las anomalías consideradas benignas tienen relevancia médica, ya que representan un reto para la aplicación de técnicas angiográficas y quirúrgicas. Desde el punto de vista de la salud pública, las anomalías malignas tienen un especial impacto social, ya que en ocasiones conducen a muerte súbita cardíaca en individuos aparentemente sanos, frecuentemente jóvenes y deportistas. Aunque se considera una enfermedad rara, se estima que las anomalías congénitas de las arterias coronarias pueden ser responsables de hasta un 35% de los casos de muerte súbita cardíaca en jóvenes (Corrado et al., 1992, 2005; Kaufenstein et al., 2008; Montagnana et al., 2008). Además, son de difícil detección, ya que pasan inadvertidas en los exámenes electrocardiográficos y test de esfuerzo y no tienen ningún sustrato genético conocido ni se cuenta con marcadores moleculares.

En el año 2001, se detectaron ciertas anomalías congénitas de las arterias coronarias en una cepa de ratones con una mutación espontánea denominada iv (ratones iv/iv; (Icardo and Colvee, 2001). Aunque una elevada proporción de ratones iv/iv presentan malformaciones severas del corazón (situs inversus), las anomalías coronarias en esta cepa aparecían en corazones normales. El estudio de Icardo y Colvee concluía que la mutación iv afecta al desarrollo embrionario de las arterias coronarias. Años más tarde, se detectaron las mismas anomalías coronarias en ratones deficientes para la proteína Conexina43 (ratones Cx43-ko; Li et al., 2002; Clauss et al., 2006). También

se concluyó que la deficiencia en *Conexina43* era responsable del fenotipo coronario, junto con otras malformaciones cardíacas (obstrucción del tracto de salida). En el año 2008, se comprobó que las mismas anomalías coronarias presentes en los ratones *iv/iv* y *Cx43-ko* aparecían también en una elevada proporción de ratones de la cepa endogámica *C57BL/6*, una de las más usadas como control en investigaciones biomédicas (Fernández et al., 2008). Tanto los ratones *iv/iv* como los ratones *Cx43-ko* se habían desarrollado utilizando el fondo genético de la cepa *C57BL/6*. Es decir, los ratones mutantes *iv/iv* y *Cx43-ko* originales se habían retrocruzado sucesivamente con animales de la cepa *C57BL/6* para estudiar estas mutaciones en ratones con un fondo genético conocido y estable. Sin embargo, en los estudios citados (Icardo and Colvee, 2001; Li et al., 2002; Clauss et al., 2006), no se realizó una selección apropiada de los ratones control para los estudios comparativos. El estudio de Fernández et al. (2008) concluía que los genes *Conexina43* e *iv* no están implicados en el desarrollo de las anomalías coronarias descritas en los ratones mutantes, sino que éstas están asociadas al fondo genético de la cepa *C57BL/6*.

Las anomalías congénitas de las arterias coronarias asociadas al fondo genético de la cepa *C57BL/6* son las siguientes (Fernández et al., 2008): coronaria única en la aorta, ostium accesorio, origen de la arteria septal del tronco coronario izquierdo, origen elevado de la arteria coronaria asociado a un ostium con forma de hendidura, origen agudo y curso intramural del tronco coronario. Estas anomalías no aparecen simultáneamente en todos los animales de la cepa *C57BL/6*, sino que cada una ocurre con una incidencia distinta, presentándose diferentes posibles combinaciones.

En la mayoría de los mamíferos, incluido el ratón y el ser humano, las arterias coronarias se originan de dos ostia, por lo que la aparición de ostium u ostia accesorios puede, en sentido estricto, describirse como una anomalía. Sin embargo, en humanos (Becker, 1981) y otros mamíferos (Fernández et al., 2007, 2008) la presencia de ostia supernumerarios no suele considerarse una anomalía porque es una condición anatómica que no confiere riesgo de complicaciones clínicas.

La arteria septal es una arteria coronaria que aparece frecuentemente en mamíferos con arterias coronarias intramiocárdicas, como los roedores, pero no tiene una

equivalente en la especie humana (Durán et al., 1992). En el ratón, estudios previos habían descrito que esta arteria se origina en la arteria coronaria o seno aórtico derechos (Durán et al., 1992; Icardo and Colvee, 2001), pero no en los izquierdos, como parece ser el caso de la cepa C57BL/6.

La coronaria única en la aorta se considera una anomalía maligna según la definición de Pérez-Pomares et al. (2016), ya que puede tener consecuencias hemodinámicas y fisiológicas. Los pacientes en los que un segmento de la arteria coronaria única recorre el espacio entre la aorta y la pulmonar tienen grave riesgo de muerte súbita, especialmente durante el ejercicio físico, debido a la compresión del tronco coronario durante la expansión diastólica de los grandes vasos (Cheitlin et al., 1974; Barth and Roberts, 1986; Virmani et al., 1989; Frescura et al., 1998; Basso et al., 2000). Además, estas arterias coronarias anómalas suelen presentar la porción proximal de su recorrido tangencial e intramural, es decir, comparten la media y/o adventicia con la aorta, lo que puede agravar el efecto de compresión sobre la arteria (Sacks et al., 1977; Barth and Roberts, 1986; Liberthon, 1989), inducir espasmos (Barth and Roberts, 1986; Liberthon, 1989; Basso et al., 2000) o provocar una hiperplasia focal de la íntima que evolucione hacia una lesión ateromatosa obstructiva (Boucek et al., 1985). Se ha descrito también que la arteria coronaria anómala suele originarse con un ángulo agudo, por lo que el ostium presenta una forma de hendidura u ojal, que puede cerrarse como una válvula causando una isquemia severa (Cheitlin et al., 1974; Virmani et al., 1984; Roberts, 1987; Kragel and Roberts, 1988; Basso et al., 2001).

Por último, el origen anómalo elevado de una arteria coronaria, denominada en la literatura “high take off” (HTO), ocurre cuando una arteria coronaria se origina fuera del seno de Valsalva, por encima del límite senotubular (Angelini et al., 1999; Basso et al., 2002). Aunque no es una condición patológica por sí misma, esta anomalía se acompaña habitualmente por un origen agudo de la arteria (Cheitlin et al., 1974; Virmani et al., 1984; Houyel and Planché, 2002), con ostium en forma de hendidura (Roberts, 1987; Frescura et al., 1998; Houyel and Planché, 2002) y recorrido intramural de la porción proximal del tronco coronario (Boucek et al., 1985; Angelini et al., 1999; Rotgé et al., 1999; Houyel and Planché, 2002;). Como se ha citado

anteriormente, todas estas variantes anatómicas son susceptibles de causar isquemia severa y muerte súbita cardíaca, sobre todo durante el ejercicio físico intenso.

Como se ha comentado en capítulos anteriores, el hallazgo de una incidencia relativamente alta de diferentes combinaciones de anomalías congénitas en el origen y recorrido de las arterias coronarias en la cepa de ratones C57BL/6 es importante a dos niveles. En primer lugar, esta cepa es de uso común en investigaciones de índole cardiovascular, incluido el estudio de las arterias coronarias en alguna de sus facetas. Es evidente que el desapercibimiento de la existencia de patrones coronarios anómalos en esta cepa puede inducir a errores de interpretación de los resultados de estudios sobre esta temática. De hecho, la asociación causal entre las mutaciones de *Conexina43* e *iv* y las anomalías coronarias en ratones mutantes (Icardo and Colvee 2001; Li et al. 2002; Clauss et al. 2006) parece resultar de estos errores de interpretación (Fernández et al. 2008). En segundo lugar, contar con una cepa de ratón en la que aparecen de manera espontánea anomalías congénitas de las arterias coronarias de relevancia clínica supone una oportunidad para la investigación sobre la patología, embriología y base genética de estas anomalías.

Parece claro que la relevancia y utilidad de estos hallazgos pasa por conocer si los patrones coronarios anómalos descritos en la cepa C57BL/6 aparecen también en otras cepas del ratón de laboratorio y en ratones salvajes o, por el contrario, son exclusivos de la cepa C57BL/6. Este constituye el objetivo principal del estudio que compone la Publicación 2 de la presente tesis.

2.3.3.- El modelo consanguíneo de hámsteres con anomalías congénitas de las válvulas semilunares (Publicación 3)

La válvula aórtica es la estructura anatómica encargada de impedir el reflujo de sangre desde la arteria aorta hacia el ventrículo izquierdo durante la diástole ventricular. En la especie humana (Angelini et al., 1999), como en los demás mamíferos (Sans-Coma et al., 1996), la válvula aórtica es una estructura compleja que presenta, normalmente, un diseño tricúspide o trivalvar (Fig. 1). Está formada por tres valvas (cúspides o velos valvulares), las coronarias derecha e izquierda y la no coronaria, cada una anclada

a su correspondiente seno aórtico o seno de Valsalva siguiendo una línea parabólica. Las valvas son los componentes más móviles de la válvula. Los senos se pueden definir como las concavidades de la raíz aórtica que sirven de soporte a las valvas. Entre las líneas de inserción de cada dos valvas adyacentes hay sendos espacios triangulares que se aprecian desde la perspectiva ventricular; se trata de los triángulos intervalvares, de naturaleza fibrosa y posición subaórtica (McKay et al., 1992). Como consecuencia del contorno semilunar de las uniones de las valvas a los senos, las valvas adyacentes contactan en sus porciones distales con respecto al ventrículo, formando las comisuras valvulares. Habitualmente, las dos arterias coronarias, derecha e izquierda, nacen de los senos de Valsalva derecho e izquierdo, respectivamente.

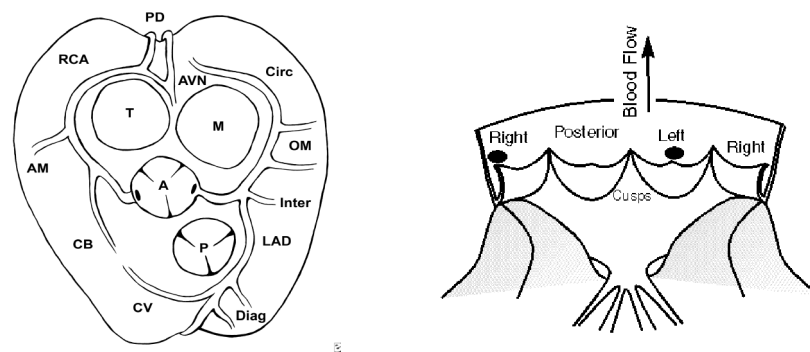


Figura 1. Visión craneal y frontal de una válvula aórtica tricúspide.

Ya a finales del siglo XV, Leonardo da Vinci demostró que el diseño tricúspide es el más eficiente para que la válvula aórtica cumpla adecuadamente su función. Sin duda, esta es la razón por la cual la válvula aórtica de tipo tricúspide (VAT) ha estado y sigue estando sometida a una selección natural de carácter positivo. Sin embargo, en las poblaciones humanas aparecen válvulas cuya morfología difiere en mayor o menor grado de la configuración tricúspide. En tal caso, se habla de anomalías o malformaciones de la válvula aórtica. Una de ellas es la válvula aórtica cuatricúspide (VAC), que presenta cuatro valvas, acompañadas por sus respectivos senos, comisuras y triángulos intervalvares, en lugar de las tres habituales. La VAC es un defecto cardíaco congénito poco frecuente (<0,05% en pacientes) que generalmente se presenta en forma aislada, pero puede asociarse a otras malformaciones congénitas. Una VAC puede ser compatible con una función valvular normal, aunque la mayoría de los pacientes portadores desarrollan insuficiencia valvular progresiva (Timperley et al.,

2002; Tutarel et al., 2004, Jagannath et al., 2011).

Es bien conocido que la anatomía y el desarrollo de las válvulas semilunares no difiere sustancialmente entre humanos y mamíferos no humanos (Fernández et al., 1998, 2000, 2009; Sans-Coma et al., 1996, 2012). Dentro de los mamíferos en general, las válvulas semilunares se han estudiado principalmente en la especie humana, ya que los procesos patológicos que las afectan tienen gran interés clínico. Como consecuencia de ello, también se han estudiado con detalle las de algunos animales domésticos y de laboratorio tales como el cerdo y el perro, ya sea con fines anatómicos, patológicos y/o quirúrgicos, ya sea con el propósito de diseñar prótesis (Thubrikar, 1990). Entre los modelos animales se han descrito pocos casos de VAC, tan solo en nueve perros (Sisson and Riepe, 2000; Serres et al., 2008; Jagannath et al., 2011) y en una musaraña (Durán et al., 1996). En todos los casos, la VAC estaba acompañada de otras malformaciones cardíacas o vasculares.

Como se ha explicado en el capítulo precedente, en el hámster sirio se han obtenido las únicas evidencias empíricas sobre el desarrollo embrionario de la VAC (Fernández et al., 1994, 1999). Éstas se basaron en la identificación de dos casos de VAC en desarrollo en embriones de distintos estadios, que permitieron formular la hipótesis de que la VAC se forma por la partición de uno de los primordios valvulares en un estadio temprano de la valvulogénesis. Sin embargo, hasta el momento del planteamiento de la presente tesis, no se había descrito ningún caso de VAC en hámsteres adultos. El objetivo de este estudio, que constituye la Publicación 3 de la presente tesis, consiste en la identificación de válvulas aórticas con morfología cuatricúspide en hámsteres sirios de cepas endogámicas, la descripción de su anatomía y la interpretación de su origen embriológico en base a la hipótesis propuesta en estudios previos con esta especie.

III. Objetivos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Los objetivos principales de esta tesis doctoral se formulan a continuación, siguiendo el orden de las publicaciones que forman el cuerpo de la tesis:

Evaluación de los efectos de la ausencia de Ogn en el desarrollo de la aterosclerosis utilizando un modelo animal inducido de enfermedad. Para ello, se ha realizado un estudio comparativo de la progresión de la aterosclerosis en ratones mutantes para Apoe y doble mutantes para Apoe y Ogn, mediante técnicas morfométricas, histomorfológicas y de inmunofluorescencia.

Identificación y estimación de la incidencia de anomalías congénitas de las arterias coronarias, inicialmente descritas en la cepa de ratón C57BL/6, en otras cepas de ratón de laboratorio y poblaciones silvestres. Para ello, se han empleado técnicas de microdissección, de inyección-corrosión y de microscopía óptica.

Identificación de válvulas aórticas con morfología cuatricúspide en hámsteres sirios de cepas endogámicas, cepas exogámicas y poblaciones salvajes, descripción de su anatomía e interpretación de su origen embriológico. Para ello, se han empleado técnicas de microdissección y microscopía electrónica de barrido.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

IV. Resumen global de los resultados y la discusión



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Publicación 1

Osteoglycin deficiency does not affect atherosclerosis in mice

Javier Moncayo-Arlandi , Alejandro López-García, M. Carmen Fernández, Ana Carmen Durán, Borja Fernández

Atherosclerosis (2014) 237:418-425

Como se ha comentado en capítulos precedentes, el objetivo general de esta investigación fue explorar el papel del proteoglicano Ogn en la aterogénesis, mediante el estudio de la progresión de la aterosclerosis en ratones doble mutante ApoE/Ogn-ko.

El estudio se realizó utilizando ratones mutantes homocigotos tanto para el grupo experimental ($Ogn^{-/-}ApoE^{-/-}$) como para el grupo control ($Ogn^{+/+}ApoE^{-/-}$). Para obtener los animales de experimentación, se realizaron cruces entre ratones de las cepas $ApoE^{-/-}$ (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) y $Ogn^{-/-}$ (Thaseva et al., 2002), ambas con un fondo genético C57BL/6. Los animales heterocigotos resultantes ($Ogn^{+/-}ApoE^{+/-}$) se cruzaron entre sí para obtener ratones con todos los genotipos posibles ($Ogn^{+/+}ApoE^{+/+}$; $Ogn^{+/+}ApoE^{+/-}$; $Ogn^{+/+}ApoE^{-/-}$; $Ogn^{+/-}ApoE^{+/+}$; $Ogn^{+/-}ApoE^{+/-}$; $Ogn^{+/-}ApoE^{-/-}$; $Ogn^{-/-}ApoE^{+/+}$; $Ogn^{-/-}ApoE^{+/-}$; $Ogn^{-/-}ApoE^{-/-}$). De entre los animales de esta segunda generación, se seleccionaron los animales con genotipos adecuados para la investigación ($Ogn^{-/-}ApoE^{-/-}$ y $Ogn^{+/+}ApoE^{-/-}$). El genotipado de los animales se realizó mediante PCR utilizando un pequeño segmento de la punta de la cola y cebadores específicos. Los estudios comparativos se realizaron agrupando los animales en función de su genotipo ($Ogn^{+/+}ApoE^{-/-}$; $Ogn^{-/-}ApoE^{-/-}$), su género (machos; hembras) y su edad (18, 22, 34 y 52 semanas). La distinción entre machos y hembras se debe al hecho de que, tanto en humanos como en el modelo de ratones ApoE-ko, la progresión temporal y en severidad de la aterosclerosis varía según el género, debido al componente hormonal

(Bennet et al., 2006).

La evolución de las lesiones ateroscleróticas se examinó analizando las características histomorfológicas de las lesiones y cuantificando su tamaño en diferentes estadios, mediante la aplicación de técnicas morfométricas en secciones histológicas y tinciones in toto. También se utilizaron técnicas inmunohistoquímicas y tinciones histoquímicas específicas para estudiar la composición de las lesiones ateroscleróticas. A tenor de las funciones biológicas de la Ogn, se estudió en detalle la composición celular de las lesiones (inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para leucocitos -Cd45- y para células musculares lisas - α -actina-), la distribución del colágeno (tinciones histoquímicas: tricrómico de Masson-Goldner y rojo sirio) y los glicosaminoglicanos (tinción histoquímica: azul alciano) y el tamaño y localización de los depósitos de calcio (tinción histoquímica in toto: rojo de alizarina).

En primer lugar, se comprobó que los ratones experimentales ($Ogn^{-/-}Apoe^{-/-}$) no expresaban Ogn en la aorta. Para ello se realizó un análisis de los transcritos mediante PCR, utilizando cebadores específicos en ratones $Ogn^{-/-}Apoe^{-/-}$ y $Ogn^{+/+}Apoe^{-/-}$. El análisis mostró que, efectivamente, Ogn se expresa normalmente en la aorta del ratón, pero no en la de los ratones mutantes para Ogn (Fig. 1 de Publicación 1).

Seguidamente se examinó la histomorfología de la raíz aórtica en ratones de 18, 22 y 34 semanas de edad, estadios en los que las lesiones ateroscleróticas aparecen y aumentan sustancialmente de tamaño en el modelo de ratones Apoe-ko. Se constató que, tanto en los ratones $Ogn^{-/-}Apoe^{-/-}$ como en los $Ogn^{+/+}Apoe^{-/-}$, las primeras lesiones, en forma de acúmulos de células espumosas, aparecían a las 18 semanas de edad, aumentando de tamaño a las 22 y 34 semanas, acompañadas de dilatación de los senos valvulares (Fig. 2A de Publicación 1). Se comparó el tamaño de las lesiones entre animales $Ogn^{-/-}Apoe^{-/-}$ y $Ogn^{+/+}Apoe^{-/-}$ (machos y hembras por separado) de 18 y 22 semanas, mediante la cuantificación de la superficie relativa de las lesiones en la zona media de los senos valvulares y del ratio intima/media en la porción distal de los senos. En ambos casos no se detectaron diferencias significativas en el tamaño de las lesiones entre los genotipos, ni en machos ni en hembras (Fig. 2B, C de Publicación 1).

A continuación se comparó, de manera cualitativa, la composición de las lesiones ateroscleróticas en los ratones *Ogn^{-/-}ApoE^{-/-}* y *Ogn^{+/+}ApoE^{-/-}* de 18 y 22 y 34 semanas de edad. Se examinó la cantidad y localización de células musculares lisas, células espumosas, leucocitos, fibras de colágenos, glucosaminoglucanos y cristales lipídicos (Fig. 3 de Publicación 1). No aparecieron diferencias apreciables entre genotipos en ninguno de los estadios estudiados.

Por último, se cuantificó la incidencia y tamaño de los depósitos de calcio en el cayado aórtico de los ratones *Ogn^{-/-}ApoE^{-/-}* y *Ogn^{+/+}ApoE^{-/-}* de 22 y 34 y 52 semanas de edad (Fig. 5 de Publicación 1). Los primeros depósitos, de pequeño tamaño, aparecieron en los animales de 22 semanas de edad, multiplicando por 10 su tamaño en las semanas sucesivas. Tanto la incidencia como la severidad de estas lesiones eran superiores en hembras que en machos, pero no se detectaron diferencias significativas entre animales con distinto genotipos.

Los resultados del estudio mostraban que la distribución de los componentes celulares y de la matriz extracelular en las lesiones ateroscleróticas de diferentes estadios era similar en animales doble mutante y control. Además, el tamaño de las lesiones aumentaba de manera similar, al igual que su calcificación. Estos resultados indican que la progresión y la severidad de la aterosclerosis no se ven afectadas por la falta de *Ogn*. Es decir, la deficiencia en *Ogn* no tiene efecto alguno sobre el desarrollo arterial normal o la progresión de la aterosclerosis. Se puede concluir que *Ogn* es prescindible para el desarrollo, homeostasis y patogénesis del sistema arterial, a pesar de su abundancia en arterias normales y patológicas y la estrecha regulación de su expresión y localización bajo condiciones de estrés (Funderburgh et al., 1997; Beecher et al., 2005; Williamson et al., 2008).

Una posible explicación a esta ausencia de fenotipo puede estar en un fenómeno de compensación de la función de *Ogn* por otro u otros miembros de la familia SLRP. Este fenómeno es plausible, merced a la similitud de la estructura molecular de los SLRPs y a la común regulación de su transcripción (Tasheva et al., 2004). De hecho, un fenómeno de compensación de este tipo parece que tiene lugar en el tendón y la córnea de los ratones mutantes deficientes en Fibromodulin y Decorin

respectivamente (Svensson et al., 1999; Zhang et al., 2009). Para falsar esta hipótesis, sería necesario analizar la expresión de diferentes SLRPs en los ratones Ogn-ko, así como desarrollar ratones doble o triple mutantes, deficientes en Ogn y otro u otros miembros de la familia SLRP.

Publicación 2

Unusual anatomical origins of the coronary arteries in C57BL/6 mice. Are they strain-specific?

Alejandro López-García, M. Teresa Soto-Navarrete, M. Carmen Fernández, Javier Moncayo-Arlandi, Ana Carmen Durán, Miguel A. López-Unzu, Juan Horacio Alonso-Briales, Borja Fernández

Journal of Anatomy (2016) 229(5):703–709

El objetivo principal del estudio correspondiente a la Publicación 2 de esta tesis consistió en elucidar si las anomalías coronarias detectadas en los ratones pertenecientes a la cepa C57BL/6 están presentes también en ratones pertenecientes a otras cepas y en ratones salvajes o si, dentro de la especie *M. Musculus*, estas anomalías son exclusivas de la cepa C57BL/6. Para ello, se realizó un estudio anatómico de las arterias coronarias en ratones pertenecientes a diversas cepas consanguíneas y no consanguíneas de ratón de laboratorio de uso común, así como en ratones salvajes capturados en la naturaleza.

El estudio incluyó 597 ratones adultos pertenecientes a tres cepas consanguíneas (C57BL/6, Balb/c, DBA/2), tres cepas no consanguíneas (CD1, OF1, NMRI), dos líneas híbridas (129sv x BL/6, CD2F1) y poblaciones silvestres. El origen y curso de los troncos coronarios se evaluó mediante microscopía electrónica de barrido, estereomicroscopía, microscopía óptica y técnicas de inyección-corrosión. En particular, se estudió el origen anatómico de la arteria septal, el número y posición de los ostia coronarios y el curso de la porción proximal de cada tronco coronario. Parte de los especímenes examinados mediante estereomicroscopía y microscopía óptica y los examinados mediante técnicas de inyección corrosión formaban parte de un banco de material morfológico conservado en el Departamento de Biología Animal de la Universidad de Málaga.

resumidos en la tabla 1 de la publicación, en la que se detalla el número e incidencia de los distintos morfotipos coronarios analizados en los animales de cada grupo.

Los resultados dejaron patente que en el ratón, si bien lo más habitual es que las arterias coronarias se originen de dos ostia coronarios, una proporción relativamente elevada de los animales presentaba más de dos ostia (ostium accesorio). Algo similar ocurría con la arteria septal, que normalmente se originaba de la arteria coronaria derecha o del mismo ostium derecho (septal derecha), aunque una proporción relativamente elevada de los animales presentaba una arteria septal izquierda. En el caso del ostium accesorio, su incidencia era similar en todos los grupos analizados. En el caso de la arteria septal, la cepa C57BL/6 era la que presentaba mayor incidencia de animales con una sola arteria septal izquierda o dos arterias septales. La mayoría de los grupos de animales analizados mostraban una incidencia muy baja o nula de HTO, a excepción de la cepa consanguínea C67BL/6 con un 58% y la línea híbrida 129sv x BL/6 con un 40%. Los casos de arteria coronaria única fueron muy escasos, apareciendo, además de en un 6% de los C57BL/6, en otras tres cepas, con incidencias entre el 1% y el 3%.

La conclusión principal de este estudio es que las anomalías coronarias o, como se denominaron originalmente, los patrones inusuales de las arterias coronarias de los ratones C57BL/6 no constituyen un rasgo exclusivo de esta cepa, sino que están presentes en diferentes cepas o líneas de ratones de laboratorio e incluso en los ratones silvestres. Cada población de ratón muestra una incidencia específica de estas anomalías coronarias. Sin embargo, la elevada incidencia de estas anomalías sí puede considerarse una característica exclusiva de la cepa C57BL/6.

Los hallazgos del estudio son especialmente relevantes en dos ámbitos de la investigación cardiovascular.

En primer lugar, la aparición de determinadas anomalías congénitas de las arterias coronarias (HTO, curso intramural y arteria coronaria única) en diversas cepas de ratón de laboratorio plantea la posibilidad de utilizar estas cepas como modelo de enfermedad, para estudios de índole etiológica. Es de resaltar que en el ratón,

estas anomalías no parecen causar isquemia miocárdica, como es el caso de algunos pacientes portadores. Se plantea que esta diferencia puede ser debida a la distinta disposición del árbol arterial coronario en ambas especies, intramiocárdica en ratones y subepicárdica en humanos.

En segundo lugar, parece evidente que la variabilidad anatómica en el origen y curso de los troncos coronarios, específicos para cada cepa, debe tenerse en cuenta al emprender estudios sobre el sistema coronario utilizando el ratón como modelo animal. En particular, estos hallazgos deben tenerse en consideración para estudios que incluyan dos estrategias experimentales comunes en el ámbito cardiovascular: 1) generación de ratones modificados genéticamente en los que, habitualmente, se parte de un fondo genético híbrido; 2) modelo de oclusión quirúrgica de las arterias coronarias en ratones, en el que se ocluye experimentalmente la porción proximal de un tronco coronario.

La diversa incidencia de HTO en los grupos de ratones analizados merece especial mención. Esta anomalía es rara en humanos, pero se asocia frecuentemente con isquemia miocárdica, pudiendo llegar a causar muerte súbita cardiaca (Mahowald et al., 1986; Garcia Rinaldi et al., 1994; Basso et al., 2002). La elevada incidencia de HTO en algunas cepas de ratones, como la cepa C57BL/6 (58 %), plantea la posibilidad de investigar su etiología. A este respecto, cabe resaltar que una de las cepas híbridas analizadas (129sv x BL/6) presentaba una incidencia inferior a la de C57BL/6 (40 %) pero aún alta comparada con el resto de grupos analizados (entre 0 % y 16 %). Habida cuenta que la mitad del fondo genético de los ratones 129sv x BL/6 proviene de la cepa C57BL/6, cabe plantearse la hipótesis de que existe un importante componente genético en el desarrollo de HTO. Una estrategia experimental basada en el cruzamiento de animales de cepas portadora (p.ej. C57BL/6) y no portadora (p.ej. Balb/c) puede ayudar a refutar esta hipótesis.

Otra conclusión de interés derivada de este estudio se refiere al origen de la arteria septal en el ratón. A diferencia de lo que se había descrito con anterioridad, la arteria septal no siempre se origina de la arteria coronaria derecha o el seno aórtico derecho en esta especie (Fernández et al., 2008; Salto-Tellez et al., 2004; Duran et al., 1992;

Sans-Coma et al., 1993b). En una significativa proporción de los animales es frecuente la presencia de dos arterias septales, una derecha y otra izquierda, o una sola arteria septal izquierda. En el ser humano no existe una arteria septal propiamente dicha. El septo interventricular es irrigado por ramas septales que surgen de las arterias interventriculares anterior y posterior y penetran en el tabique interventricular (von Lüdinghausen and Ohmachi, 2001). En la especie humana, la dominancia del sistema coronario viene determinada por el origen de la arteria descendente posterior, que nace del tronco coronario derecho en el 85% de los casos (dominancia derecha) y del izquierdo en el 15% (dominancia izquierda) (Ballesteros-Acuña et al., 2007). La importancia del conocimiento de la dominancia coronaria radica en su impacto sobre los procedimientos quirúrgicos y hemodinámicos, en la etiología de las arritmias derivadas de la enfermedad coronaria y en el manejo del trauma cardiaco (Baptista et al., 1989; Reig et al, 1993; Kalpana, 2003). Los hallazgos del presente estudio permiten proponer al origen de la arteria septal como marcador de la dominancia, izquierda o derecha, del árbol arterial coronario en el ratón.

Publicación 3

Quadricuspid aortic valves in Syrian hamsters and their formation according to current knowledge on valvulogenesis

Alejandro López-García, M. Carmen Fernández, Ana Carmen Durán, Valentín Sans-Coma, Borja Fernández

Japanese Journal of Veterinary Research (2015) 63(1): 37-43

El objetivo de este estudio, como se indica en el apartado II de esta memoria, es la identificación de válvulas aórticas con morfología quadricúspide en diferentes poblaciones de hámster sirio, la descripción de su anatomía y la interpretación de su origen embriológico.

Para el estudio se examinó la anatomía valvular de un total de 4190 ejemplares adultos de hámster, de los cuales 2068 eran machos y 2122 eran hembras. Los hámsteres pertenecían a cuatro cepas, tres consanguíneas y una no consanguínea. La cepa no consanguínea (cepa H, n=224) es comercializada por la compañía *Charles River* (Francia), mientras que las consanguíneas (cepas B, n=1525; D, n=1525 y T, n=916) fueron desarrolladas en el propio Departamento de Biología Animal de la Universidad de Málaga. Las cepas D y T están relacionadas genealógicamente y ambas presentan una elevada incidencia de VAB en sus respectivas poblaciones, por lo que se las ha utilizado como modelo de esta malformación valvular en estudios previos. La cepa B presenta una baja incidencia de VAB y se ha usado como cepa control en estudios previos sobre esta malformación valvular (Fernández et al., 2009; Sans-Coma et al. 2012).

Aunque una parte de los animales utilizados fueron criados, sacrificados y procesados para su estudio durante el desarrollo de esta tesis, la mayor parte de los especímenes forman parte de un banco de material biológico conservado en el Departamento. Los exámenes anatómicos se realizaron mediante estereomicroscopía y microscopía electrónica de barrido.

Se detectaron cuatro válvulas cuya morfología se ajustaba, en mayor o menor medida, a la de una VAC. En dos casos, la morfología cuatricúspide era incuestionable (Figs. 1A,B de Publicación 3), mientras que en los otros dos casos, la morfología valvular era semejante, pero no igual, a la de una VAC típica (Figs. 1C,D de Publicación 3). Para facilitar las explicaciones, a las primeras se las ha denominado VACs y a las segundas pseudoVACs.

Los dos animales con VAC presentaban dos valvas en posición ventral y otras dos en posición dorsal, siendo claramente visible el origen normal de las arterias coronarias izquierda y derecha en los dos senos ventrales (Figs. 1A,B, 2A,B de Publicación 3). En uno de estos especímenes, la valva y el seno ventrales derechos eran de menor tamaño que los ventrales izquierdos, pero mayores que los dos dorsales (Figs. 1A, 2A de Publicación 3). Esta morfología no coincide con ninguno de los tipos propuestos por Hurwitz y Roberts (1973) para las VACs humanas. En el otro espécimen, las dos valvas y senos ventrales eran de tamaño similar, pero mayor que los dorsales (Figs. 1B, 2B de Publicación 3). Esta morfología es similar a las VACs tipo C humanas (Hurwitz and Roberts, 1973).

Los dos animales con pseudoVAC presentaban una gran valva ventral pero con claros indicios de dos senos bien formados, es decir, presentaban dos valvas y dos senos ventrales anatómicamente fusionados (Figs. 1C,D, 2C,D de Publicación 3). Las arterias coronarias derecha e izquierda se originaban de las porciones derecha e izquierda del seno ventral. Las dos valvas dorsales con sus respectivos senos estaban individualizadas. Éstas eran de tamaño similar en un espécimen (Figs. 1D, 2D de Publicación 3), mientras que en el otro, una de las valvas y senos eran de menor tamaño (Figs. 1C, 2C de Publicación 3).

Los cuatro ejemplares con VAC o pseudoVAC eran machos, tenían edades comprendidas entre los 99 y los 348 días y pertenecían a la misma cepa (cepa T). En ninguno de los animales pudimos apreciar signos externos de enfermedad en el momento del sacrificio o alguna señal que indicara patologías influenciadas por la anomalía valvular. En los cuatro casos la válvula pulmonar mostraba una morfología normal (tricúspide) y ninguno presentaba otras malformaciones cardíacas.

El presente estudio es el primero en describir VACs en el hámster sirio. Esta especie es la única en la que se han obtenido evidencias empíricas sobre el desarrollo embrionario de esta malformación valvular (Fernández et al., 1994, 1999). Estos estudios sugerían que las VACs se forman, durante el desarrollo embrionario, por la partición de uno de los tres primordios valvulares (cojines mesenquimáticos) en estadios iniciales de la valvulogénesis. Esta idea difiere de las hipótesis clásicas sobre el desarrollo de la VAC (Hurwitz and Roberts, 1973). Aunque la morfología valvular de los embriones de hámster descritos por Fernández et al. (1994, 1999) permitía sugerir el mecanismo patogenético citado, la ausencia de hámsteres adultos con VAC suponía un hándicap para validar esta hipótesis. Los dos casos con VAC descritos en el presente estudio constituyen una evidencia relevante para respaldarla. En ambos casos aparecen cuatro valvas y senos, dos de los cuales, los dorsales, son de un tamaño inferior a los otros dos, lo que parece fácilmente explicable mediante el mecanismo morfogenético propuesto por Fernández et al. (1994, 1999) (Fig. 3C de Publicación 3).

A priori, la morfogénesis de las pseudoVACs descritas en este estudio no parece tan sencilla. Aunque, siguiendo la hipótesis morfogenética propuesta, se podría pensar en una partición parcial de uno de los primordios valvulares, dando lugar a la fusión anatómica de dos valvas y senos en el individuo adulto, los senos que aparecen anatómicamente fusionados en los dos casos de pseudoVACs son los portadores de las arterias coronarias. Por lo tanto, para asumir este proceso morfogenético como causa de las pseudoVACs, habría que asumir también que se ha producido un defecto en la coronariogénesis, originándose las dos arterias coronarias de un único seno, cuyo cojín se habría dividido parcialmente en dos. Sin embargo, los hallazgos sobre la embriogénesis de otras malformaciones valvulares en el hámster permiten formular una hipótesis alternativa más parsimoniosa.

Como se ha explicado en capítulos precedentes, dos de las cepas de hámster con las que se ha trabajado en esta tesis (cepas D y T) presentan una elevada incidencia de VAB. Estudios previos con embriones de estas cepas demostraron que la VAB se forma por la fusión de los primordios valvulares izquierdo y derecho en un estadio temprano de la valvulogénesis (Sans-Coma et al., 1996). Los cuatro casos de VAC

y pseudoVACs descritos en el presente estudio pertenecían a la cepa T. Habida cuenta de la incidencia relativamente elevada de VAB en esta cepa (40%), existe la misma probabilidad (40%) de que la malformación responsable de la VAC se diera en individuos con fusión parcial de los primordios valvulares izquierdo y derecho. La combinación de ambas alteraciones morfogénicas, partición de un primordio valvular (probablemente el dorsal) y fusión parcial de otros dos (izquierdo y derecho), darían explicación a los dos casos de pseudoVACs descritos.

Ventajas y limitaciones de los modelos animales estudiados

Los modelos animales de enfermedad son una herramienta clave para la medicina, constituyendo una parte sustancial de las investigaciones biomédicas. La bondad de estos modelos se basa fundamentalmente en el grado de extrapolabilidad de los resultados a la especie humana, es decir, en la similitud entre los procesos patológicos que ocurren en el hombre y en el animal modelo. Las diferencias biológicas entre estos procesos se denominan diferencias interespecíficas, que constituyen la principal limitación de los modelos animales en investigación biomédica.

Como se ha citado en el capítulo de introducción, las diferencias entre humanos y roedores en cuanto a la predisposición a la aterosclerosis es un buen ejemplo de las limitaciones interespecíficas que afectan a los modelos animales de enfermedad. La administración de dietas hiperlipídicas a ratones de laboratorio induce la formación de pequeñas lesiones, correspondientes a estados iniciales de la enfermedad, que no progresan a las placas de ateroma típicas en la especie humana, por lo que los modelos inducidos por dietas se consideran parciales (Jawien et al., 2004; Ohashi et al., 2004).

El desarrollo de ratones modificados genéticamente, deficientes en la ApolipoproteínaE respondía a la necesidad de contar con modelos con mayor grado de homología y extrapolabilidad (Wouters K et al., 2005; Plump AS et al., 1992). Los ratones mutantes para este gen desarrollan placas de ateroma mediante mecanismos celulares y moleculares similares a los que tienen lugar en la enfermedad humana. Así, este modelo ha sido y siguen siendo de enorme utilidad, sobre todo para conocer los factores moleculares implicados en la enfermedad. Y ello merced a la posibilidad de desarrollar ratones dobles mutantes, deficientes en ApolipoproteínaE y otras proteínas sobre las que se quiere testar su capacidad pro- o anti-aterogénica.

A pesar de que está bien establecida la similitud de los procesos celulares y moleculares que conducen al desarrollo de placas de ateroma entre el ser humano y los ratones mutantes para ApolipoproteínaE, se debe asumir la existencia de posibles

diferencias interespecíficas. Estas limitaciones, intrínsecas de los modelos animales, requieren una atención especial en modelos como los ratones Apoe-ko, en los que la enfermedad no ocurre de manera natural en la especie modelo, sino bajo el efecto de una modificación genética artificial. En el caso de los ratones doble mutantes Apoe/mime-ko, estudiados en el primer trabajo de la presente tesis, la principal limitación del estudio consiste en la posibilidad de que la ausencia de fenotipo asociado a la deficiencia de mimecan constituya un efecto específico del ratón. Es decir, cabe la posibilidad de que mimecan tenga un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis humana, aunque los ratones deficientes en esta proteína no muestren alteraciones en el proceso aterosclerótico.

En relación a este último punto, resulta de especial relevancia la hipótesis de la compensación genética. Como se ha comentado en la discusión de este estudio, son frecuentes los casos de ratones mutantes en los que la ausencia de fenotipo se debe a la compensación de la función del gen defectuoso por un miembro próximo de la misma familia génica, que cambia su patrón de expresión para compensar la ausencia de una proteína. Para testar esta hipótesis de la compensación, una estrategia experimental apropiada puede ser la generación de ratones triple mutantes, deficientes en Apoe, mimecan y otro gen de la familia de los SLRP que pudiera compensar la función de mimecan. La aparición de un fenotipo asociado al triple mutante, no presente en los dobles mutantes o en los mutantes simples apoyaría esta hipótesis. Posiblemente, el gen que codifica para la proteína Decorina es el mejor candidato, ya que esta proteína, perteneciente a la familia de las SLRPs, tiene una función relevante en la matriz extracelular vascular y, como mimecan, también se expresa durante el desarrollo de la aterosclerosis.

A diferencia de los modelos animales de enfermedad inducidos por modificación genética, los modelos animales espontáneos presentan un fenotipo que aparece de manera natural en la población. Usualmente, el fenotipo anómalo aparece cuando se cruzan aleatoriamente animales portadores de una o varias mutaciones que predisponen a dicho fenotipo. Se puede asumir, por lo tanto, que la etiología del fenotipo anómalo de los modelos espontáneos es previsiblemente similar a la humana.

En algunas ocasiones, aunque en el modelo aparece un fenotipo anómalo similar al humano, éste no conduce a una situación patológica, se trata de modelos de resistencia. En el caso de los ratones con anomalías en el origen de las arterias coronarias y de los hámsteres con VAC presentados en las publicaciones 2 y 3 respectivamente, las cepas afectadas constituyen modelos espontáneos, pero los animales no desarrollan las patologías que caracterizan a estos fenotipos en la especie humana. Estos modelos son útiles para investigar la etiología, es decir las causas genéticas y los mecanismos de desarrollo que conducen al fenotipo anómalo. Sin embargo, estas cepas no constituyen modelos de enfermedad en sentido estricto, ya que no representan el desarrollo de una patología.

En el modelo hámster con VAC no se han detectado casos de insuficiencia valvular, que constituye la patología asociada a la malformación valvular en el ser humano (Timperley et al., 2002; Tutarel et al., 2004, Jagannath et al., 2011). Sin embargo, no se han realizado estudios específicos para determinar la funcionalidad valvular. Cabe la posibilidad de que los animales afectos presenten cierto grado de insuficiencia valvular, que no represente una merma para el estado físico general del animal, pasando esta patología inadvertida. Por otra parte, la insuficiencia valvular asociada a la VAC humana tiene lugar de manera progresiva, por lo que la función cardíaca se ve comprometida con la edad de los pacientes. Habida cuenta que la esperanza media de vida del hámster no supera los tres años, cabe especular que los animales portadores de VAC no desarrollan una patología cardíaca porque no alcanzan la edad suficiente para que se inicie la disfunción valvular.

En el modelo de ratones con anomalías congénitas de las arterias coronarias, el fenotipo anómalo tampoco conduce a defectos en la irrigación coronaria, como ocurre en una proporción de los pacientes afectos (Corrado et al., 1992, 2005; Kaufenstein et al., 2008; Montagnana et al., 2008). En humanos, algunas anomalías coronarias, presentes en la cepa de ratones afecta, se asocian a muerte súbita cardíaca. En estos casos, la muerte súbita es consecuencia de una isquemia severa derivada de una obstrucción significativa del flujo sanguíneo coronario. La obstrucción resulta de la compresión de la pared de la arteria coronaria, causada por su origen o curso

anómalo. En las cepas de ratones afectos, sin embargo, no parece haber casos de muerte súbita cardíaca, ya que no se han detectado muertes espontáneas, ni presentan una esperanza de vida diferente a la normal. Una posible explicación a la ausencia de patología asociada al fenotipo anómalo en el modelo murino puede estar en la diferente disposición anatómica de las arterias coronarias de los roedores. En éstos, las arterias coronarias tienen un curso intramiocárdico, a diferencia de los humanos, que presentan arterias coronarias subepicárdicas (Duran AC et al., 1992). Es posible que la fisiología coronaria de los roedores cuente con mecanismos específicos para evitar los efectos de compresión derivados de la anatomía coronaria intramiocárdica. Estos mecanismos podrían evitar también los efectos de compresión en los troncos coronarios con origen o curso anómalo. Esto explicaría la ausencia de patología asociada las anomalías coronarias en el ratón y también la incidencia relativamente elevada de estas anomalías en algunas cepas de ratones de laboratorio.

La cepa de hámsteres con VAC y las cepas de ratones con anomalías coronarias constituyen, por tanto, modelos relevantes para el estudio de la etiología de anomalías congénitas valvulares y coronarias, aunque no de sus patologías asociadas. En el primer caso, el estudio de la anatomía de las válvulas aórticas con diseño cuadrícuspide ha permitido reinterpretar los resultados de índole embriológico obtenidos previamente con este mismo modelo. Estos resultados permiten plantear nuevas hipótesis de trabajo para continuar la investigación sobre la etiología de la VAC, con el objetivo de conocer los factores genético y mecanismos morfogénéticos implicados. Sin embargo, la escasa incidencia de este tipo de malformaciones valvulares en la cepa afecta (inferior al 0,1 %) hace poco viable la continuación de esta investigación. Respecto a las anomalías congénitas en el origen de las arterias coronarias, el estudio correspondiente a la publicación 2 de la presente tesis indica que la cepa C57BL/6 presenta una incidencia relativamente elevada de dos anomalías coronarias con relevancia clínica, ya que pueden causar muerte súbita cardíaca en la especie humana. Se trata de la coronaria única y del HTO. Si bien la primera aparece tan solo en un 6% de los individuos de la cepa C57BL/6, la segunda ocurre con una incidencia bastante mayor, casi el 60%, lo que posibilita plantear estrategias experimentales destinadas a identificar los mecanismos morfogénéticos y moleculares

responsables de su desarrollo. Se pueden plantear dos estrategias en los ámbitos de la embriología y de la genética. Para la primera, se puede plantear el estudio comparado de la coronariogénesis, en particular de los procesos morfogénicos que conducen a la formación de los principales troncos coronarios, en embriones de ratón de la cepa afecta (C57BL/6) y de una cepa no afecta como control, por ejemplo Balb/c, en la que no se han detectado casos de coronaria única o HTO. Para la segunda, se puede plantear la búsqueda e identificación de mutaciones causales, y ello merced a los recursos metodológicos e información del código genético de cepas de ratón con los que se cuenta hoy en día. En particular, existen bases de datos con las secuencias genéticas de las cepas de ratones de laboratorio de uso más frecuente (<http://www.informatics.jax.org/>). Esta información permitiría desarrollar estrategias de rastreo genético, como las que se emplean en estudios de ligamiento genético utilizando SNPs o microsatélites, para la identificación de mutaciones causales de HTO. Estas estrategias se aplican idealmente a caracteres con una transmisión hereditaria simple, en individuos híbridos derivados de cruzamientos entre portadores y no portadores del carácter. En el caso del HTO, los estudios más recientes con el modelo de ratones C57BL/6 indica que el carácter segrega siguiendo un patrón de herencia simple (Fernández et al., 2015). Ya está en curso un estudio de ligamiento genético con microsatélites para identificar el gen causal.

I



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

V. Conclusiones finales



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. La ausencia de Osteoglicina en el ratón no afecta al desarrollo o a la homeostasis del sistema arterial, ni altera la progresión de la aterosclerosis.
2. La ausencia de Osteoglicina no altera la composición de la placa de ateroma ni su calcificación, a pesar de la participación de esta glicoproteína en la fibrillogénesis del colágeno y en la osteogénesis.
3. La ausencia de fenotipo vascular en los ratones deficientes en Osteoglicina puede explicarse por un mecanismo de compensación por otros miembros de la familia de las SLRP.
4. Las condiciones anatómicas de las arterias coronarias previamente detectadas en la cepa de ratón C57BL/6, a excepción del ostium en forma de seno, no son exclusivas de esta cepa, sino que están presentes en diversas poblaciones de ratones, apareciendo en combinaciones y con incidencias variables.
5. Algunas cepas de ratón de laboratorio pueden servir como modelo para investigar la etiología de las anomalías congénitas de las arterias coronarias, algunas de gran relevancia clínica por causar muerte súbita.
6. Las diferencias intra-específicas del ratón de laboratorio en cuanto a la anatomía de las arterias coronarias deben tenerse en cuenta para los experimentos de oclusión experimental de las arterias coronarias y para los estudios sobre la coronariogénesis, especialmente cuando se usan animales modificados genéticamente con fondos genéticos híbridos.
7. En el modelo de hámsteres con válvula aórtica bicúspide aparecen también individuos con válvula aórtica cuadrícúspide, aunque con una incidencia baja, con una anatomía valvular similar a la humana.
8. La válvula aórtica cuadrícúspide puede formarse por un mecanismo embrionario de partición de los primordios valvulares en el comienzo del

proceso valvulogenético. La combinación de los procesos de partición y fusión de los primordios, este último responsable de la formación de válvulas aórticas bicúspides, puede dar lugar a diferentes malformaciones valvulares que hemos denominado pseudo-cuadricúspides.

9. En el hámster sirio, la válvula aórtica cuadricúspide no parece causar complicaciones clínicas relevantes (insuficiencia cardíaca), como ocurre en otros modelos animales y en humanos.

VI. Publicaciones



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Osteoglycin deficiency does not affect atherosclerosis in mice

Javier Moncayo-Arlandi, Alejandro López-García, M. Carmen Fernández, Ana Carmen Durán, Borja Fernández

(2014) *Atherosclerosis* 237 418-425 DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2014.09.016

Abstract

The small leucine-rich proteoglycan Osteoglycin/Mimecan (OGN) is a component of the extracellular matrix, where it regulates collagen fibrillogenesis and cytokine availability. OGN is abundant in normal vessels and in atherosclerotic and restenotic lesions of rat, rabbit and human arteries. Osteoglycin-null mice show alterations in the thickness of collagen fibers of the cornea and the skin. In this work, we inspect the possible involvement of OGN in the atherosclerosis progression using a double knockout mouse model. Methods: In order to examine the progression of atherosclerosis in the absence of OGN, we developed double Apoe and Ogn knockout mice and performed a comparative histo-morphological and immunofluorescence study of the atherosclerotic lesions of Apoe / Ogn / and Apoe / Ogn^{β/β} mice. Results: We demonstrate the presence of Ogn transcript in the aorta of wildtype mice, its absence in Ogn / mice, and the normal histomorphology of arteries of Ogn / mice. The composition of the extracellular matrix and also the cellular content and distribution were similar in atherosclerotic lesions of Apoe / Ogn / and Apoe / Ogn^{β/β} mice. Quantification of the lesion size revealed no significant differences between double and single knockout mice. The incidence, size and distribution of calcium deposits were similar in both groups of mice. Conclusions: The lack of the proteoglycan OGN does not affect the progression of atherosclerosis in mice. Possible causes for the absence of phenotype in the Apoe/Ogn double mutants are discussed.

Unusual anatomical origins of the coronary arteries in C57BL/6 mice. Are they strain specific?

Alejandro López-García, M. Teresa Soto-Navarrete, M. Carmen Fernández, Javier Moncayo-Arlandi, Ana Carmen Durán, Miguel A. López-Unzu, Juan H. Alonso-Briales, Borja Fernández

(2014) *Journal of Anatomy* 229(5):418-425.

DOI: 10.1111/joa.12512

Abstract

A previous manuscript [Fernández B, et al. (2008) *J Anat* 212, 12] reported on the unusual coronary artery patterns in mice belonging to the C57BL/6 strain. The aim here was to elucidate whether this pattern is unique to C57BL/6 mice or appears in other laboratory mouse strains and in wild-living mice. Stereomicroscopy, scanning electron microscopy, light microscopy and a corrosion cast technique were used to examine 597 adult mice belonging to three inbred strains (C57BL/6, Balb/c, DBA/2), three outbred stocks (CD1, OF1, NMRI) two hybrid lines (129sv × BL/6, CD2F1) and wild mice. It was shown that lock-like ostium is an exclusive trait of C57BL/6 mice, whereas left septal artery, accessory ostium, high take-off, intramural course and solitary ostium in aorta are all present in the different laboratory strains and wild mice included in the present study. However, each mouse population shows a specific incidence of these coronary conditions. Several clinically relevant human coronary artery anomalies are present in healthy mice from different strains that may serve as animal models for humans. These results should be taken into consideration in research concerning the murine coronary system, especially in coronary artery occlusion experiments and in studies on cardiovascular developmental biology using murine mutant lines.

Quadricuspid aortic valves in Syrian hamsters and their formation according to current knowledge on valvulogenesis

Alejandro López-García, M. Carmen Fernández, Ana Carmen Durán, Valentín Sans-Coma, Borja Fernández

(2015) Japanese Journal of Veterinary Research 63(1):37- 43. PMID: 25854086

Abstract

Occurrence of quadricuspid aortic valves has been reported in humans, in nine dogs and in a greater white-toothed shrew. Moreover, two cases of developing aortic valves with four anticipated leaflets have been described in Syrian hamster embryos. Currently, however, no case of quadricuspid aortic valve in adult hamsters has been recorded. The aim here is to present four adults of this rodent species, two of them with unequivocally quadricuspid aortic valves and the other two with quadricuspid-like aortic valves. The four anomalous aortic valves were detected among 4,190 Syrian hamsters examined in our laboratory, representing an incidence of 0.09%. None of the affected hamsters showed apparent signs of disease. The present findings are considered on the light of current empirical knowledge about the morphogenesis of quadricuspid and bicuspid aortic and pulmonary valves. Quadricuspid aortic valves result from the partition of one of the normal mesenchymal cushions which normally give rise to normal (tricuspid) valves, while quadricuspid-like valves might be the product of a combined mechanism of fusion and partition of the cushions at the onset of the valvulogenesis. The presence of aortic valves with four leaflets in ancient mammalian lineages such as insectivores and rodents suggest that quadricuspid aortic valves, although showing almost certainly a low incidence, may be widespread among the different groups of mammals, including domestic animals.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

VII. Bibliografía



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

- Angelini P, Villason S, Chan AV, et al. (1999) Normal and anomalous coronary artery in humans. En: Angelini P ed., *Coronary artery anomalies: a comprehensive approach*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, pp:27-150.
- Arqué JM, Cruz V, Antúnez A, Vargas JM, Sans-Coma V (1985) A single coronary vessel in the mouse: a model for experimental study. *Rev Esp Cardiol* 38(4):260-264.
- Arque JM, Cruz V, Rosado LM, Sans-Coma V (1986) Congenital anomalies of coronary arteries in rodents. *Am J Cardiol* 57(6):498-499.
- Arqué JM, Sans-Coma V, Durán AC, Cardo M (1989) Anomalous origin of the left coronary artery at the pulmonary trunk and its relationship with other primary coronary anomalies: experimental study. *Rev Esp Cardiol* 42(6):399-409.
- Arqué JM, Thiene G, Cardo M, Franco D, Durán AC, Sans-Coma V (1993) Anomalous origin of the left coronary artery from the nonfacing aortic sinus: A study in the Syrian hamster. *Cardiovasc Pathol* 2(1):35-39.
- Ballesteros-Acuña LE, Corzo-Gómez EG, Saldarriaga-Tellez B (2007) Coronary's Dominance Determination in Racially Mixed Colombian Population. A Direct Anatomical Study. *Int J Morphol* 25(3):483-491.
- Baptista CA, DiDio LJ, Teofilovski-Parapid G (1989) Variation in length and termination of the right coronary artery in man. *Jpn Heart J* 30(6):789-798.
- Barth CW, Roberts WC 1986 Left main coronary artery originating from the right sinus of Valsalva and coursing between the aorta and the pulmonary trunk. *J Am Coll Cardiol* 7:366-373.
- Basso C, Corrado D, Thiene G et al. (2001) Congenital coronary artery anomalies as an important cause of sudden death in the young. *Cardiology in review* 9(6):312-317.
- Basso C, Corrado D, Thiene G et al. (2002) Coronary artery anomalies and sudden death. *Cardiac Electrophysiology Review* 6:107-111.
- Basso C, Maron BJ, Corrado D et al. (2000) Clinical profile of congenital coronary artery anomalies with origin from the wrong aortic sinus leading to sudden death in young competitive athletes. *J Am Coll Cardiol* 35:1493-1501.
- Beecher N, Carlson C, Allen BR, et al. (2005) An x-ray diffraction study of corneal structure in mimecan-deficient mice. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46:4046e9.
- Becker AE, Losekoot G, Marcelletti C, Anderson RH (1981) Variations of the main coronary arteries. In: *Pediatric Cardiology*. 263-277.
- Bennett BJ, Scatena M, Kirk EA, et al. (2006) Osteoprotegerin inactivation accelerates advanced atherosclerotic lesion progression and calcification in older ApoE^{-/-} mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26:2117e24.
- Boucek RJ, Morales AR, Romanelli R, et al. (1985) *Enfermedades de las arterias coronarias*. Expans, Barcelona, pp: 71-74.
- Cardo M, Fernández B, Durán AC, Arqué JM, Franco D, Sans-Coma V (1994) Anomalous origin of the left coronary artery from the pulmonary trunk and its relationship with

- the morphology of the cardiac semilunar valves in Syrian hamsters. *Basic Res Cardiol* 89(1):94-99.
- Cardo M, Fernández B, Durán AC, Fernández MC, Arqué JM, Sans-Coma V (1995) Anomalous origin of the left coronary artery from the dorsal aortic sinus and its relationship with aortic valve morphology in Syrian hamsters. *J Comp Pathol* 112(4):373-380.
- Cheitlin MD, De Castro CM, McAllister HA (1974) Sudden death as a complication of anomalous left coronary origin from the anterior sinus of Valsalva. A not-so-minor congenital anomaly. *Circulation* 50:780-787.
- Clauss SB, Walker DL, Kirby ML, Schimel D, Lo CW (2006) Patterning of coronary arteries in wildtype and connexin43 knockout mice. *Dev Dyn* 235:2786-2794.
- Corrado D, Pelliccia A, Bjørnstad HH, et al. (2005) Cardiovascular pre-participation screening of young competitive athletes for prevention of sudden death: proposal for a common European protocol. *Eur Heart J* 26:516-524.
- Corrado D, Thiene G, Cocco P, et al. (1992) Nonatherosclerotic coronary artery disease and sudden death in the young. *Br Heart J* 68:601-607.
- Durán AC (1990) Estudio de las arterias coronarias en mamíferos de los órdenes Insectívoros y Rodentia. Tesis Doctoral, Universidad de Málaga, 312pp
- Durán AC (1996) Quadricuspid aortic valve and single coronary artery in a greater white-toothed shrew, *Crociodura russula*. *J Wildlife Dis* 32:658-660.
- Durán AC, Arqué JM, Fernández B, Fernández MC, Fernández-Gallego T, Rodríguez C, Sans-Coma V (2009) Rudimentary coronary artery in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Anat Histol Embryol* 38(4):270-274.
- Durán AC, Arqué JM, Sans-Coma V, Fernández B, de Vega NG (1998) Severe congenital stenosis of the left coronary artery ostium and its possible pathogenesis according to current knowledge on coronary artery development. *Cardiovasc Pathol* 7(5):261-266.
- Durán AC, Fernández B, Fernández MC, López-García A, Arqué JM, Sans-Coma V (2012) Ectopic origin of coronary arteries from the aorta in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J Comp Pathol* 146(2-3):183-191.
- Durán AC, Fernández MC, Fernández B, Fernández-Gallego T, Arqué JM, Sans-Coma V (2007) Number of coronary ostia in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) with normal and anomalous coronary arteries. *Anat Histol Embryol* 36(6):460-465.
- Durán AC, Fernández-Gallego T, Fernández B, Fernández MC, Arqué JM, Sans-Coma V (2005) Solitary coronary ostium in the aorta in Syrian hamsters. A morphological study of 130 cases. *Cardiovasc Pathol* 14(6):303-311.
- Durán AC, Fernández-Gallego T, Fernández B, Fernández MC, Arqué JM, Sans-Coma V (2006) Anomalous origin of the left coronary artery from the right side of the aortic valve in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J Comp Pathol* 134(4):290-296.

- Duran AC, Frescura C, Sans-Coma V, Angelini A, Basso C, Thiene G (1995) Bicuspid aortic valves in hearts with other congenital heart disease. *J Heart Valve Dis* 4(6):581-490.
- Durán AC, Sans-Coma V, Arqué JM, et al. (1992) Blood supply to the interventricular septum of the heart of rodents with intramyocardial coronary arteries. *Acta Zool* 73:223–229.
- Fernández B, Durán AC, Thiene G, Cardo M, Arqué JM, Sans-Coma V (1994) Embryological evidence for the formation of a quadricuspid aortic valve in the Syrian hamster. *Cardiovasc Pathol* 3(4):287-291.
- Fernández B, Durán AC, Fernández MC, Fernández-Gallego T, Icardo JM, Sans-Coma V (2008) The coronary arteries of the C57BL/6 mouse strains: implications for comparison with mutant models. *J Anat* 212(1):12-18.
- Fernández B, Durán AC, Fernández-Gallego T, Fernández MC, Such M, Arqué JM, Sans-Coma V (2009) Bicuspid aortic valves with different spatial orientations of the leaflets are distinct etiological entities. *J Am Coll Cardiol* 54(24):2312-2318.
- Fernandez B, Duran AC, Palomo LJ, et al. (2007) How many coronary arteries are there in mammals? *J Morphol* 268, 1072.
- Fernandez B, Kampmann A, Pipp F, et al. (2003) Osteoglycin expression and localization in rabbit tissues and atherosclerotic plaques. *Mol. Cell. Biochem.* 246:3e11.
- Fernández B, Durán AC, Martire A, López D, Sans-Coma V (1999) New embryological evidence for the formation of quadricuspid aortic valves in the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Comp Pathol* 121(1):89-94.
- Fernández B, Fernández MC, Durán AC, López D, Martire A, Sans-Coma V (1998) Anatomy and formation of congenital bicuspid and quadricuspid pulmonary valves in Syrian hamsters. *Anat Rec* 250(1):70-79.
- Fernández MC, Durán AC, Fernández B, Arqué JM, Anderson RH, Sans-Coma V (2012) Factors other than genotype account largely for the phenotypic variation of the pulmonary valve in Syrian hamsters. *J Anat* 221(1):30-38.
- Fernández MC, Durán AC, Real R, López D, Fernández B, de Andrés AV, Arqué JM, Gallego A, Sans-Coma V (2000) Coronary artery anomalies and aortic valve morphology in the Syrian hamster. *Lab Anim* 34(2):145-154.
- Fernández MC, López-García A, Lorenzale M, Sans-Coma V, Durán AC, Fernández B (2015) Different laboratory mouse strains show distinct coronary artery patterns. *Lab Anim* 49(S3): 62 (ID:64)
- Festing MF (1979) Properties of inbred strains and outbred stocks, with special reference to toxicity testing. *J Toxicol Environ Health* 5(1):53-68.
- Festing MF (1993) Genetic variation in outbred rats and mice and its implications for toxicological screening. *J Exp Anim Sci* 35(5-6):210-20.
- Franco D, Durán AC, Cardo M, Fernández B, Arqué JM, Sans-Coma V (1994) Mucoid

- dysplasia of tricuspid and congenital bicuspid aortic valves in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J Comp Pathol* 111(2):175-183.
- Frescura C, Basso C, Thiene G et al. (1998) Anomalous origin of coronary arteries and risk of sudden death: A study based on an autopsy population of congenital heart disease. *Hum Pathol* 29:609-695.
- Funderburgh JL, Corpuz LM, Roth MR, et al. (1997) Mimecan, the 25-kDa corneal keratan sulfate proteoglycan, is a product of the gene producing osteoglycin. *J. Biol. Chem.* 272:28089e95.
- Garcia Rinaldi R, Cabardillo J, Giles R, et al. (1994) Right coronary artery with anomalous origin and slit ostium. *Ann Thorac Surg* 58, 828–832.
- Glass CK, Witztum JL (2001). Atherosclerosis. The road ahead. *Cell* 104:503-516.
- Hau J (2008) Animal Models for Human Diseases. En: *Sourcebook of Models for Biomedical Research*. Conn PM, ed. Humana Press.
- Henry SP, Takanosu M, Boyd TC, Mayne PM, Eberspaecher H, Zhou W, de Crombrughe B, Hook M, Mayne R (2001) *J Biol Chem* 276(15):12212-12221.
- Expression pattern and gene characterization of asporin, a newly discovered member of the leucine-rich repeat protein family.
- Hocking A., Shinomura T, McQuillan D, (1998) Leucine-Rich Repeat Glycoproteins of the Extracellular Matrix. *Matrix Biology.* (17):1-19
- Houyel L & Planché C (2002) Trajets coronaires interartériel et intramural: aspects anatomiques et implications chirurgicales. *Arch Mal Coeur Vaiss* 95(5):500-506.
- Hurwitz, L. E. and Roberts, W. C. 1973. Quadricuspid semilunar valves. *Am. J. Cardiol.*, 31: 623-626.
- Icardo JM, Colvee E (2001) Origin and course of the coronary arteries in normal mice and in iv/iv mice. *J Anat* 199:473–482.
- Ignatowski AI (1908) Influence of animal food on the organism of rabbits. *St Petersburg Izvest Imp Voyenno-Med Akad* 16, 154–76
- Iozzo RV (1998) Matrix proteoglycan: From Molecular Design to Cellular Function. *Biochem.* 1998. 67:609–52
- Iozzo RV (1999) The biology of the small leucine-rich proteoglycans Functional network of interactive proteins. *Journal of Biological Chemistry.* 274 (27): 18843–18846
- Iozzo RV (1997) The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 32(2):141-174
- Jagannath AD, Johri AM, Liberthson R, Larobina M, Passeri J, Tighe D, Agnihotri AK (2011) Quadricuspid aortic valve: a report of 12 cases and a review of the literature. *Echocardiography* 28:1035-1040.
- Jawien J, Nastalek P, Korbut R (2004) Mouse models of experimental atherosclerosis. *J*

- Physiol Pharmacol 55:503-517.
- Kalpna R (2003) A study on principal branches of coronary arteries in humans. *J Anat. Soc India* 52(2):137-140.
- Kauferstein S, Kiehne N, Neumann T, et al. (2008) Cardiac gene defects can cause sudden cardiac death in young people. *Dtsch Arztebl Int* 106(4): 41-47.
- Kragel AH, Roberts WC (1988) Anomalous origin of either the right or the left main coronary artery from the aorta with subsequent coursing between aorta and pulmonary trunk: analysis of 32 necropsy causes. *Am J Cardiol* 62:771-777.
- Lahoz C, Mostaza JM, (2007) *Revista Española de Cardiología*. 60 (2): 184–195
- Li W, Waldo K, Linask KL, et al. (2002) An essential role for connexin43 gap junctions in mouse coronary artery development. *Development* 129:2031–2042.
- Liberthson RR (1989) Case records of the Massachusetts General Hospital. *N Engl J Med* 720:1475-1483.
- Lusis et al., (2000) Combined Serum Paraoxonase Knockout/Apolipoprotein E Knockout Mice Exhibit Increased Lipoprotein Oxidation and Atherosclerosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 275 (23): 17527–17535
- Mahowald JM, Blieden LC, Coe JI, et al. (1986) Ectopic origin of a coronary artery from the aorta. Sudden death in 3 of 23 patients. *Chest* 89, 669–672.
- McKay R, Smith A, Leung M, Arnold R, Anderson R, (1992) Morphology of the ventriculoaortic junction in critical aortic stenosis. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 104 (2): 434-442
- Montagnana M, Lippi G, Franchini M, et al. (2008) Sudden cardiac death in young athletes. *Inter Med* 47:1373-1378.
- Ohashi R, Mu H, Yao Q, Chen C, (2004) Cellular and molecular mechanisms of atherosclerosis with mouse models *Trends Cardiovasc Med* 14: 187-190
- Pérez-Pomares JM, de la Pompa JL, Franco D, Henderson D, Ho SY, Houyel L, Kelly RG, Sedmera D, Sheppard M, Sperling S, Thiene G, van den Hoff M, Basso C (2016) Congenital coronary artery anomalies: a bridge from embryology to anatomy and pathophysiology—a position statement of the development, anatomy, and pathology ESC Working Group. *Cardiovasc Res* 109(2):204-216.
- Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, et al (1992) Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71:343-53.
- Reig J, Jornet A, Petit M (1993) Patterns of the coronary artery irrigation in the left ventricle. *Surg Radiol Anat* 15(4):309-314.
- Roberts WC (1987) Congenital coronary artery anomalies unassociated with major anomalies of the heart and great vessels. En: Roberts WC ed. *Adult Congenital Heart Diseases*, FA Davis, Philadelphia, pp:583-630.

- Rotgé PP, Ferrando NA, Sahagún NB, et al. (1999) Arteria coronaria derecha con origen, trayecto anómalo e isquemia miocárdica. *Rev Esp Cardiol* 52:1154-1156.
- Sacks JH, Londe SP, Rosenbluth A, et al. (1977) Left main coronary bypass for aberrant (aortic) intramural left coronary artery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 73(5):733-737.
- Salto-Tellez M, Lim SY, El Oakley RM, et al. (2004) Myocardial infarction in the C57BL/6J mouse. A quantifiable and highly reproducible experimental model. *Cardiovasc Pathol* 13, 91-97.
- Sans-Coma V, Arqué JM, Durán AC, Cardo M (1988) Origin of the left main coronary artery from the pulmonary trunk in the Syrian hamster. *Am J Cardiol* 62(1):159-161.
- Sans-Coma V, Arqué JM, Durán AC, Cardo M, Fernández B (1991) Coronary artery anomalies and bicuspid aortic valves in the Syrian hamster. *Basic Res Cardiol* 86(2):148-153.
- Sans-Coma V, Cardo M, Durán AC, Franco D, Fernández B, Arqué JM (1993a) Evidence for quantitative genetic influence on the formation of aortic valves with two leaflets in the Syrian hamster. *Cardiol Young* 3:132-140.
- Sans-Coma V, Arqué JM, Durán AC, et al. (1993b) The coronary arteries of the Syrian hamster, *Mesocricetus auratus* (Waterhouse, 1839). *Ann Anat* 175, 53-57.
- Sans-Coma V, Cardo M, Thiene G, Fernández B, Arqué JM, Durán AC (1992) Bicuspid aortic and pulmonary valves in the Syrian hamster. *Int J Cardiol* 34(3):249-254.
- Sans-Coma V, Fernández B, Durán AC, Thiene G, Arqué JM, Muñoz-Chápuli R, Cardo M (1996) Fusion of valve cushions as a key factor in the formation of congenital bicuspid aortic valves in Syrian hamsters. *Anat Rec* 244(4):490-498.
- Sans-Coma V, Fernández MC, Fernández B, Durán AC, Anderson RH, Arqué JM (2012) Genetically alike Syrian hamsters display both bifoliate and trifoliate aortic valves. *J Anat* 220(1):92-101.
- Sans-Coma V, Franco D, Durán AC, Arqué JM, Cardo M, Fernández B (1994) Cartilage in the aortic valve and its relationship with the aortic valve morphology in Syrian hamsters. *Acta Anat* 149(4):255-263.
- Sans-Coma V, López D, Durán AC, Guerrero A, Fernández-Gallego T, Fernández MC, Arqué JM (2005) Formation of cartilage in congenital bicuspid aortic valves of Syrian hamsters (*mesocricetus auratus*). *J Comp Pathol* 133(1):53-63.
- Serres F, Chetboul V, Sampedrano CC, Gouni V, Pouchelon J-L (2008) Quadricuspid aortic valve and associated abnormalities in the dog: report of six cases. *J Vet Cardiol* 10:25-31.
- Shanahan CM, Cary NR, Osbourn JK, et al. (1997) Identification of osteoglycin as a component of the vascular matrix. Differential expression by vascular smooth muscle cells during neointima formation and in atherosclerotic plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*;17:2437e47.

- Sisson D, Riepe R (2000) Congenital quadricuspid aortic valve anomaly in two dogs. *J Vet Cardiol* 2:23-26.
- Strom A, Ahlqvist E, Franzen A, et al. (2004) Extracellular matrix components in atherosclerotic arteries of Apo E/LDL receptor deficient mice: an immunohistochemical study. *Histol. Histopathol.*;19:337e47.
- Svensson L, Aszodi A, Reinholt FP, et al. (1999) Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization, and altered lumican deposition in tendon. *J. Biol. Chem.* 274:9636e47
- Tasheva ES, Koester A, Paulsen AQ, et al. (2002) Mimecan/osteoglycin-deficient mice have collagen fibril abnormalities. *Mol. Vis.* 2002; 8:407e15.
- Tasheva ES, Klocke B, Conrad GW. (2004) Analysis of transcriptional regulation of the small leucine rich proteoglycans. *Mol. Vis.* 10:758e72.
- Thubrikar M, (1990) The aortic valve. CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida.
- Timperley J, Milner R, Marshall AJ, Gilbert TJ (2002) Quadricuspid aortic valves. *Clin Cardiol* 25:548-552.
- Tutarel O (2004) Quadricuspid aortic valve: a comprehensive review. *J Heart Valve Dis* 13:534-537.
- Virmani R, Chun PKC, Goldstein RE, et al. (1984) Acute takeoffs of the coronary arteries along the aortic wall and congenital coronary ostial valve-like ridges: Association with sudden death. *J Am Coll Cardiol* 3:766-771.
- Virmani R, Rogan K, Cheitlin MD (1989) Congenital coronary artery anomalies: Pathologic aspects. En: Virmani R & Forman MB eds. *Nonatherosclerotic Ischemic Heart Disease*, Raven Press, New York, pp:153-163.
- Von Lüdinghausen M, Ohmachi N (2001) Right superior septal artery with "normal" right coronary and ectopic "early" aortic origin: a contribution to the vascular supply of the interventricular septum of the human heart. *Clin Anat.* (5):312-9.
- Williamson RE, Darrow KN, Giersch AB, et al. (2008) Expression studies of osteoglycin/mimecan (OGN) in the cochlea and auditory phenotype of Ogn deficient mice. *Hear. Res.* 237:57e65.
- Wouters K, Shiri-Sverdlov R, Van Gorp PJ, Van Bilsen M, Hofker MH (2005) Understanding hyperlipidemia and atherosclerosis: lessons from genetically modified apoE and LDLr mice. *Clin Chem Lab Med* 43:470-9.
- Zhang G, Chen S, Goldoni S, et al. (2009) Genetic evidence for the coordinated regulation of collagen fibrillogenesis in the cornea by decorin and biglycan. *J. Biol. Chem.* 284:8888e97.
- Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N (1992) Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258: 468-471



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA