

Luis Hortells García

Mecanismos de calcificación vascular medial en uremia e hiperfosfatemia

Departamento

Anatomía Patológica, Medicina Legal y
Forense y Toxicología

Director/es

Sorribas Alejaldre, Víctor
Sosa Misuraca, María Cecilia

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

MECANISMOS DE CALCIFICACIÓN VASCULAR MEDIAL EN UREMIA E HIPERFOSFATEMIA

Autor

Luis Hortells García

Director/es

Sorribas Alejaldre, Víctor
Sosa Misuraca, María Cecilia

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

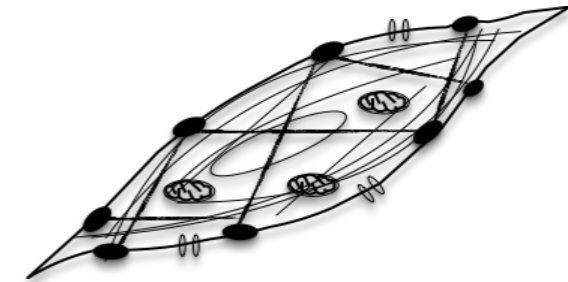
Anatomía Patológica, Medicina Legal y Forense y Toxicología

2016

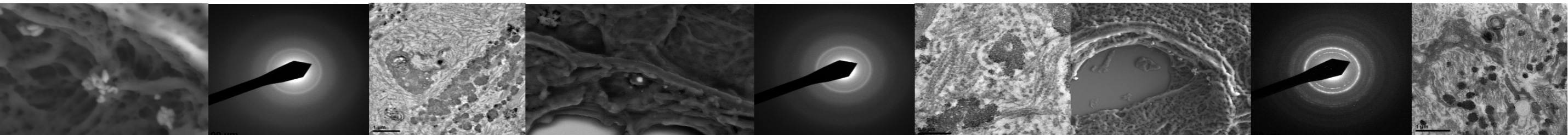


TESIS DOCTORAL

**MECANISMOS DE
CALCIFICACION
VASCULAR MEDIAL EN
UREMIA E
HIPERFOSFATEMIA**



LUIS HORTELLS GARCÍA



ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| I. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DE LAS VSMC AÓRTICAS..... | 5 |
| 2. PATOLOGÍA VASCULAR Y VSMC | 6 |
| 2.1. CALCIFICACIÓN VASCULAR | 9 |
| 2.1.1. CALCIFICACIÓN VASCULAR MEDIAL. | 10 |
| 3. ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA | 13 |
| 4. ALTERACIONES MINERALES Y ÓSEAS EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA. .. | 16 |
| 4.1. CONCEPTO | 16 |
| 4.2. PRINCIPALES FACTORES PATOGENÉTICOS EN LA ERC-MBD. | 17 |
| 4.3. ERC-MBD Y LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES. | 20 |
| 5. CVM IN VITRO..... | 21 |
| 6. TRANSPORTE DE Pi EN LAS VSMC | 23 |
| II. OBJETIVOS | 25 |
| III. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 29 |
| 1. APARATAJE | 31 |
| 2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN | 32 |
| 2.1. EXPERIMENTOS DE CALCIFICACIÓN <i>IN VIVO</i> | 32 |
| 2.2. ANIMALES PARA LA EXTRACCIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE VSMC AÓRTICAS..... | 33 |
| 3. OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DEL CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS DE LA MUSCULATURA LISA VASCULAR..... | 34 |
| 3.1. OBTENCIÓN | 34 |
| 3.2. MANTENIMIENTO | 35 |
| 4. INMUNOFLORESCENCIA..... | 36 |
| 5. EXPERIMENTOS DE CALCIFICACIÓN DE VSMC <i>IN VITRO</i> | 37 |
| 6. ANÁLISIS DE CALCIO Y FOSFATO | 37 |
| 7. ANÁLISIS DE LA MUERTE CELULAR | 38 |
| 8. DETECCIÓN DE PRECIPITADOS DE Ca/P POR DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ.. | 40 |
| 9. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA | 41 |
| 9.1. ANÁLISIS DE LA ULTRAESTRUCTURA DE LOS DEPÓSITOS DE CALCIO EN CULTIVO CELULAR..... | 41 |
| 9.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA EN AORTA..... | 41 |
| 10. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA..... | 42 |
| 10.1. CULTIVO CELULAR..... | 42 |
| 10.2. AORTA | 43 |
| 10.3. PCR NO CUANTITATIVA | 45 |
| 11. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE TNAP | 46 |
| 11.1. CUANTIFICACIÓN COLORIMÉTRICA EN VSMC EN CULTIVO..... | 46 |
| 11.2. TINCIONES PARA TNAP EN CORTES DE AORTA..... | 46 |
| 12. CUANTIFICACIÓN DE PPi EN LA PARED AÓRTICA | 47 |
| 13. ANÁLISIS SANGUÍNEOS | 47 |
| 13.1. UREA Y CREATININA | 47 |
| 13.2. ELISA de PTH, FGF-23y TNF- α | 47 |
| 13.3. FLUORIMETRÍA DE PPi..... | 47 |
| 14. ESTUDIOS DE TRANSPORTE DE Pi EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE VSMC. | 48 |
| 14.1. ESTUDIO DEL EFECTO DEL pH SOBRE EL TRANSPORTE DE Pi..... | 49 |
| 14.2. ANÁLISIS CINÉTICO DEL TRANSPORTE DE Pi..... | 49 |
| 14.3. INHIBICIÓN DEL TRANSPORTE DE Pi EN VSMC | 49 |

| | |
|--|------------|
| 14.4. DEPENDENCIA DE CLORURO DEL SISTEMA DE TRANSPORTE DE Pi..... | 50 |
| 15. WESTERN BLOT | 50 |
| 17. INMUNOHISTOQUÍMICA..... | 52 |
| 18. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 54 |
| IV. RESULTADOS | 55 |
| 1. SOBRE EL ANÁLISIS DEL MÉTODO DE CALCIFICACIÓN VASCULAR IN VITRO | 57 |
| 1.1. ESTUDIOS SOBRE LA MUERTE CELULAR <i>IN VITRO</i> Y SU RELACIÓN CON LA CALCIFICACIÓN VASCULAR..... | 59 |
| 1.2. ANÁLISIS DEL EFECTO DE VARIOS PARÁMETROS DE CULTIVO CELULAR SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR..... | 61 |
| 1.3. EFECTOS DEL pH DEL MEDIO DE CULTIVO DURANTE LOS EXPERIMENTOS DE CALCIFICACIÓN..... | 64 |
| 1.4. NUCLEACIÓN DE FOSFATOS DE CALCIO..... | 68 |
| 1.5. CARACTERIZACIÓN DE LA TOXICIDAD DEL Pi..... | 71 |
| 1.6. ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DE LOS DEPÓSITOS | 74 |
| 2. EVOLUCIÓN LOS SUCESOS TEMPRANOS EN LA CALCIFICACIÓN VASCULAR EN RATAS CON NEFRECTOMÍA 5/6..... | 77 |
| 2.1. CUANTIFICACIÓN DE Ca ²⁺ y Ppi AÓRTICOS..... | 78 |
| 2.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LA AORTA..... | 79 |
| 2.3. ESTUDIOS DE LA EXPRESIÓN DE ARN | 81 |
| 2.4. DETECCIÓN Y LOCALIZACIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNIHISTOQUÍMICA..... | 92 |
| 2.5. TINCIONES AÓRTICAS | 94 |
| 2.6. BIOQUÍMICA SANGUÍNEA | 98 |
| 3. SOBRE LOS ESTUDIOS DE TRANSPORTE DE ³²P EN VSMC. | 103 |
| 3.1. CINÉTICA DEL TRANSPORTE Na-DEPENDIENTE y Na-INDEPENDIENTE de Pi EN VSMC. | 103 |
| 3.2. ESTUDIOS DE INHIBICIÓN DEL TRANSPORTE DE Pi en VSMC | 104 |
| 3.3. EFECTO DEL pH SOBRE EL TRANSPORTE DE Pi EN VSMC..... | 106 |
| 3.4. EXPRESIÓN DE DIFERENTES TRANSPORTADORES Na-INDEPENDIENTES EN VSMC | 107 |
| 3.5. TRANSPORTE DE Pi EN AUSENCIA DE CLORO EN VSMC..... | 109 |
| 3.6. VARIACIÓN DEL TRANSPORTE DE Pi EN VSMC ASOCIADA AL PORCENTAJE DE CONFLUENCIA | 110 |
| 3.7. EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES Na-DEPENDIENTES DE Pi SEGÚN LA EL PORCENTAJE DE CONFLUENCIA DE VSMC..... | 111 |
| V. DISCUSIÓN..... | 113 |
| PARTE 1. SOBRE EL ANÁLISIS DEL MÉTODO DE CALCIFICACIÓN VASCULAR IN VITRO | 115 |
| PARTE 2. SOBRE LOS SUCESOS TEMPRANOS EN LA CALCIFICACIÓN VASCULAR EN RATAS CON NEFRECTOMÍA 5/6..... | 126 |
| PARTE 3. SOBRE LOS ESTUDIOS DE TRANSPORTE DE ³²P EN VSMC..... | 140 |
| VI. CONCLUSIONES..... | 147 |
| 1. SOBRE LA CALFICIACIÓN VASCULAR <i>IN VITRO</i> | 149 |
| 2. SOBRE LAS PRIMERAS ETAPAS DE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR EN RATAS CON NEFRECTOMÍA 5/6..... | 150 |
| 3. SOBRE EL TRANSPORTE DE Pi EN VSMC | 151 |

I. INTRODUCCIÓN

1. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DE LAS VSMC AÓRTICAS

El aparato circulatorio está compuesto por el sistema cardiovascular y el sistema linfático. El sistema cardiovascular se compone del corazón, las venas y las arterias y se encarga de hacer circular la sangre por el organismo, consiguiendo así hacer llegar oxígeno y nutrientes a todos los órganos y tejidos.

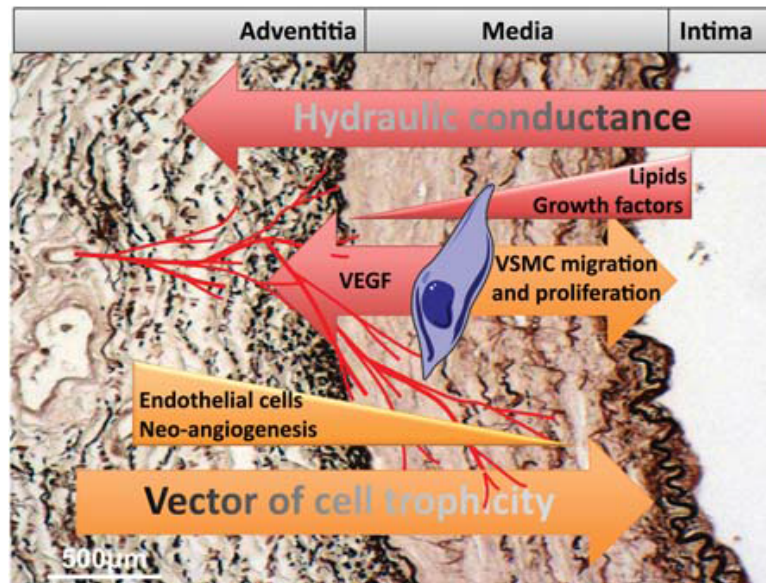
En concreto, las arterias presentan 3 capas o “túnicas” (del interior del vaso hacia fuera): íntima o interna, media y externa o adventicia. La íntima está compuesta por el endotelio, subendotelio (tejido conjuntivo) y una capa elástica. Por otro lado la media está compuesta por capas circulares constituidas por células del músculo liso vascular (VSMC), así como elastina (en su mayor parte), colágeno y otros componentes de la denominada matriz extracelular (MEC). Finalmente, la túnica externa se basa en fibras de colágeno que actúan como protección del vaso, así mismo es el lugar de entrada para vasos linfáticos y fibras nerviosas. En la aorta y alguna de sus ramificaciones, tanto la adventicia como la íntima cuentan con los *vasa vasorum* para su nutrición.

Las VSMCs son, en condiciones normales, las únicas células presentes en la túnica media¹. Tienen una longitud que varía de 15 a 200 μm de largo y de 5 a 10 μm de diámetro y son células de tipo fusiforme. Estas células mantienen un cierto “tono” de forma constante, variando éste en función de estímulos hormonales y nerviosos. Este hecho, les permite controlar la presión sanguínea y mantener la circulación sanguínea bombeada inicialmente por el corazón. Sus funciones más fundamentales consiste en el mantenimiento del flujo sanguíneo generado en el corazón así como colaborar en la reparación de la pared aórtica cuando ésta se ve dañada^{2,3}. Desde el punto de vista molecular, se trata de células con gran variabilidad fenotípica, puesto que su expresión proteica cambia con facilidad en función de las condiciones externas⁴. Esto les otorga la capacidad de generar una amplia variedad de productos como la actina, miosina, elastina, colágeno, proteoglicanos... Siendo muchos de ellos los componentes de la MEC que acompaña a estas células en la túnica media.

La citada variabilidad fenotípica de las VSMC fue determinada hace más de 40 años, cuando se observaron y estudiaron los dos principales fenotipos de estas células: el contráctil o diferenciado, y el sintético^{4,5}. A pesar de que en la túnica media las VSMC se encuentran en estado contráctil (lo que les permite como su nombre indica, contraerse y relajarse, y por lo tanto hacer que el vaso se contraiga y se adapte a la onda de pulso correspondiente), en diversas situaciones como la aterosclerosis, o bajo un trauma directo en el vaso (por ejemplo tras intervenciones quirúrgicas en las que se manipulen los vasos sanguíneos) este fenotipo cambia hacia sintético, el cual es el observado, además, cuando estas células llevan a cabo la mitosis^{4,6,7}. Este hecho queda confirmado por la baja tasa de mitosis observada en las VSMC de la media (de fenotipo mayoritariamente contráctil). Para la caracterización de estos dos principales fenotipos, se han utilizado varias proteínas como marcadores de fenotipo contráctil o diferenciado, como la α -actina, SM-MHC (Smooth Muscle Heavy Chain Miosin), calponina, SM22 α , ACLP (Aortic carboxipeptidase-like protein), desmina, metavinculina o la telokina⁸⁻¹⁴. La función de estas proteínas está relacionada con la contractibilidad celular, mientras que por otro lado, se ha observado que tanto la OPN como la MGP, proteínas importantes en el desarrollo óseo, se encuentran más expresadas en células con menor capacidad contráctil, estando este fenómeno especialmente relacionado con la aterosclerosis¹⁴.

2. PATOLOGÍA VASCULAR Y VSMC

Las VSMC se encuentran constantemente expuestas a las diferentes moléculas circulantes de la sangre que migran desde los *vasa vasorum* a través de la pared del vaso, no sucediendo así con las células de la serie blanca las cuales, a pesar de no ser imposible, presentan dificultades para migrar, adherirse y proliferar en la media³. Por otro lado, las VSMC están expuestas a constantes cambios de tono, siendo en ocasiones éstos realmente importantes (como por ejemplo en casos de hipertensión), por lo que no es de extrañar que este tipo celular tenga un papel importante en la patología vascular.



Diferentes agentes que afectan a las VSMC en direcciones opuestas: presión hidráulica de la íntima hacia la media, y migración de VSMC de la media a la íntima, y células endoteliales de la adventicia a la media³.

Ya se ha comentado la variabilidad fenotípica que las VSMC presentan en estado fisiológico, cambiando de fenotipo contráctil a proliferativo. Esta *plasticidad* que presentan las VSMC se hace de vital importancia en condiciones patológicas, dado que estas células reaccionan modificando su fenotipo en función de los estímulos a los que se ven sometidas. Un ejemplo muy claro es el modo en que estas células responden de forma diferente a moléculas tan similares como lipoproteínas de baja densidad (LDLs) nativas o LDLs modificadas¹⁵. Con todos estos datos, no es de extrañar que se haya estudiado y descrito, entre otras, la participación de estas células en numerosas patologías vasculares como puede ser la hipertensión, la senescencia, la formación de ateromas y la calcificación vascular (tanto de la íntima como de la media).

El ejemplo de la participación de las VSMC en la hipertensión es de gran importancia, puesto que, si bien tradicionalmente se ha considerado que ésta se debía únicamente a la regulación renal (eje renina-angiotensina-aldosterona), actualmente se han descrito factores mecano-transduccionales en las VSMC, que pueden colaborar en el estado hipertensivo¹⁶. De forma resumida, diremos que las interacciones entre la MEC y la integrina-citoesqueleto, provocan que las VSMC sean capaces de detectar cambios en la presión intraluminal y responder a esos

cambios¹⁷. Entre los diferentes tipos de respuestas de las VSMC se encuentran la hiperplasia¹⁸, hipertrofia¹⁹ y la pérdida de la adhesión al tejido²⁰, estando todas estas respuestas mediadas por integrinas.

Por otro lado, otro factor de gran importancia, que además ha sido estudiado previamente en el laboratorio donde se ha realizado esta tesis doctoral, es el del envejecimiento vascular y la senescencia. De forma muy resumida, cabe decir que en el envejecimiento del individuo, las VSMC participan de dos formas: alterándose funcionalmente, por medio de cambios en la expresión de proteínas de contractilidad y de componentes de la MEC, sufriendo apoptosis, desarrollando un fenotipo inflamatorio, etc. o, migrando y multiplicándose en la íntima, debido a una menor capacidad mitótica de las células endoteliales^{21,22}.

En cuanto a las respuestas de las VSMC a la sobreexposición lipídica, podemos también enumerar varios tipos como por ejemplo favorecer la proliferación de la íntima (proliferando ellas mismas), la formación de fibronectina, proteoglicanos y colágeno^{23,24} para envolver las acumulaciones lipídicas; la fagocitosis de lípidos y restos celulares (en ocasiones procedentes de la apoptosis de otras VSMC) hasta el punto de expresar CD68, el cual se consideraba únicamente expresado en macrófagos²⁵⁻²⁷ o, la liberación de factores angiogénicos que permiten la neovascularización en las placas ateromatosas²⁸. Finalmente, de enorme importancia también es su participación en la calcificación de estas placas, modificando su fenotipo hacia osteoblástico.

Tanto la senescencia, la hipertensión, y formación de placas ateromatosas, han sido así mismo estudiadas como causa, consecuencia o aceleradoras de otra patología de enorme importancia y de gran prevalencia, la calcificación vascular. Dado que su estudio es el objetivo de esta tesis, a continuación vamos a realizar un resumen más profundo de la misma.

2.1. CALCIFICACIÓN VASCULAR

Considerada actualmente un marcador independiente de riesgo cardiovascular^{29,30}, la presencia de calcificaciones en los vasos sanguíneos se conoce desde hace más de 200 años³¹, si bien no ha sido hasta más recientemente, con el desarrollo de la biología molecular y celular, que éstas han dejado de considerarse un proceso pasivo normalmente asociado a necrosis o daño tisular, para ser reconocidas como un proceso activo, en el que intervienen alteraciones de proteínas de la matriz, proteínas osteogénicas, inhibidores de la calcificación...^{32,33}. Si bien esta calcificación puede aparecer tanto en la íntima (CVi) como en la media (CVM) (y en ocasiones en ambas)³⁴, las dos poseen características diferentes. En primer lugar, la CVM suele ser principalmente local mientras que la CVi es observada más a menudo de forma generalizada. Por otro lado, en la íntima, la calcificación aparece asociada a placas ateromatosas y en pacientes de mayor edad, mientras que la CVM suele aparecer en pacientes más jóvenes (mediana edad) sobre lesiones de la elastina³⁰. Finalmente, una de las diferencias más claras entre la CVi y CVM consiste en la presencia de reacción inflamatoria en los casos en los que la íntima está afectada, mientras que el componente inflamatorio en la CVM está aún bajo estudio y es de mucha menor importancia³⁵.

Sin embargo, algo que presentan en común ambos tipos de calcificaciones, es la participación activa de las VSMC. A pesar de que existen factores externos que pueden hacer variar ligeramente las rutas metabólicas activadas (como el componente inflamatorio de la CVi o la degradación de elastina en la CVM), las VSMC llevan a cabo en ambos casos cambios similares, como e la formación de vesículas de membrana (comportamiento típico de los osteoblastos y los condroblastos durante la calcificación fisiológica)³⁶, la transdiferenciación hacia un fenotipo osteoblástico (produciendo proteínas calcificantes como BMP2³², osteonectina, osteocalcina, Runx2³⁷...) o la entrada en apoptosis, tras lo cual, los restos apoptóticos actúan como nido para la calcificación³⁸⁻⁴⁰.

2.1.1. CALCIFICACIÓN VASCULAR MEDIAL.

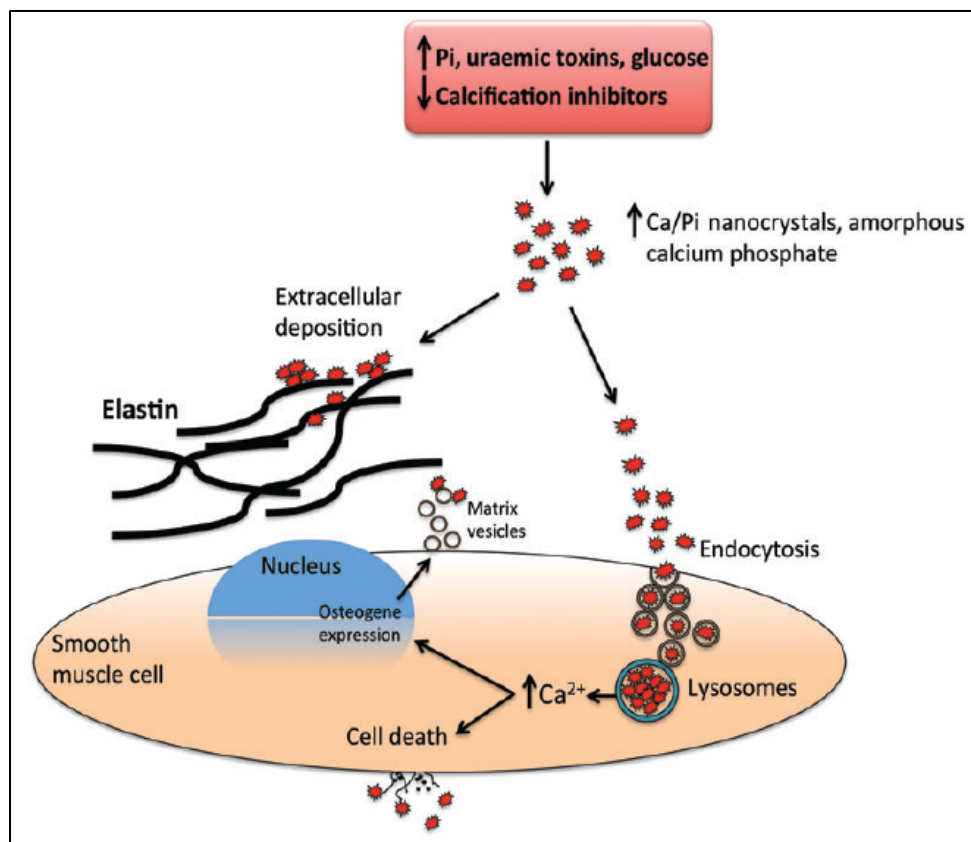
Centrándonos en el tipo de calcificación que ha sido estudiado en esta tesis, la CVM (o esclerosis de Mönckeberg, por el patólogo que la estudió inicialmente³⁴), es importante comentar que la prevalencia de la misma se ha estimado en un 0.5% en los adultos, siendo más común en hombres que en mujeres (3:2)⁴¹ y ascendiendo hasta un 17% en diabéticos tipo 2 (DT2) recién diagnosticados y un 41.5% en diabéticos en tratamiento antidiabético por vía oral. En pacientes enfermos renales crónicos (ERC) la prevalencia es del 27%^{29,42}, aumentando hasta el 39.5% en los casos más avanzados que se encuentran en diálisis a la espera de un trasplante renal^{30,43}.

Desde el punto de vista patológico, en la revisión de la enfermedad realizada recientemente por Lanzer y cols.³⁵, se establecen los estadios histológicos de la enfermedad de forma muy clara (si bien por otro lado, sigue sin establecerse si existe una etapa previa a la aparición de las calcificaciones en la que existan otros cambios moleculares):

- I. Calcificaciones granulares a lo largo de las fibras elásticas, cerca de las VSMC.
- II. Incremento del tamaño de las calcificaciones, llegando a confluír en superficies sólidas que distorsionan la media sin llegar a ocupar completamente la circunferencia del vaso. Aparece asociada una hiperplasia subentodelial de la íntima.
- III. Las calcificaciones alteran toda la circunferencia del vaso.
- IV. Las calcificaciones comienzan a dar paso a focos de formación de hueso (metaplasia ósea).

En cuanto a los cambios moleculares y bioquímicos que tienen lugar durante la calcificación, se ha podido concluir que la CVM es un proceso complejo, en el que existen diferentes rutas por las que se puede producir la calcificación, quedando aún por determinar si todas ellas parten de un punto en común y cuál es el orden real de los sucesos. Muchos resultados parecen apuntar a una relación

entre la calcificación que tiene lugar en los huesos de forma fisiológica y la CVM. Por ejemplo, las VSMC cambian su fenotipo hacia uno aparentemente osteocondrogénico, aumentando la expresión de proteínas como BMP2, Runx2, Msx2, TNAP^{32,44}... Otro ejemplo, es el de la formación de vesículas de matriz. Un gran número de estudios afirman que las VSMC forman vesículas de matriz (con elementos anticalcificantes en su interior) al igual que los osteoblastos y condroblastos durante la calcificación, si bien también se han observado fragmentos de cuerpos apoptóticos y necróticos, pudiendo actuar todos ellos como nidos para la formación de cristales de Ca/P⁴⁵⁻⁵⁰. El desencadenamiento de la apoptosis de las VSMC ha sido estudiado como consecuencia de la internalización de nanopartículas de Ca/P de entre 30 y 500nm, las cuales serían disueltas en los lisosomas, produciendo un aumento transitorio del calcio intracelular, activando la apoptosis de las mismas y produciendo necrosis^{45,51}. Por otro lado, mientras que en los huesos los depósitos de calcio se depositan en el colágeno tipo I, en las arterias lo hacen en la elastina, principalmente en la degradada (por elastasas y/o daño mecánico)^{52,53}.



Principales vías patológicas por las que se produce la CVM³⁵.

Existen otros frentes de estudio y otras teorías no excluyentes entre sí, como por ejemplo la pérdida de inhibidores de la calcificación (PPi⁵⁴, MGP⁵⁵, fetuina-A⁵⁶, osteoprotegerina (OPG)⁵⁷, etc. Si bien el papel de la inflamación en la CVM no parece ser tan importante como el de la íntima, sí que se ha descrito una sobreexpresión de la citoquina TNF- α , la cual puede activar la diferenciación osteocondrogénica⁴⁶. Otros abordajes del estudio de esta enfermedad pasan por el estudio del control génico de los microARN⁵⁸, el estrés del retículo endoplásmico⁵⁹, activación del inflammasoma⁶⁰...

La principal consecuencia funcional de estas alteraciones en la media consiste en la alteración de la contractibilidad y relajación de los vasos y, por lo tanto, del flujo sanguíneo, produciéndose un aumento de la velocidad de la onda de pulso en la pared de la aorta, pudiendo esto afectar a la perfusión tisular y creando además un reflujo en el ventrículo izquierdo que conlleva hipertrofia del mismo, disfunción diastólica y fallo cardíaco^{30,61,62}. En los casos más avanzados la mala perfusión tisular es una realidad, pudiendo llevar a la formación de trombos. Además de lo comentado, existen otras posibilidades por las que la calcificación vascular medial podría actuar empeorando la funcionalidad cardiovascular, como por ejemplo dificultando la remodelación en la aterosclerosis o aumentando el riesgo de tromboembolismos en los casos más avanzados (grado 4 según Lanzer y cols.) en los que la calcificación interfiere en la íntima³⁵.

El diagnóstico de esta patología en humanos se realiza normalmente a través del cálculo del índice tobillo-brazo (presión sistólica de las arterias tibiales posteriores y podales frente a la de las humerales)⁶³, si bien en ocasiones es encontrado accidentalmente en radiografías de la pelvis y las extremidades distales. A pesar de ello, estos métodos no son capaces de detectar la CVM en sus estadios más tempranos y por el momento no se ha estandarizado ningún biomarcador de la misma debido a resultados negativos o contradictorios^{64,65}.

Por el momento no existe un método clínico para revertir la CVM en ninguno de sus contextos, si bien para su control se hace vital un manejo adecuado de la enfermedad concomitante (en los casos de DT2 y de ERC), no existiendo

terapia alguna en los casos de CVM asociada al envejecimiento. En el caso concreto de que la CVM apareciera asociada a hiperfosfatemia (parámetro actualmente reconocido como acelerador de la calcificación), se podrían administrar quelantes del fosfato, calcimiméticos, magnesio y/o análogos del pirofosfato inorgánico (PPI)⁶⁶⁻⁶⁸. Finalmente, el déficit de vitamina K (ya sea patológico o por tratamientos con antagonistas de la misma), se ha correlacionado también con la CVM, probablemente debido a que esta vitamina es necesaria para la activación de ciertas proteínas mediante carboxilación, entre ellas la MGP, un potente inhibidor de la calcificación^{69,70}. En estos casos esta indicada la administración de la forma activada de la vitamina K está indicado.

Uno de los principales objetivos de esta tesis fue el estudio de los estadios más tempranos de la CVM asociada a la ERC, por lo que la introducción continuará con un resumen sobre la enfermedad renal crónica y el eje riñón-hueso-vasculatura.

3. ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

Los riñones son los órganos encargados de la producción de orina gracias al filtrado y eliminación de las sustancias de desecho a través de la misma, mantenimiento de la homeostasis por reabsorción en mayor o menor medida de electrolitos como el Na⁺, K⁺, Cl⁻..., control del status ácido-base sanguíneo por la eliminación controlada de protones, y colaboración en el control de la presión sanguínea participando en el eje renina-angiotensina-aldosterona.

Cuando los riñones sufren daños, o la tasa de filtración glomerular (TFG) es inferior a 60 ml/minuto/1.73 m² durante más de 3 meses, se considera que existe una ERC independientemente de la etiología. Actualmente se han establecido 5 grados de ERC según su gravedad⁷¹⁻⁷³:

| Estadio de la ERC | TFG (ml/min/1.73 m²) | Características adicionales requeridas |
|--------------------------|--|---|
| 1 | ≥90 | Evidencia de daño renal |
| 2 | 60-89 | Evidencia de daño renal |
| 3 | 30-59 | - |
| 4 | 15-29 | - |
| 5 | <15 | - |

En los pacientes en estadio 5 (el cual se considera incompatible con la vida), requieren obligatoriamente de diálisis o trasplante renal.

La etiología de la ERC es muy variada, pudiéndose clasificar según su origen en tres grandes grupos: causas pre-renales, renales y post-renales⁷⁴. De forma muy breve, las causas pre-renales consisten en patologías de la arteria renal, mientras que dentro de la variedad de las causas renales destaca la nefropatía diabética. En cuanto a las causas post renales estas suelen ir relacionadas con obstrucciones de las vías urinarias, si bien en machos también pueden ir de la mano de problemas prostáticos. La prevalencia de unas causas u otras varia en gran medida según etnias, zonas geográficas y el nivel de desarrollo de los países, siendo por ejemplo más común la ERC asociada a hipertensión, diabetes (esta supone el origen del 40% de los casos en estos países) y obesidad en Europa occidental y EE.UU., mientras que las causas de origen tóxico o infeccioso se dan más en países en vías de desarrollo⁷⁵. En líneas generales, en 2006 se estableció que en EE.UU. un 11.5% de la población presentaba ERC (un 4.8% en fase 1-2, y un 6.7% en fase 3-5), pero se considera que debido al aumento de los casos de obesidad y DT2, estas cifras son mayores a día de hoy⁷⁶. Estudios llevados a cabo en otros países reflejan ligeras variaciones pero confirman el mismo resultado⁷⁷.

Desde el punto de vista patológico, la enfermedad se basa en el daño y pérdida de la unidad funcional de los riñones, la nefrona. A consecuencia de esto, el resto de las nefronas intentan compensar la falta de las dañadas aumentando su tasa de filtración (“hiperfiltrando”), para mantener la TFG global. Este fenómeno a la larga provoca daño endotelial, esclerosis glomerular y finalmente pérdida de las nefronas. Una de las consecuencias de todo esto, es la pérdida de proteínas a través de la orina (proteinuria), debido al hiperfiltrado y el daño glomerular, lo que acaba provocando inflamación y fibrosis intersticial. Finalmente, la ERC avanza de forma

lineal e independiente a la causa original, debido al propio intento de control de la TFG llevado a cabo por el riñón. En algunos casos en los que la enfermedad está más o menos estabilizada en una determinada fase, ciertas situaciones (como sepsis, intoxicaciones, etc) pueden hacer que progrese hacia la siguiente.

Su diagnóstico en los primeros estadios puede hacerse a través la medición de la presión sanguínea (en casos de hipertensión), de bioquímicas sanguíneas rutinarias a través de la concentración de creatinina^{78,79} y de la presencia de albúmina en orina⁸⁰. Además es también muy importante valorar los factores de riesgo anteriormente comentados (etnia, DT2, etc) para el desarrollo de la ERC⁸¹.

Durante la ERC la eliminación deficiente de sustancias de desecho, lleva a un estado que se conoce como uremia, y que consiste básicamente en la acumulación de estas sustancias (común, pero erróneamente conocidas como “toxinas urémicas”). Entre las complicaciones más comunes de la uremia encontramos la hipertensión la cual está presente en un 75% de los casos y va asociada a la retención de NaCl, al aumento del tono vascular debido al control defectuoso del eje renina-angiotensina-aldosterona, la inhibición de la bomba Na/K -ATPasa así como a una deficiencia de óxido nítrico; la anemia que aparece en un 50% de los casos de ERC y está asociada a un déficit de producción de eritropoyetina, así como a una médula ósea menos sensible a la misma; por otro lado, en un 20% de los casos se observa hiperparatiroidismo, hiperfosfatemia y acidosis metabólica; y finalmente, entre un 5 y un 10% de los enfermos de ERC humanos también se puede presentar hipocalcemia y baja albúmina sanguínea^{72,75-77,82}. En concreto, son para nosotros de especial interés las alteraciones minerales y óseas en el contexto de la ERC (ERC-MBD). Éstas, vienen dadas por alteraciones del Pi, Ca²⁺, 1,25-dihidroxicolecalciferol (calcitriol), hormona paratiroidea (PTH), factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23), anormalidades morfológicas óseas y calcificación vascular⁸³.

4. ALTERACIONES MINERALES Y ÓSEAS EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.

Las enfermedades cardiovasculares (ECs) concomitantes a la ERC (siendo una de sus manifestaciones la CVM), continúan siendo la principal causa de muerte en pacientes con ERC en todos sus grados de avance, incluso en pacientes trasplantados⁸⁴. En algunos casos, son las propias EC las causantes de la ERC, pero aunque no lo sean, aparecen en estadios muy tempranos de la misma, a pesar de que la bajada de la TFG todavía es suave⁸⁵. La elevada prevalencia de las EC en ERC no puede ser explicada únicamente por los factores de riesgo tradicionales como hipertensión, diabetes, obesidad o el ser fumador, sino que debemos recurrir a factores de riesgo determinados más recientemente para poder explicarla^{86,87}. Estos nuevos factores consisten básicamente en los componentes más tradicionales de la ERC-MBD (FGF23, VC, hiperfosfatemia...), si bien en los últimos años se han encontrado nuevos participantes, como puede ser la proteína antienvjecimiento klotho o los inhibidores de Wnt (wingless/integrated-1)⁸⁸⁻⁹³. Por otro lado, el papel que desempeñan estos factores en la ERC-MBD y la CVM siguen siendo motivo de gran controversia, con numerosos artículos en los que se duda o incluso se niega su participación en estas enfermedades. Las incógnitas sin resolver llegan hasta el punto de que aún no está clara la expresión, por ejemplo, de klotho en las arterias⁹⁴⁻⁹⁷. Todo esto, hace que el estudio de la ERC-MBD resulte muy atrayente y que muchos grupos internacionales trabajen en este campo.

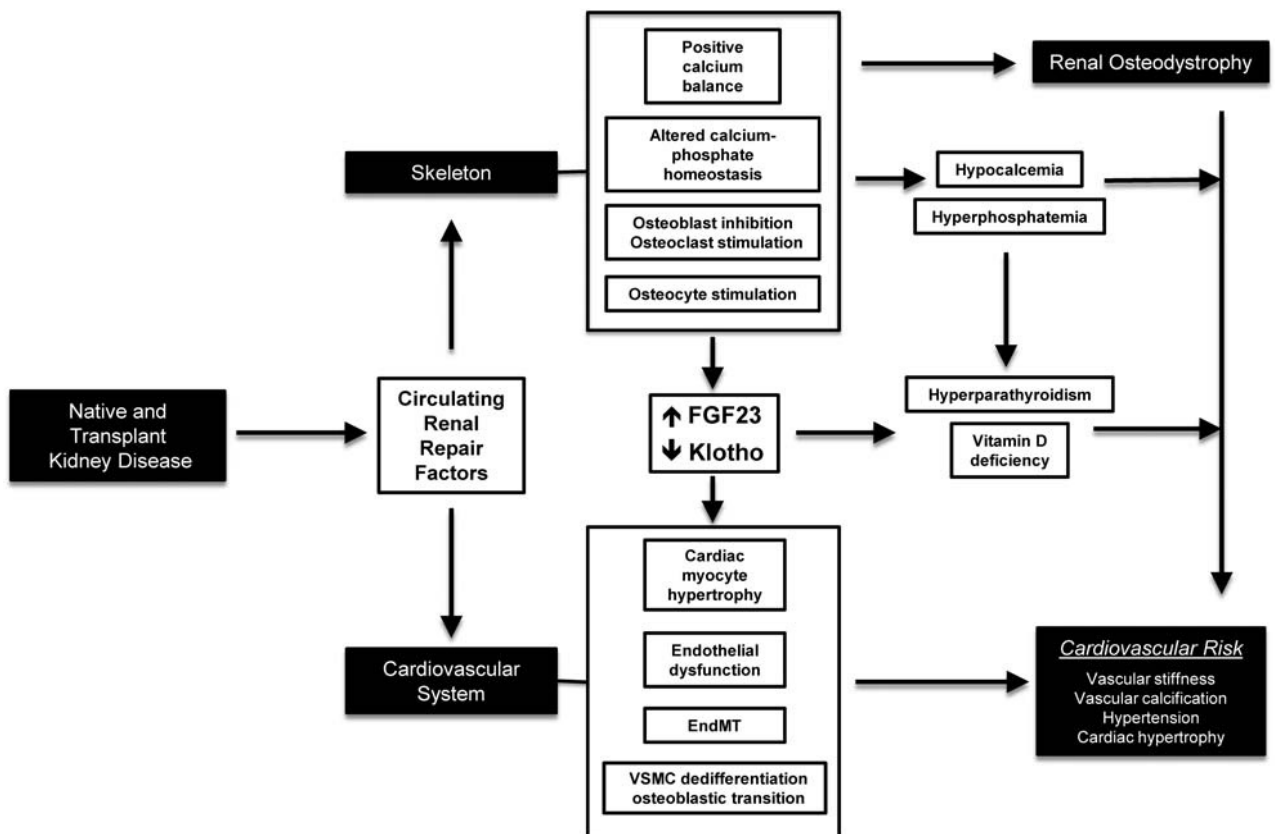
4.1. CONCEPTO

Antiguamente conocida como osteodistrofia renal (referida tan sólo a cambios morfológicos del hueso), las alteraciones de la homeostasis del hueso, son ampliamente conocidas y se relacionan directamente con el avance de la ERC. Con el tiempo, se observó que el concepto de osteodistrofia renal no recogía de forma adecuada todos los cambios metabólicos y moleculares que se producían en relación al hueso y los minerales así que desde el año 2006 se pasó a reconocer como el desorden sistémico del metabolismo mineral y óseo, bajo el nombre de

CKD-MBD (de las siglas en lengua inglesa Chronic Kidney Disease-Mineral Bone Disorder)⁸³.

4.2. PRINCIPALES FACTORES PATOGENICOS EN LA ERC-MBD.

Existen un gran número de factores patogénicos desde el comienzo de la ERC hasta su estadio terminal, por lo que los dividiremos temporalmente. Además, a modo de resumen, a continuación se añade el gráfico presente en la revisión de la ERC-MBD realizada por el Prof. Hruska y cols⁹⁸.



4.2.1. FACTORES PATOGENICOS EN ESTADIOS INICIALES DE LA ERC

- FGF23: Se trata de una fosfatona que regula la excreción de fosfato y está producida por osteoblastos y osteocitos, representando la conexión principal entre hueso-riñón y hueso-paratiroides. Sus niveles en sangre suben rápidamente en ERC, incluso en los casos menos graves debido a un aumento en la liberación en los osteocitos así como una disminución de su

catabolismo renal. De hecho, varios estudios confirman que aumenta previamente a que se produzcan cambios en el fosfato, calcio y PTH sanguíneos, convirtiéndolo en un potencial biomarcador de ERC-MBD⁹⁹⁻¹⁰². Por el momento, se ha demostrado la participación del FGF23 en la hipertrofia ventricular¹⁰³ e hipertensión¹⁰⁴.

- KLOTHO: Si bien la señal de FGF23 es normalmente mediada por los receptores de FGF23, para ello es requerida normalmente la participación del co-receptor klotho¹⁰⁵. La proteína completa de klotho es muy abundante en ciertos tejidos como los túbulos renales, las glándulas paratiroideas y el cerebro^{95,97,106}. Por otro lado, también existe una forma circulante de esta proteína, generada por el corte, por medio de ADAM 10 ó 17¹⁰⁷, de la forma completa en la superficie celular, o bien por empalmado alternativo durante su transcripción¹⁰⁶. Esta forma circulante de klotho actúa directamente como regulador del metabolismo mineral, controlando la secreción de FGF23, PTH y 1- α hidroxilasa^{105,108}. Durante la ERC, la producción renal de klotho disminuye, favoreciendo la hiperfosfatemia y bloqueando la retroalimentación negativa del FGF23 en los osteocitos, aumentando la producción del mismo. Se ha demostrado que esta sobreproducción de FGF23 puede provocar activaciones anómalas del receptor de FGF23, causando, por ejemplo, hipertrofia de los miocitos cardiacos¹⁰³. Numerosos estudios correlacionan la disminución de klotho con otras patologías, como la CVM, aunque, como se ha comentado anteriormente, se han publicado artículos que lo desmienten⁹⁴.

4.2.2. FACTORES PATOGENICOS EN ESTADIOS AVANZADOS

DE LA ERC.

- HIPOCALCEMIA: Se desarrolla solo en los últimos estadios de la ERC, cuando ya existen alteraciones de FGF23, vitamina D, Pi y PTH^{109,110}. La hipocalcemia genera una mayor liberación de PTH (hiperparatiroidismo secundario), efecto que se evita con la administración de calcimiméticos. Todo esto, compondría la regulación de la homeostasis del calcio (el control de la parte circulante), pero además de esta, debemos tener en cuenta el

balance total de calcio en el organismo, el cual es referido a la cantidad total de calcio en el mismo, independientemente de la concentración sérica. Así pues, se puede dar el caso de que pacientes con hipocalcemia tuvieran un balance positivo del calcio y al revés.¹¹⁰ Esto es importante porque se ha observado que en pacientes con ERC, incluso con un balance neutro de calcio, e independientemente de la cantidad de calcio circulante, un pico del mismo en la ingesta (por ejemplo a través del carbonato cálcico utilizado como quelante del Pi), puede llevar a un estado de balance positivo temporal, el cual incrementa en gran medida el riesgo de calcificaciones ectópicas (por ejemplo CVM)^{111,112}.

- **HIPERFOSFATEMIA:** Debido a la pérdida de nefronas funcionales, la eliminación de Pi se mantiene, disminuyendo la reabsorción del mismo en los túbulos renales, por medio de un aumento en la señalización de FGF23 y PTH¹¹³⁻¹¹⁵. A pesar de esto, debido a que la cantidad de klotho se encuentra disminuida, poco a poco la función fosfatúrica de FGF23 va perdiendo importancia y la señalización para el bloqueo de la reabsorción recae sobre PTH. Este mecanismo es efectivo hasta que se alcanzan valores de TFG menores a 30 ml/min/1.73 m² (fase IV-V), momento en el que el aumento de PTH deja de compensar, y se produce la hiperfosfatemia¹¹³. Como se ha comentado anteriormente, los altos niveles de Pi en sangre se consideran un factor primario para el desarrollo de CVM, acelerando la transdiferenciación osteoblástica³⁵. Además, hay que tener en cuenta la alta concentración de Pi en la sangre, disminuirá la actividad de 1- α -hidroxilasa¹¹⁶, y por lo tanto de la formación de calcitriol, aumentando la producción de FGF23¹¹⁷ en los osteocitos así como una hiperplasia de la paratiroides y aumento en la producción de PTH en la misma¹¹⁸.
- **HIPERPARATIROIDISMO:** Debido a los cambios en FGF23, Pi, PTH, etc, la glándula paratiroides se hipertrofia, aumenta la secreción de PTH de forma mantenida, y acaba haciéndose insensible a todos estos factores. Todavía no está claro si desde el comienzo FGF23 comienza a causar las alteraciones de la composición de los huesos asociadas a la ERC, o si por otro lado es

únicamente la subida de PTH la que los genera, pero independientemente de ello, conforme la ERC avanza, la producción de colágeno tipo 1 por parte de los osteocitos disminuye a favor de la mayor producción de RANKL (ligando del receptor activador de $\text{NFK}\beta$), produciendo fragilidad ósea y aumentando las probabilidades de fracturas todo por aumento de la reabsorción ósea y la osteodistrofia renal.

4.2.3. NUEVOS FACTORES PATOGÉNICOS

- **WNT Y LOS MECANISMOS DE REPARACIÓN RENAL:** Durante la ERC, el riñón intenta reparar las nefronas dañadas, liberando factores de reparación tisular (por medio de vías autocrina y paracrina), como los de la ruta Wnt (ruta que produce el desarrollo epitelial y que en condiciones fisiológicas se encuentra desactivada en el riñón adulto). La activación de esta ruta acarrea así mismo la sobreexpresión de inhibidores circulantes de la misma, como el Dickkopf1 (DKK1), esclerosina o activina-A. Por medio de modelos animales, se ha demostrado que estos inhibidores circulantes afectan tanto a los huesos como al aparato cardiovascular. En el caso del hueso bloquean por ejemplo la proliferación y aumentan la secreción de FGF23, mientras que en los vasos provocan desdiferenciación de las VSMC y transdiferenciación osteoblástica de las mismas, favoreciendo la CV, y en consecuencia la hipertrofia cardiaca. Si bien estas investigaciones resultan prometedoras porque los cambios aparecen de forma muy temprana y podrían usarse como dianas farmacológicas, estos sucesos han sido únicamente probados en ciertos modelos animales, quedando un importante camino aún por hacer en enfermos renales humanos^{91,119-125}.

4.3. ERC-MBD Y LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES.

Como ya se ha comentado en diferentes puntos de la introducción, la ERC-MBD favorece la CV y el engrosamiento de las paredes de los vasos, generando

hipertrofia del ventrículo izquierdo, y aumentando el riesgo de complicaciones cardiovasculares. En modelos animales se ha demostrado que desde momentos muy tempranos de la ERC, se producen cambios fenotípicos en las aortas, perdiendo proteínas contráctiles, y aumentando la transición a fenotipo osteoblástico^{66,91}.

A pesar de la prevalencia y la mortalidad de la CVM, esta introducción da una idea de la complejidad de esta patología en el que participan diferentes factores y rutas patológicas de las cuales queda mucho por comprender. Para realizar avances reales en este campo, sería necesario aclarar puntos clave, como el desencadenante de la enfermedad, así como si este es el mismo en todos los trasfondos en los que aparece la misma, los cambios más tempranos *in vivo* así como la relación de estos con lo que sucede en los estudios *in vitro*. Por ello se decidió abordar la CVM desde varios puntos, comenzando con el análisis del método *in vitro* más utilizado (intentando esclarecer que sucede realmente en este modelo, el cual presenta una gran variabilidad de resultados), la descripción de los cambios más tempranos que se producen en la CVM asociada a la ERC (analizando factores tradicionalmente estudiados así como otros más nuevos y que componen la comentada ERC-MBD) y los mecanismos de incorporación del Pi en las VSMC, para comprender su importancia en la CVM.

5. CVM IN VITRO

Desde el siglo XIX, con los primeros experimentos con tampones salinos simulando los fluidos vitales, se observó la posibilidad de mantener tejidos vivos fuera del organismo de origen¹²⁶. Con esta filosofía, ya en 1885 Wilhelm Roux, extrajo la placa medular de embriones de pollo y fue capaz de mantener éstas células en un recipiente externo atemperado y con un tampón salino durante varios días, estableciendo los orígenes de los cultivos tisulares¹²⁷. Tras esto, lentamente se fueron haciendo avances en este campo, pero no fue hasta la década entre 1940-50 cuando se estableció la metodología de los primeros cultivos

celulares *in vitro* así como las primeras líneas celulares consolidadas, como por ejemplo, los fibroblastos¹²⁸⁻¹³⁰.

En cuanto a las células de la musculatura lisa, varias líneas celulares fueron clonadas hasta que se consiguió una con características únicamente de musculatura lisa, obteniéndose de la aorta de lechones recién nacidos¹³¹. Los estudios llevados a cabo con estas líneas de cultivo celular, se centraron desde el comienzo en la síntesis, incorporación y metabolismo de los lípidos como modelo experimental de la arteroesclerosis¹³², si bien con el paso de los años cobró gran importancia el estudio de los cambios fenotípicos y de la formación de la matriz extracelular, como se ha comentado al comienzo de esta introducción.

La aplicación de los cultivos de VSCM para el estudio de la calcificación vascular comenzó en los años 90. Hasta aquel momento se había trabajado con tejido completo (aorta) procedente de diferentes modelos animales, en presencia de medio “calcificante” con diferentes ratios de Ca/Pi¹³³, así como en presencia de suero sanguíneo¹³⁴. Tras el descubrimiento de la formación de vesículas de membrana en las aortas⁵⁰, así como de la presencia de BMP2, MGP y OPN en placas ateroscleróticas calcificadas^{32,33,135-137}, se estudió como con diferentes estímulos, las VSMC en cultivo llevaban a cabo esos mismos cambios. Inicialmente, se comprobó que en presencia de TGF- β 1 y 25-hidroxicolesterol, las VSMC espontáneamente comenzaban a transdiferenciarse hacia el fenotipo osteoblástico de interés, finalmente calcificando¹³⁸. Pero con el paso de los años, un gran número de supuestos inductores de la calcificación han sido probados, entre los más importantes, el β -GP (β -glicerofosfato)¹³⁹, el Pi¹⁴⁰ y el Ca²⁺¹⁴¹.

Posiblemente el método *in vitro* más utilizado durante los últimos 15 años ha sido el propuesto por la Dra. Giachelli de la Universidad de Seattle, EE.UU. en el año 2000¹⁴⁰, el cual se basa en exponer a las VSMC a un medio con una concentración mayor de fosfato inorgánico (así no es necesario añadir activadores de la TNAP como sucede en el modelo basado en el β -glicerofosfato) de la que existe fisiológicamente en la sangre (simulando la hiperfosfatemia que aparece en las últimas fases de la ERC) si bien diferentes grupos de investigación han utilizado muy diferentes condiciones de trabajo¹⁴²⁻¹⁴⁷. El método original se basa en la utilización de medio DMEM, con 15% de SFB, 1.8 mmol/L de Ca²⁺ y 2 mmol/L de Pi, si bien algunos grupos lo han utilizado con concentraciones de 3 y hasta 5

mmol/L de Pi, con otros medios de cultivo y concentraciones más bajas de SFB, obteniendo resultados dispares en cuanto el momento en el que se detectan los depósitos de calcio.

Si bien la investigación *in vivo* no ha desaparecido, generándose artículos con resultados prometedores, gran parte de las publicaciones relacionadas con la CVM han utilizado este método *in vitro* con condiciones poco realistas de trabajo para el estudio de esta enfermedad, generando una amplia gama de teorías, así como disparidad de resultados que en muchos casos no ha coincidido con los hallazgos *in vivo*¹⁴⁸. Por esta razón y debido a la gran variabilidad que presentaban los experimentos con el modelo *in vitro* en nuestro propio laboratorio, nos propusimos analizar los sucesos que realmente tienen lugar en este modelo tan ampliamente utilizado.

6. TRANSPORTE DE Pi EN LAS VSMC

Tres son los grupos de transportadores de Pi identificados hasta el momento: los de tipo I (NaPi I)¹⁴⁹, II (NaPi II)¹⁵⁰ y III (NaPi III)^{151,152}. El primero identificado o propuesto fue el NaPi I (SLC17A1 y posteriormente también los SLC17A2 al 4), pero poco tiempo después se observó que se trataba de transportadores de aniones de poca especificidad¹⁵³. Tras estos, fueron clonados los NaPi II a, b y c (correspondientes con SLC 34A1, 34A2, 34A3), los cuales se expresan en varios tejidos epiteliales, pero principalmente NaPi IIa en riñón, NaPi IIb en intestino, y NaPi IIc, en el riñón de los neonatos. Finalmente, y a pesar de ser identificados en primer lugar como receptores retrovirales, se describieron los NaPi III, los cuales se corresponden con SLC20A1 (Pit1) y SLC20A2 (Pit2) y se encuentran expresados de forma ubicua en el organismo¹⁵⁴. Cabe remarcar, que todos los transportadores citados transportan Pi principalmente en presencia de Na, a pesar de que se conoce cierta actividad Na-independiente de Pit2, pasando a co-transportar protones y Pi¹⁵⁵.

En el caso de las VSMC, los transportadores (conocidos hasta el momento) que se encargan de la incorporación de fosfato son los de tipo NaPiIII, si bien se ha descrito la existencia de un componente Na-independiente¹⁵⁶ de naturaleza

desconocida. Sobre los transportadores Na-dependientes se han realizado numerosas investigaciones, dejando patente su multifuncionalidad¹⁵⁴, comportándose por ejemplo como receptores de retrovirus y transportando fosfato monovalente de forma dependiente del pH. Además de estas funciones, algunos artículos recientes han determinado nuevas funciones de Pit1 independientes a la presencia de Pi, como puede ser la participación en el bloqueo de la apoptosis inducida por TNF- α ¹⁵⁷, o en el desarrollo¹⁵⁸.

En relación con la CV, una de las teorías sobre la causa de la misma fue la propuesta por la doctora Giachelli y que afirma que un aumento del fosfato en la sangre induce una mayor incorporación del mismo en las VSMC, activando ciertas rutas patogénicas que llevan a la CV¹⁴⁰. Esta idea parte de ciertos experimentos realizados *in vitro* con VSMC, los cuales mostraban que un aumento en la concentración de Pi, inducía un aumento en la incorporación del mismo en estas células. Actualmente esta idea ha sido desmentida, puesto que en concentraciones fisiológicas de Pi el transporte del mismo por Pit1 y Pit2 está saturado y se requeriría de un mayor número de transportadores para que esta incorporación fuera mayor, hecho que, al menos *in vitro*, no tiene lugar¹⁵⁹. Otro argumento de la Dra. Giachelli fue la inhibición de la calcificación por medio del ácido fosfonofórmico, el cual es un inhibidor competitivo del transporte renal de Pi, actuando sobre los transportadores de tipo II¹⁶⁰. Debido a que las VSMC no expresan transportadores de tipo II, y los de tipo III son bastante resistentes, la inhibición de la calcificación *in vitro* por parte del ácido fosfonofórmico fue explicada como un bloqueo de la cristalización de las partículas de Ca/P, al comportarse de un modo similar al pirofosfato o los bisfosfonatos^{156, 161}.

Debido a la falta de información sobre el transporte Na-independiente en las VSMC, del cual se conoce poco más que la supuesta K_m (afinidad) y V_{max} (velocidad máxima de la reacción), así como a la posible relación entre Pit1 y Pit2 con la calcificación vascular, consideramos interesante un estudio más detallado del transporte de Pi en este tipo celular.

II. OBJETIVOS

Nuestro objetivo principal ha sido el de profundizar el conocimiento de los mecanismos que tienen lugar en las VSMC durante la calcificación vascular. Para ello, hemos dividido el trabajo en 3 objetivos parciales:

1. Describir los principales factores que intervienen en el modelo de calcificación de VSMC *in vitro* con elevada concentración de fosfato, estudiando para ello los principales parámetros que participan en la denominada calcificación *in vitro*: la muerte celular y las causas de la misma, la formación de precipitados de Ca/P, y los cambios que estos inducen en las VSMC, y el grado de participación de las VSMC en la formación de los precipitados.
2. Identificar los mecanismos patológicos tempranos que se producen en las arterias de animales urémicos, para distinguir entre factores causales y consecuencias de los depósitos, así como averiguar si existen eventos previos a la formación de los depósitos. Estos parámetros de interés serán:
 - Identificación de ARN y/o proteínas de agentes que participan en la calcificación CVM de la aorta tales como TNAP, BMP2, RUNX2, PHOSPHO1, ANKH, ENPP1...
 - Parámetros plasmáticos importantes en la calcificación vascular y la enfermedad renal crónica: FGF23, PTH, fósforo inorgánico (Pi), calcio iónico (Ca^{2+}), TNF- α , DKK1, klotho, y PPI.
 - Depósitos de Ca/P en la túnica media de la aorta.
3. Profundizar en el conocimiento del transporte de Pi en las VSMC, y en especial el componente Na-independiente, intentando su identificación molecular.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Los reactivos utilizados fueron de calidad para análisis, para biología molecular (libres de ribonucleasas, ADNas y proteasas) o bien para su uso clínico, según la disponibilidad (usando siempre mayor calidad de la requerida, nunca inferior) y necesidades de cada experimento. Estos reactivos fueron adquiridos principalmente a: Panreac (Castellar del Vallés, España), Scharlau (Sentmenat, España) y Sigma-Aldrich (St Louis, EE.UU.)

De rutina se utilizó agua ultrapura (agua desclorada, descalcificada, desionizada y filtrada por osmosis inversa). Para la purificación y procesado de ARN el agua fue tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC) al 0.1% (en agitación durante al menos 2 horas) para la eliminación de ARNasas, siendo posteriormente autoclavada (para destruir el DEPC, que es cancerígeno).

Todas las medidas se realizaron al menos por triplicado y los experimentos se realizaron también como mínimo, por duplicado.

1. APARATAJE

Durante el desarrollo de la tesis se utilizaron frecuentemente los siguientes dispositivos:

- Para la toma de imágenes de microscopía de contraste de fases y de fluorescencia, fue utilizado un microscopio de fluorescencia Carl Zeiss Axiovert 200M acoplado a una lámpara de fluorescencia FluoArc, cámaras AxioCam HRC y MRm y un sistema ApoTome, todos ellos de Zeiss. El programa de tratamiento de imágenes fue AxioVission 4.1 de Zeiss.
- Las cuantificaciones colorimétricas y fluorimétricas fueron realizadas con un lector de microplacas DTX880 de Beckman Coulter (Brea, CA, EE.UU.). El software utilizado fue Multimode Detection de Beckman Coulter también.
- Las reacciones con ADNasa, retrotranscripciones y PCR tradicionales, se realizaron en un termociclador MJ mini de Bio-Rad (Hércules, CA, EE.UU.)

- En cuanto a la PCR en tiempo real, las reacciones fueron realizadas en un LightCycler 1.5 de Roche (Basilea, Suiza). El análisis de datos fue realizado con el programa Light Cyler Software 4.05, también de Roche. En los casos en los que se realizaron los cálculos manualmente, se utilizó el algoritmo $\Delta\Delta C_t$, que es el mismo utilizado por el software.
- En las extracciones de ADN y ARN, la cuantificación fue realizada con un espectrofotómetro Nanodrop™ 1000 (Thermo-Fisher, Massachusetts, EE. UU), utilizando la absorbancia a 260nm, realizándose la relación de absorbancias a 260/280 para comprobar la pureza de la muestra y en algunos casos, electroforesis en un gel desnaturalizante de agarosa con formaldehído.

2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Tanto para la obtención de VSMC (cultivo primario) usadas en los estudios *in vitro*, como para el estudio de las primeras fases de la calcificación vascular medial *in vivo*, se utilizaron ratas de laboratorio (*Rattus norvegicus*), machos albinos de raza Wistar procedentes de la empresa Janvier S.A.S. (Le Genest-St-Isle, Francia). Los animales tuvieron acceso a agua y pienso *ad libitum* (los formulados especiales fueron adquiridos a Provimi Kliba SA, Suiza). Durante el desarrollo de los experimentos, los animales se emplazaron en el animalario del servicio de Biomedicina de la Universidad ubicado en la Facultad de Veterinaria.

En referencia al manejo, instalaciones, anestesia y eutanasia de los animales, todo fue realizado de acuerdo a la legislación vigente y con la aprobación del comité ético de la Universidad de Zaragoza.

2.1. EXPERIMENTOS DE CALCIFICACIÓN *IN VIVO*

En nuestro caso, para el estudio de la calcificación vascular medial *in vivo*, utilizamos el modelo experimental de enfermedad renal crónica basado en ratas con nefrectomía 5/6 (Nx). Para la localización de los puntos temporales de interés

en el progreso de la calcificación, se realizó un experimento piloto en el que se estudiaron los cambios en animales centinela. En este primer estudio, los animales fueron intervenidos quirúrgicamente a los 2 meses de edad en nuestras instalaciones, tras lo que se les permitió recuperarse de la cirugía durante dos semanas, para comenzar tras este período con las dietas específicas. En el caso de los animales utilizados para el experimento principal, del cual proceden los resultados del artículo, los animales se adquirieron ya operados, procediéndose al cambio de su dieta a los 3 días de su llegada.

Para estos experimentos, las ratas fueron divididas en dos grupos con dietas diferentes. La composición de los piensos fue igual en todos sus componentes excepto en el fosfato. La concentración del mismo fue de 0,6% para el grupo control, mientras que para el grupo problema, e imitando la dieta *occidental*, el contenido fue de 1,2%. Al grupo control pertenecieron los animales con el riñón intacto (con 0.6% de Pi en la dieta), mientras que el grupo problema fueron los animales nefrectomizados (con 1.2% de Pi en la dieta).

2.2. ANIMALES PARA LA EXTRACCIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE VSMC AÓRTICAS

La extracción de VSMC para establecer el cultivo primario se realizó a partir de aortas de 8 ratas. Estos animales tuvieron todos la misma edad (2 meses) y aproximadamente el mismo peso (200 gramos).

3. OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DEL CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS DE LA MUSCULATURA LISA VASCULAR

3.1. OBTENCIÓN

En primer lugar, los animales fueron anestesiados con pentobarbital hasta alcanzar el plano anestésico adecuado. Tras esto, se rasuró la zona ventral del animal, se realizó un abordaje abdominal y se procedió a la localización de la aorta. Una vez dentro de la cavidad peritoneal, se exteriorizaron y lateralizaron los órganos abdominales y se cortó el diafragma para liberar a la aorta del mismo. Finalmente se cortó la aorta a la altura de la bifurcación iliaca y se separó de la columna vertebral hasta llegar al corazón, donde se seccionó próxima a la válvula aórtica .

Tras su extracción, la aorta fue lavada en PBS frío, y se colocó en una placa de Petri con PBS sobre un recipiente con hielo para una primera limpieza con pinzas finas sin dientes para eliminar la adventicia.

A continuación, las aortas fueron incubadas en 10 ml de medio MEM (Thermo-fisher, Massachusetts, EE.UU.) con 600 U/ml de colagenasa tipo Ia de *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich), durante 1 hora a 38°C y 5% de CO₂, en una placa de 56,7 cm². Transcurrido este período, se procedió a la eliminación de posibles restos de adventicia (para ello se necesitó la observación de la arteria a través de una lupa) y a la sección transversal de segmentos aórticos de 2-3 mm.

Los fragmentos obtenidos fueron añadidos a un tubo con 9 ml de medio MEM con colagenasa. Tras esto, el tubo se mantuvo en agitación a 37°C durante 1 hora y 45 minutos. seguido de una última digestión de 1 hora y 40 minutos.

Finalizadas las digestiones, se procedió a la centrifugación a 500 g durante 5 minutos, tras lo cual se desechó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en medio MEM a 37°C (esta vez con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Thermo-Fisher,

Massachusetts, EE.UU.)). Este último paso fue realizado en la campana de flujo laminar, y tras él se procedió a la siembra de las células extraídas en un frasco de tipo Roux de 75 cm². El primer cambio de medio de cultivo se llevó a cabo a los dos días, tras lo cual se procedió a cambiar el medio diariamente hasta su tripsinización.

3.2. MANTENIMIENTO

Las células crecieron en una incubadora (5% CO₂, 37°C), con medio MEM suplementado con un 10% de SFB y con antibióticos 1X penicilina, estreptomicina, glutamina (PSG): 100 Unidades de penicilina, 100 µg de estreptomicina, 0,292 mg/ml de L-glutamina en tampón citrato 10mM (Thermo-Fisher, Massachusetts, EE.UU.).

Cuando se observó por microscopía óptica que se había alcanzado un 100% de confluencia celular en toda la superficie del frasco tipo Roux (ya fuera de 25 cm² ó 75 cm²), se procedió a su tripsinización, para lo que se utilizó 1ml/12,5cm² de TrypLE Express 1X (Thermo-Fisher, Massachusetts, EE.UU.).

De las tripsinizaciones se sembraron células de nuevo en frascos tipo Roux (diluidas 1:3) para continuar con el linaje celular, o en placas de trabajo (24 ó 6 pocillos) (Thermo-Fisher, Massachusetts, EE.UU.) y/o cámaras de microscopía. También se procedió en algunos casos a congelar parte o todas la células procedentes de la tripsinización. Para ello se les añadió un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) tras lo cual fueron trasladadas a criotubos que fueron introducidos a su vez en cajas de congelación lenta (conteniendo isopropanol) y llevadas a -80°C, donde permanecieron durante al menos 24 horas. Tras esto, pasaron a ser almacenadas en nitrógeno líquido (-195°C) para su mantenimiento a largo plazo. Las células únicamente fueron utilizadas para experimentos entre el pase 3 y el 9 (sembrándose en cada pase un tercio de las células tripsinizadas del pase anterior, es decir se sembraron aproximadamente 6000 células/cm²) debido a los cambios que desarrollan en cultivo con las sucesivas divisiones¹⁴.

4. INMUNOFLUORESCENCIA

Para comprobar la expresión de SM22- α , calponina y α -actina en las VSMC, se llevó a cabo inmunofluorescencia celular. También se usó 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), para la visualización de los núcleos celulares. Para estos estudios se usaron células sembradas en cámaras de microscopía hasta alcanzar un 90% de confluencia, tras lo que se comenzó con el protocolo de inmunofluorescencia. Este protocolo consistió en la fijación con PFA al 3%, la eliminación de restos del mismo con 200mM de glicina, permeabilización con saponina al 0.1% y el tratamiento con el anticuerpo primario (durante 1 hora) y secundario (30 minutos). Al acabar, se usó medio de montaje proLong *anti-fade* (para frenar la pérdida de fluorescencia al exponerse a la luz) con DAPI (Life-Technologies, Carlsbad, EE.UU.), tras lo que se colocaron los cubres y se procedió a su estudio en el microscopio de fluorescencia. Las concentraciones de anticuerpos utilizadas y la procedencia de los anticuerpos primarios fueron:

| Anticuerpo primario | Casa comercial | Concentración | Concentración anticuerpo secundario |
|-----------------------------|---------------------------|---------------|-------------------------------------|
| SM22- α (cabra) | Santa Cruz (sc-18513) | 1:50 | 1:200 (A11057) |
| Calponina (conejo) | Santa Cruz (sc16604-R) | 1:50 | 1:200 (A11036) |
| α -actina (ratón) | Sigma-Aldrich (A5228) | 1:400 | 1:400 (A11029) |

Los anticuerpos secundarios (marcados con Alexa flúor 488 o 568) fueron comprados a Invitrogen-Molecular Probes (Paisley, Reino Unido).

5. EXPERIMENTOS DE CALCIFICACIÓN DE VSMC *IN VITRO*

Para el análisis del método de calcificación vascular *in vitro* con alta concentración de Pi en el medio, se sembraron las VSMC en placas de 6 o 24 pocillos, o bien en cámaras de microscopía de 8 celdas. Se dejó que las células crecieran hasta alcanzar un 80-90% de confluencia, tras lo cual se procedió al inicio de los tratamientos. Los medios utilizados durante los experimentos fueron MEM, DMEM y DMEM-F12 con 15 mM de HEPES ((ref. 11330-032) Thermo-Fisher, Massachusetts, EE.UU.) con 0,2% de SFB (a no ser que se especifique lo contrario) y 1X de PSG. Dado que estos medios contienen 1mM de Pi, se añadió fosfato para alcanzar las concentraciones experimentales (2 mM y 3mM), preparado a partir de una mezcla de fosfato monovalente (H_2PO_4^-) y divalente (HPO_4^{2-}) de pH 7,4. Los cambios de medio se realizaron cada 48h y el volumen utilizado fue de 0,53 ml/cm² o 1ml por pocillo en placas de 24 (excepto en los experimentos en los que se puso a prueba diferentes protocolos de cambio de medio y diferentes volúmenes del mismo).

En el caso de los medios MEM bajos en Ca^{2+} o Pi, estos fueron preparados y filtrados en nuestro laboratorio a partir de la formulación ofrecida por la empresa distribuidora, utilizando la mezcla de aminoácidos, vitaminas y L-glutamina comercializados por la misma.

6. ANÁLISIS DE CALCIO Y FOSFATO

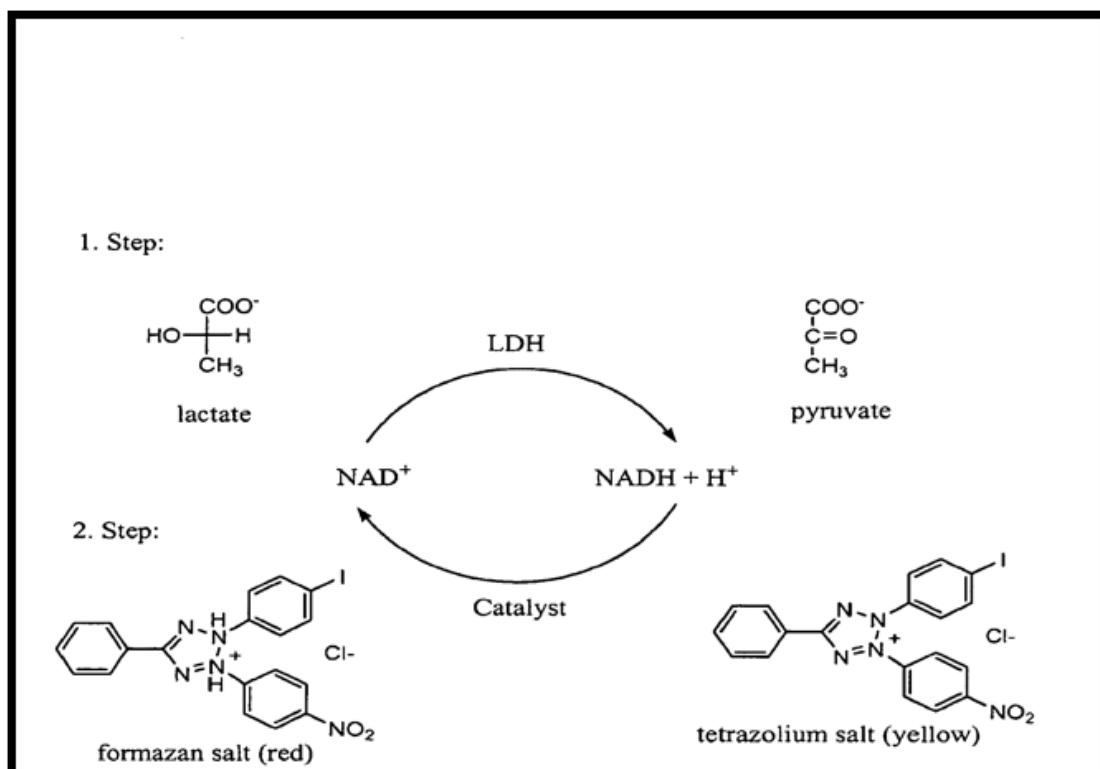
- Cuantificación de calcio: El protocolo seguido para la cuantificación de los depósitos de Ca^{2+} las placas de cultivo consistió en una incubación de toda la noche en presencia de 0,2 ml de HCl 0,6 N, tras lo que se realizó una cuantificación colorimétrica con un kit de Bioassay Systems (Hayward EE.UU.) en placa de 96 pocillos.
- Cuantificación de Pi: Para esta cuantificación se utilizó también un kit de Bioassay Systems en placa de 96 pocillos.

- Tinción de rojo de alizarina: se llevo a cabo con una concentración de 1% del mismo, durante 30 minutos en el caso de las VSMC mientras que la concentración fue del 0.5% en el caso de las aortas. En ambos casos se realizó una fijación previa a la tinción (4% PFA en tejido y EtOH 70%, 30' en VSMC). Tanto para el rojo de alizarina como para el von Kossa de aortas, se la realizaron cortes transversales de las mismas (tras ser fijadas y congeladas a -20°C). Las aortas fueron previamente embebidas en OCT (Optimum Cutting Temperature medium, Leica Microsystems) a temperatura ambiente, para posteriormente ser congeladas rápidamente a -80°C, y almacenadas a -20°C. Estos bloques de OCT con las aortas fueron cortados en secciones de 5 µm en un criostato CM 1510S de Leica Microsystems (Weztlar, Alemania), a -25°C, adhiriéndose a porta-objetos HistoBond de StatLab (McKinney, EE.UU.) pretratados con silano.
- La tinción de fosfato en presencia de nitrato de plata (von Kossa), se realizó como se ha descrito previamente^{141,162}.

7. ANÁLISIS DE LA MUERTE CELULAR

- Cuantificación: se utilizó un kit comercial Citotoxicity Detection de Roche (Manheim, Alemania) para la determinación colorimétrica de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) citoplasmática. Para la inducción del 100% de LDH como referencia, algunos pocillos con VSMC fueron tratados con tritón X-100 al 1% para lisar todas las células. El tipo de placa utilizada fue de 24 pocillos. La detección se basa en las siguientes reacciones: Normalmente, la LDH se encuentra habitualmente en el citoplasma celular, pero cuando las células mueren y la integridad de su membrana se ve comprometida, esta enzima puede ser detectada por una doble reacción (primero se reduce NAD^+ a $\text{NADH} + \text{H}^+$ por oxidación del lactato a piruvato, y después un catalizador se encarga de transferir los H/H^+ a una sal de tetrazolio, generando color).

- Tinción vital de bromuro de etidio y naranja de acridina (BrEt/NA): las células fueron sembradas en cámaras de microscopía de 8 celdas, utilizándose las mismas concentraciones de Pi en el medio que en el resto de experimentos. Ambos reactivos fueron utilizados a una concentración final de 50 µg/ml en PBS. Tras eso, se obtuvieron fotografías de las células en el microscopio de fluorescencia.



Reacción del kit de detección de LDH
 (https://patentimages.storage.googleapis.com/US7919268B2/US07919268-20110405-D00001.png)

- Cuantificación de proteínas: las células fueron lisadas con 0,1% Tritón X-100 y cuantificadas colorimétricamente con un kit de ácido bicinónico (BCA) (Thermo-Fisher, Massachusetts, EE.UU.), que se basa en la reducción del ión cobre de Cu^{2+} a Cu^+ que realizan las proteínas, detectándose la presencia de este último por medio de una reacción en la que dos moléculas de BCA se unen a cada molécula de Cu^+

generando un compuesto producto de color púrpura (detección a 562nm).

- Cuantificación de ADN: En el caso del ADN, las muestras fueron extraídas por medio del kit comercial GenElute Mammalian Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich) y cuantificadas por absorbancia a 260.

8. DETECCIÓN DE PRECIPITADOS DE Ca/P POR DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ.

Para detectar la presencia de precipitados de Ca/P, así como determinar su tamaño y la evolución de los mismos, se estudiaron muestras de medio de cultivo que fueron tomadas periódicamente de placas de 24 pocillos con VSMC al 90% de confluencia. Desde el momento en el que estos medios fueron añadidos a las placas de cultivo (hora 0) hasta las 24 horas fueron analizadas cada hora, tras lo que se fueron recogiendo y analizando cada 24 horas durante 5 días más. El dispositivo para realizar estos análisis fue un Nanosizer ZS (Malvern, Worcestershire, UK), el cual detecta los cristales por dispersión dinámica de luz (DLS). La DLS se basa en una luz láser, que al alcanzar las numerosas partículas que hay en una suspensión, se dispersa en todas las direcciones posibles. Si se separa una dirección, los haces de luz dispersados por distintas partículas interfieren entre sí y se obtiene una intensidad de dispersión determinada. Como consecuencia del movimiento browniano las posiciones relativas de las partículas varían constantemente entre sí, cosa que también provoca cambios en las condiciones de interferencia y en la propia intensidad de dispersión. Si las partículas se mueven rápidamente (partículas pequeñas), también se acelera la variación de la intensidad de dispersión. Por el contrario, las partículas lentas (grandes) llevan a variaciones más lentas. Por norma general, en la dispersión de luz dinámica la suspensión de la muestra permanece en reposo.

9. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

9.1. ANÁLISIS DE LA ULTRAESTRUCTURA DE LOS DEPÓSITOS DE CALCIO EN CULTIVO CELULAR

Para la observación de la ultraestructura de los precipitados formados en cultivo celular, se utilizó un microscopio electrónico de transmisión (TEM) JEOL 2000FXII con una cámara INCA-200 X-Sight microanalysis system (Oxford Instruments, Abingdon, Reino Unido), estudiándose además el patrón de difracción de electrones para analizar el grado de cristalización de los depósitos.

9.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA EN AORTA

Para la localización de los primeros precipitados en la pared de la aorta se utilizó un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM), modelo MERLIN de Carl Zeiss (Jena, Alemania). Con este tipo de microscopio es relativamente sencilla la detección de pequeños cristales insertados en la pared de la aorta, debido a que su composición atómica (más bien los electrones de los átomos que los forman) es muy diferente de la del tejido blando, y genera imágenes más brillantes. Para estos estudios se utilizaron aortas fijadas con paraformaldehído al 4% para la obtención de microcortes tisulares. Para esto, los segmentos fueron introducidos en la solución fijadora durante 2 horas a 4°C. Tras esto se lavaron 3 veces con PBS frío (10 minutos cada vez), para ser finalmente crioprotectados con 0,5% de sacarosa en PBS (todo a 4°C) y almacenados a -20°C.

Por otro lado, para la observación ultraestructural de los orgánulos celulares y la colocalización de los nanocristales, se recurrió a un microscopio electrónico de transmisión (TEM) JEOL-2000 FXII de JEOL (Peabody, EE.UU.). En este caso el tratamiento de las aortas consistió en la fijación con paraformaldehído al 2% y glutaraldehído al 2,5%. Y el protocolo fue el siguiente: tras media hora en el medio de fijación, se cambiaron de tubo con la misma mezcla de fijadores y se incubaron toda la noche, tras lo que se procedió a su lavado con PBS, y conservación en PBS

con azida de sodio al 0,01% a 4°C hasta su envío para procesado e inclusión en resina para microscopía electrónica.

10. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA

10.1. CULTIVO CELULAR

- Extracción ARN: Se utilizó un kit de extracción de ARN con partículas magnéticas ChargeSwitch Total ARN Cell Kit (Thermo-Fisher, Massachusetts, EE.UU.), aplicando la ADNasa contenida en el propio kit para la eliminación de posibles restos de ADN. La pureza del ARN extraído se evaluó por la relación de absorbancias 260/280, utilizándose la electroforesis en gel de agarosa para comprobar la integridad del ARN extraído.
- Retrotranscripción: A continuación se procedió a la retrotranscripción del ARN obtenido, utilizándose un kit SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Thermo-Fisher, Massachusetts, EE.UU.).
- PCR en tiempo real: Finalmente, con el ADNc obtenido se procedió a la cuantificación relativa de *Msx2*, *Runx2* y *TNAP* por medio de PCR en tiempo real, para lo que se usó un kit de SYBR Green y un gen constitutivo de control (*GAPDH*). En todos los experimentos se incluyó una muestra calibrador (formado por la mezcla de varias muestras), así como una negativa (sin ADNc). El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Desnaturalización: 95°C, 30 seg
2. Amplificación (40 ciclos):
 - 95°C, 5 seg
 - 60°C, 30 seg
3. Curva de fusión:
 - 95°C, 0 seg
 - 65°C, 15 seg
 - 95°C, 0 seg

4. Enfriado: 40°C, 30 seg

10.2. AORTA

- Extracción ARN: El ARN total de las aortas fue extraído por medio de TRIZOL de Thermo-Fisher (Massachusetts, EE.UU.), previa pulverización de los segmentos aórticos en mortero con nitrógeno líquido. Tras la extracción, la cantidad de ARN extraído fue evaluado por la relación de absorbancias 260/280, tras lo que fue tratado con ADNasa I también de Thermo-Fisher y cuantificado de nuevo por absorbancia. La integridad de la muestra final fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa.
- Retrotranscripción: Tras esto se procedió a la retrotranscripción del ARN por medio de un kit PrimeScript RT de Takara Clontech (Mountain View, EE.UU.).
- PCR en tiempo real:

El tamaño de los amplicones de PCR en tiempo real fue de 70 a 150 pares de bases. Los cebadores fueron utilizados a una concentración de 0.5 μ M cada uno (sentido y antisentido). Todos los cebadores fueron probados previamente para optimizar la cantidad de ADNc y el tamaño de los amplicones de PCR en tiempo real fue de 70 a 150 pares de bases y el diseño de los cebadores fue el siguiente:

| | Núm. acceso | Sentido | Antisentido |
|----------|--------------------------------|------------------------|------------------------|
| ARP | NM_022402.2 | CACCTTCCCCTGGCTGAA | TCCTCCGACTCTCCTTTGC |
| TNAP | NM_013059.1 | CAGAGAAAGAGAAAGACCCCAG | CTGTCCTGTGGAGACGC |
| Runx2 | NM_001278484.2 | CTGCCGAGCTACGAAATGCC | GGCCACTTGGGGAGGATTTG |
| BMP2 | NM_017178.1 | GTTCTGTCCCTACTGATGAG | ATTCGGTGTGGAAACTAC |
| Msx2 | NM_012982.3 | ACCGAAGGGCTAAGGCAAAA | CGCTGTATATGGATGCCGCT |
| Pit1 | NM_031148.1 | CCGTCAGCAACCAGATCAACTC | CCCATGCAGTCTCCACCTTG |
| Pit2 | NM_017223.2 | CTATTCCAAGAAGAGGCTCCG | TCAGGATCGGTCAGCTCAG |
| PHOSPHO1 | NM_001105833.1 | GTTCTCTCCTGACCTTCGAC | AGACGCGTTGCATGTACTCA |
| CA I | NM_001107660.1 | GCTGTACCCATACTCAGGAGAG | CCAGTCTGCACTTGCCATATTC |
| CA II | NM_019291.1 | ACAGTTCGCCTTGGTGATT | CACCACATGAGACACCTGGG |
| CA III | NM_019292.4 | CCCTCTCTCTGGACCCTACC | TCCAGTGAACCAGGTGAAGC |
| CA IV | NM_019174.3 | CGAACAAGGGTTCAGAGCAC | AGCACCGCAATCTGTCTT |

| | | | |
|------------------|--------------------------------|------------------------|-----------------------|
| CA Va | NM_019293.3 | TTTCACTTCCACTGGGGAGC | CCCGTGGTGGCTTTCTTGTA |
| CA Vb | NM_001005551.2 | AGAAGCAGCCAGTTGAGGTC | ATCAGAGGTTGAAGTGGGCG |
| CA VI | NM_001106165.1 | GAGCGTGGTGTCTTGTCTT | GGAAGGGTACTTCTCAGGCCA |
| CA VII | NM_001106165.1 | GACAGAACGGAGTCGGCAG | GGGCGATGGGATACAGCTTG |
| CA VIII | NM_001009662.1 | GATGTCCGCTGTCTCCAAA | GCGGTCTCCTGACAAAAC |
| CA IX | NM_001107956.1 | CACAGGCACAGAAGTGGGAC | CGTGTTACGTGGTTACGGA |
| CA X | XM_008775240.1 | GCCTTGTAGGTCAGTGGGAC | TCTCTCCAGGCGGTGACTA |
| CA XI | NM_175708.3 | CGCCATGTCTCCTTCCTACC | TTGATCTGGTGTTCGGAGCC |
| CA XII | NM_001080756.1 | TTCCCCAGAGAAATGGTCAAC | GTGTGGTAAGCAGTCTTGTC |
| CA XIII | NM_001134993.1 | GACGAGCACAAACGGTCTAT | AGAGGTCCGAGTGAGGAGTC |
| CA XIV | NM_001109655.2 | GGTATGGGAATCTCGGCTGG | CCGAGCAGAGGTGAAAACCA |
| CA XV | NM_001105901.1 | AAAGTACCAGAGCATGGGGC | TTCAGACCAGACACGATGGC |
| MGP | NM_012862.1 | AACACCTTTATATCCCCTCAGC | GCGTTGTACCCGTAGATCAG |
| OPG | NM_012870.2 | CTCACTTGGCCTCCTGCTAA | CTTCGCACAGGGTGACATCT |
| OPN | NM_012881.2 | CCAGCCAAGGACCAACTACA | AGTGTTTGTCTGTAATGCGCC |
| Fetuin A | NM_012898.4 | GATGACCCGAAACAGAGCA | CCGAGACCACACCTTGACTT |
| ENPP1 | NM_053535.1 | CGAGTGGCTACAGTTCCTAGC | TTACTGGTCCGTGTGAATGCC |
| PTHR1 | NM_020073.2 | GCATATGCGCTGGTGGATG | GTCCAGCCCTTGCTGACTC |
| HOX11A | NM_001129878.1 | TGGTCCCTGTCTCTAACA | AGTATGTCATTGGGCGCGAA |
| ANKH | NM_053714.1 | CCAACACGAACAACACGGTC | AGGCGAAGTCCACTCCAATG |
| OSTX | NM_001037632.1 | ATTGGTTAGGTGGTGGCAG | GGGCAAAGTCAGACGGGTAA |
| Annexin2 | NM_019905.1 | CATTGCCTTCGCCTACCAGA | GGCCTAACATCACGGTCTCC |
| Annexin5 | NM_013132.1 | GTGGGGGACGGATGAAGAAA | CCCTGAGGTCTCTCGGTCAA |
| TNF- α | NM_012675.3 | TGCCTCGGCTCTTCTCATT | TGATGAGAGGGAGCCATTTG |
| CD39 | NM_022587.2 | TCGAGGAGCCTGAAGAGCTA | TGTTCTGAGTGAATCTGCC |
| GAPDH | NM_017008.4 | TCCAGTATGACTCTACCCACG | CACGACATACTCAGACCAG |
| Dkk1 | NM_001106350.1 | ATTGGAAGGGTGGGAATGTGA | AAGTTGGTGGGTTTCTTCCA |
| Klotho | NM_031336 | TTTAGGGCGGCTCAGAAAGG | TCTCCGCCACTTCTTTGTCC |
| LRP6 | NM_001107892 | TGAACCCACCACCATCCTAC | TCCGGCTAGGAGCATAGTCA |
| ACIIR | NM_031571.2 | TGCGGGGATTGTCAATTTGTG | TCCAGGGTCTGAGTAGGAA |
| SM22 α | NM_031549.2 | CAGACTGTTGACCTCTTTGAAG | TCTTATGCTCCTGGGCTTTC |
| Calponina | D14437.1 | TCCGCACACTTTAACCGAG | ATCCATGAAGTTGCTCCCG |
| α -actina | BC158550.1 | CATCACCAACTGGGACGACA | TCCGTTAGCAAGGTCCGATG |

En el caso de las anhidrasas carbónicas (CA I, II, etc), se utilizó la propia PCR en tiempo real para detectar su presencia o ausencia en el tejido. Las que no fueron amplificadas, así como el proteína receptora de lipoproteína de baja densidad 6 (LRP6), que tampoco fue amplificado, no aparecerán en el panel de resultados. En cuanto a la Fetuina-A, su expresión en el tejido fue muy baja y hubo que utilizar mayor cantidad de ADNc (1.5 μ g en lugar de los 0.3 o 0.5 μ g utilizados para los otros genes) y mayor número de ciclos (45 respecto a los 40 habituales) para poder ser detectado con fiabilidad.

10.3. PCR NO CUANTITATIVA

Para este tipo de PCR, se repitió la extracción y retrotranscripción como se ha descrito en el punto 9.1.. Una vez obtenido el ADNc, se procedió a hacer PCR tradicional para los genes seleccionados utilizándose un kit Platinum Taq ADN polymerase High Fidelity (Thermo-Fisher, Massachusetts, EE.UU.), siguiendo el siguiente protocolo:

1. Desnaturalización: 94°C, 4 minutos
2. 30 ciclos: Alineamiento 59°C, 30 segundos +Extensión 73°C, 30 segundos.
3. Extensión final: 72°C, 10 minutos

En este caso el tamaño de los amplicones fue de 350 a 500 pares de bases y los cebadores utilizados fueron los siguientes (la concentración de los mismos fue de 0.1 μ M) :

| | Núm. de acceso. | Sentido | Antisentido |
|--|--|-------------------------|------------------------|
| SLC26A1 | NM_022287.2 | GTACCTCCC GCCACGTTAAT | TCAGCCAAGTGTGGATCACC |
| SLC26A2 | NM_057127.1 | GGGGGCTCAAAGAGGATCAA | CGGTCAACTACCTCACCAATCA |
| SLC26A3 | NM_053755.2 | GCAGCAAGTGTGGCATTTC | GAGGCTGTGGAGGCTGATTT |
| SLC26A4 | NM_019214.1 | CCTTTGGTTGGCGGATTTC | CACAGACGGCAGTACAGGAG |
| SLC26A5 | NM_030840.1 | GCTGCACGTCAAGGACAAAG | ACCTTAACGCATCTCTGGC |
| SLC26A6 | NM_001143817.1 | CTGTGCAAGTCTCGTCTCC | AGTGAGATGGCAATGGCGAA |
| SLC26A7 | NM_001106638.1 | TGAGAAATGACGGGGCAAA | TCTCTGCAGTCAAACCTCCG |
| SLC26A8 | XM_003753467.3 | GCTTAGCACAGAGCAGATCCA | GGTCCAGGTCAAACCTCAAAGT |
| SLC26A9 | NM_001107172.1 | CTTCTCCCTGGCAATAGTGGG | GGGTCTGGAAGATCACAACCA |
| SLC26A10 | NM_001134595.2 | CCAGGATACTGGCTGACTCAC | GACCATCCACACGGCAAAGT |
| SLC26A11 (variantes transcripcionales I, II y IV) | XM_006220967.2 XM_006220968.2 XM_006220967.2 | CCTCCTCCCATCCTGAGAT | GTGACCGGTAAGACGAGAC |
| SLC26A11 (variante transcripcional III) | XM_001081843.4 | CTGAATCAATACTCCTCTAGGGC | GTAAGGCTGAGTCCCTGGTTC |
| SLC4A1 | NM_012651.2 | AGATTTTCCAGGACTACCCGC | AGGATGAAGACAAGCAGAGCG |
| SLC4A2 | NM_017048.2 | AGCTGATCATGTCCACAGCG | TGGTTGCTGCCCAAGTCATA |
| SLC4A3 | NM_017049.1 | AGAAGATCCCTGAGGACGCT | TCCACTTTGGTCTGTCCCG |
| SLC4A7 | NM_058211.2 | AGGTGGATTTCTTGAGAGACC | CGTGGTGATCAGCCTCCTTAG |

La amplificación de los amplicones se comprobaba mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

11. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE TNAP

11.1. CUANTIFICACIÓN COLORIMÉTRICA EN VSMC EN CULTIVO

Como control de la expresión de TNAP, se cuantificó la actividad de la misma. Para ello se utilizó el método colorimétrico tradicional basado en fosfato de p-nitrofenilo¹⁶³, que adquiere color amarillo cuando es desfosforilado por la TNAP. Para la cuantificación se obtuvieron lisados celulares de VSMC usando tampón de radioinmunoprecipitación (RIPA) muy frío compuesto de 10 mM Tris pH 7,4; 2,5 mM EDTA; 50 mM NaF; 1 mM Na₄P₂O₇ ; 1% Triton X-100; 10% glicerol; 1% desoxicolato; 1 mg/ml aprotintina; 0,18 mg/ml fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMFS); 0,18 mg/ml ortovanadato; and 1% Triton X-100 in 0,9% NaCl. Tras esto, los lisados fueron centrifugados durante 5 minutos a 14000 g, utilizándose el sobrenadante para la reacción colorimétrica.

11.2. TINCIONES PARA TNAP EN CORTES DE AORTA

Para comprobar y localizar la actividad de la TNAP en la pared de la aorta, se realizaron dos tinciones diferentes: NBT (azul de nitrotetrazolio cloruro) y azul rápido RR. En el caso del azul rápido se utilizó el kit comercial Leukocyte Alkaline Phosphatase de Sigma-Aldrich. Por otro lado, el protocolo de tinción NBT fue adaptado a nuestro tejido de la siguiente manera: Tampón de reacción (100 mM TRIS pH=8.5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.1% Tween) + 50mg/ml de NBT en 70% dimetilformamida + 50 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (en 100% dimetilformamida) durante 2 horas, tras lo que se lavó 3 veces con PBS.

12. CUANTIFICACIÓN DE PPi EN LA PARED AÓRTICA

En el caso del PPi, la cuantificación fue fluorimétrica, utilizándose un kit High-Sensitivity Pyrophosphate Assay de Sigma-Aldrich. En este caso, se utilizaron aortas fijadas con 4% de paraformaldehído, las cuales fueron congeladas con nitrógeno líquido y pulverizadas en mortero, para posteriormente ser lisadas en tampón RIPA (0.01 M Tris-Cl pH 7.4, 140 mM NaCl, 1% desoxicolato de sodio, 0,1% SDS, 1% Tritón X-100 y 1:100 de inhibidor de fosfatasas (Sigma-Aldrich), y centrifugarlas para separar los restos tisulares del sobrenadante (para utilizarlo como indica el protocolo). La cuantificación es posible gracias a la formación de un producto fluorescente ($\lambda_{\text{ex}}=370/\lambda_{\text{em}}=470$ nm) en presencia de PPi.

13. ANÁLISIS SANGUÍNEOS

13.1. UREA Y CREATININA

El análisis de estos dos parámetros se hizo en placas de 96 pocillos con kits colorimétricos de Bioassay Systems específicos para cada parámetro a analizar.

13.2. ELISA de PTH, FGF-23y TNF- α .

Tanto para la cuantificación de FGF-23 como de TNF- α se utilizaron kits comerciales basados en ELISA "sandwich". En el caso del TNF- α se utilizó el Rat Tumor Necrosis Factor α ELISA Kit de Sigma-Aldrich, mientras que para el FGF-23 se recurrió al Rat Fibroblast Growth Factor-23 (FGF-23) ELISA Kit de Merck-Millipore (Nueva Jersey, NJ, EE.UU.). Por otro lado, para la hormona paratiroidea se utilizó un ELISA de competición comercial PTH/Parathyroid Hormone EIA Kit de Sigma-aldrich.

13.3. FLUORIMETRÍA DE PPi

Para determinar la concentración de PPi circulante, se utilizó el mismo kit fluorimétrico de Sigma-Aldrich que se utilizó para determinar el PPi de la pared de la aorta.

14. ESTUDIOS DE TRANSPORTE DE Pi EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE VSMC.

El procedimiento general utilizado consistió en dejar crecer VSMC en placas de 24 pocillos hasta alcanzar un 100% de confluencia (excepto en los casos que se indica lo contrario), tras lo que fueron utilizadas para el siguiente protocolo general:

En primer lugar se elimina el medio de las células por aspiración y se llevan a cabo 3 lavados con 500 μ l de solución de transporte: NaCl 137mM, KCl 5.4 mM, CaCl₂ 2.8 mM, MgSO₄ 1.2 mM, TRIS-Cl 14mM pH=7.4; a temperatura ambiente. Para estudiar el transporte completo se utilizó NaCl, mientras que para el transporte Na-independiente en lugar de NaCl se utilizó cloruro de colina a una concentración equimolar para mantener el osmolaridad y fuerza iónica. A continuación se añadieron 200 μ L de solución de transporte complementada con fosfato potásico “frío” 0.05 mM (excepto para las cinéticas de saturación, cómo se indica más adelante) y ácido ortofosfórico como radionúclido de ³²P (10mCi/ml; PerkinElmer, Waltham, MA, EE.UU.), en un rango comprendido ente 2 y 4 μ Ci/ml. Las células fueron incubadas 10 minutos con este medio excepto para las curvas de inhibición, en las que se incubaron durante 4 minutos. Tras esto se procede al aspirado del medio y a la detención del transporte mediante 3 lavados con 0.5 ml de solución de parada (cloruro de colina 137 mM, Tris/HCl pH= 7.4) enfriada en hielo. Todos estos pasos se repitieron para cada pocillo en intervalos de 1 minuto, de forma que todos los puntos se incuban exactamente el mismo tiempo.

Por último se elimina la solución de parada y se añaden 300 μ l de solución de lisis (Triton X-100 0.5% en H₂O). Parte del lisado obtenido se utilizó para la cuantificación de proteínas y el resto se utiliza para la medida de fosfato radioactivo incorporado por efecto Cherenkov por medio de un contador de centelleo Wallac 1409 (PerkinElmer). En todos los experimentos también se realizó la medida de la radiactividad en las soluciones de transporte para poder calcular posteriormente el Pi acumulado en las células.

14.1. ESTUDIO DEL EFECTO DEL pH SOBRE EL TRANSPORTE DE Pi

Para ese estudio, se midió el transporte Na-dependiente y el Na-independiente con 6 valores de pH diferentes en el medio de transporte, para lo que se utilizaron los siguientes tampones: MES, TRIS y HEPES, preparándose medios con pH: 6, 6.5, 7, 7.5, 8 y 8.5.

14.2. ANÁLISIS CINÉTICO DEL TRANSPORTE DE Pi

La K_m y la V_{max} del transporte Na-dependiente e independiente fueron calculadas por medio de la ecuación de Michaelis-Menten y Hill. Para ello se hicieron estudios cinéticos de saturación de Pi, ajustándose a una ecuación con un miembro micaliano y uno no saturable tal que:

$$V = [V_{max} * S / (K_m + S)] + (K_d + S)$$

En la ecuación, V es la velocidad del transporte, V_{max} es la velocidad máxima o capacidad del sistema de transporte, S es la concentración del sustrato (Pi), K_m es la constante de afinidad, y K_d es la constante de difusión. Se utilizó el programa Prism de GraphPad 6.0 para este análisis cinético.

14.3. INHIBICIÓN DEL TRANSPORTE DE Pi EN VSMC

Se estudió la capacidad inhibidora de los siguientes iones y moléculas de características similares al Pi: sulfato de potasio (10mM), bicarbonato de potasio (10mM), arseniato de potasio (10mM), PFA (10mM), oxalato de potasio (10mM), SITS (100 μ M) y DIDS (100 μ M): usándose siempre como control positivo de inhibición fosfato de potasio 10mM. Para estudiar la inhibición por oxalato, el $CaCl_2$ fue eliminado de la disolución de transporte para evitar así su precipitación. Una vez detectadas las moléculas con capacidad inhibidora significativa, se procedió a la creación de curvas de inhibición (utilizando el ajuste lineal de Prism 6.0. de GraphPad para los logaritmos de concentración y ^{32}P transportado) a fin de

obtener la IC_{50} (concentración inhibidora media) para el posterior cálculo de la K_i (constante de inhibición).

14.4. DEPENDENCIA DE CLORURO DEL SISTEMA DE TRANSPORTE DE Pi

Para estudiar el efecto de la ausencia de cloro en el transporte de ^{32}P , se prepararon medios con N-metil-D-glucamina neutralizada con ácido glucónico, como sustitutos del cloruro de colina (utilizándose la misma concentración final, 137mM). Como control de que los cambios que se observaran no fueran debidos a la N-metil-D-glucamina, se llevaron a cabo los mismos experimentos pero sustituyéndose el ácido glucónico por ácido clorhídrico (y aportando por lo tanto cloro al sistema), siendo la mezcla añadida a la misma concentración que la anterior. En ambos casos se reajustó el pH final del medio de transporte a 7.4. En el caso del transporte en presencia de sodio, se sustituyó el NaCl por la mezcla a la misma molaridad de NaOH y ácido glucónico. En todos los casos el KCl fue sustituido por el tiocianato de potasio.

15. WESTERN BLOT

Se extrajo proteína total de VSMC en confluencia y antes de llegar a ella, por medio del lisado mecánico y químico con tampón RIPA (0.01 M Tris-Cl pH 7.4, 0.14 M NaCl, 1% Deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 1% Tritón X-100, 1X Inhibidor de proteasas) de las mismas; tras lo que se centrifugó y se separó el sobrenadante para cuantificación de proteínas por medio de un kit de BCA (Thermo-Fisher).

Tras esto, se llevo a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida (10%) con persulfato de amonio y tetrametiletlenamida para polimerizar (los geles los preparamos en nuestro laboratorio). Antes de añadir las muestras, estas fueron diluidas hasta alcanzar la misma concentración, y se les añadió tampón de carga (63 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS 10% glicerol, 0.0005% azul de bromofenol) y β -mercaptoetanol (concentración final 5%) como agente reductor para romper las

uniones disulfuro entre proteínas, tras lo cual fueron hervidas (95-100°C) durante 5 minutos para provocar mayor desnaturalización y destrucción de proteasas.

Las muestras se separaron en función de su peso molecular en el gel junto con un marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color de BioRad (Hercules, CA, EE.UU.) durante 2 horas aproximadamente, a voltaje constante (100mV), tras lo que se procedió a la transferencia de las mismas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF), por medio de un Trans-Blot de BioRad en una transferencia de 10 minutos a 2.5 Amperios. A continuación, la membrana fue bloqueada con leche desnatada en polvo al 5% en PBS-T (PBS + Tween 0,1%) durante 1 hora y a continuación fue lavada e incubada con el anticuerpo primario de elección toda la noche, a temperatura ambiente y agitación muy lenta, en presencia de azida de sodio al 0,01%. Al día siguiente se procedió a lavar y a incubar con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente, tras lo que se lavó de nuevo y se procedió a añadir el reactivo de quimioluminiscencia para capturar la imagen en un VersaDoc 4000 de BioRad. Las concentraciones de anticuerpos utilizadas fueron las siguientes:

| Anticuerpo primario | Casa comercial | Concentración | Concentración secundario |
|-----------------------------|----------------------------|---------------|--|
| SM22- α (cabra) | Santa Cruz (sc-18513) | 1:1000 | 1:20000 Invitrogen (811620) |
| Calponina (conejo) | Santa Cruz (sc-16604-R) | 1:500 | 1:20000 Sigma A0545 |
| α -actina (ratón) | Sigma (A5228) | 1:10000 | 1:40000 Amersham GE Healthcare (NA931) |
| Pit1 (conejo) | Davids (1 mg/ml) | 1:500 | 1:10000 Sigma A0545 |
| Pit2 | Davids | 1:300 | 1:10000 |

| | | | |
|----------------------------|--------------------------|---------|--|
| (conejo) | (0.8 mg/ml) | | |
| β -actina (ratón) | Sigma-Aldrich (A1978) | 1:10000 | 1:40000 Amersham GE Healthcare (NA931) |
| MGP (conejo) | Santa Cruz (sc-66965) | 1:200 | 1:10000 Sigma A0545 |

La expresiones de SM22- α , calponina y α -actina fueron estudiadas para comprobar los cambios fenotípicos ya descritos en estas células^{8,10,14}. La expresión de β -actina fue usada como control.

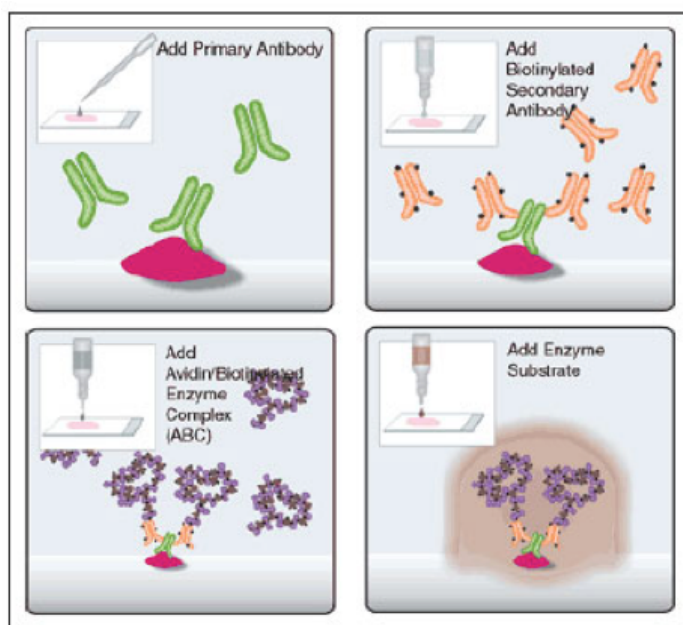
17. INMUNOHISTOQUÍMICA

Para el estudio de la expresión de ciertas proteínas de interés en aorta, así como su localización en la misma, se realizó inmunohistoquímica (IHC) de diferentes cortes de aorta, los cuales fueron obtenidos como cuando se realizaron las tinciones de rojo de alizarina y von Kossa, como se ha indicado en el punto 5.

Tras esto se utilizó el kit comercial Vectstain Elite ABC Kit (Goat IgG) de Vector Labs (Burlingame, EE.UU.), el cual incluye anticuerpo secundario biotinilado anti-cabra. En los casos en los que se necesitó anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo se utilizó el sc-2040 de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, EE.UU.). El cromógeno utilizado fue ImmPACT DAB SK-4105, adquirido también a Vector Labs.

El protocolo consistió en una primera fase de bloqueo de la actividad peroxidasa fisiológica que pudiera haber en el tejido, tras la que se procedió al bloqueo con suero de cabra al 1.5%. Una vez completado el bloqueo se procedió a la incubación con el anticuerpo primario de interés durante toda una noche en un recipiente hermético y manteniendo la humedad ambiental para evitar que se secase la gota de anticuerpo. Al día siguiente se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario correspondiente en función de la especie de origen del primario (durante 30 minutos), tras lo que se añadió el reactivo con la peroxidasa biotinilada, el cual fue incubado durante otros 30 minutos para finalmente añadir

el cromógeno que reacciona con la peroxidasa generando color marrón. Para visualizar los núcleos se usó una hematoxilina comercial de Sigma-Aldrich como contratinción (incubándose durante 5 minutos).



Resumen de los principales pasos de la IHC con el kit ABC Vector Elite de Vector Labs.

Los anticuerpos se utilizaron a las siguientes concentraciones:

| Anticuerpo primario | Casa comercial | Concentración | Concentración secundario |
|------------------------------|------------------------------|---------------|--------------------------|
| TNAP (cabra) | Santa Cruz (sc-23430) | 1:50 | 1:200 |
| PHOSPHO1 (conejo) | Bioss Antibodies (Bs-12562R) | 1:50 | 1:200 |
| BMP2 (cabra) | Santa Cruz (sc-6895) | 1:25 | 1:200 |
| Klotho (cabra) | SIGMA (sc-22220) | 1:25 | 1:200 |
| Klotho (rata) (a.a. 801-954) | COSMO BIO CO., (K0604) | 1:25 | 1:100 |

18. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 6 (La Jolla, CA. USA). En primer lugar se analizó normalidad de la distribución de los resultados mediante un test de Brown-Forsythe. En el caso de que las muestras tuvieran una distribución normal se utilizó un t-test de Student para comparar dos variables o una ANOVA para comparar 3 o más variables (con un test múltiple de Tukey posterior para comparar parejas de variables). Por otro lado, para las muestras que no presentaron una distribución normal, se utilizó un test de Mann-Whitney para comparar dos variables o en el caso de que fueran 3 o más las variables a analizar, se utilizó un test de Kruskal-Wallis con un test múltiple de Dunn posterior para comparar parejas de condiciones.

IV. RESULTADOS

Los resultados van a ser divididos en tres partes principales, acordes con los objetivos y con las publicaciones generadas.

1. SOBRE EL ANÁLISIS DEL MÉTODO DE CALCIFICACIÓN VASCULAR IN VITRO

Debido a la variabilidad de resultados generados con el método de calcificación *in vitro* basado en el aumento de Pi en el medio de cultivo celular, decidimos determinar los sucesos que tienen lugar en el mismo, y cuáles son los factores que inducen esta variabilidad.

En primer lugar, tras la extracción de las VSMC de las aortas de las ratas, procedimos a comprobar que el tipo celular extraído era el esperado, y que mantenía el fenotipo durante los pases en los que se pretendía trabajar (del 3 al 9), dado que como se ha comentado previamente, estas células presentan una gran plasticidad en cultivo^{4,5}. Para ello, realizamos la detección por inmunofluorescencia de 3 proteínas marcadoras de fenotipo contráctil (el que se encuentra habitualmente en las arterias) de las VSMC: α -actina, calponina y SM22- α . Las imágenes fueron positivas para las 3 proteínas, tanto en el pase 3 como en el pase 9, sin presentar cambios significativos y confirmando el tipo celular (Figura1).

Una vez confirmado el tipo celular, procedimos a comprobar que las células llevaran a cabo la osteodiferenciación descrita previamente¹⁴⁰. Para ello preparamos medio MEM con 0.2% de SFB y con dos concentraciones de Pi: 1 y 2 mM. Cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia, se las mantuvo con dichos medios en placas de 6 pocillos, y el medio fue cambiado cada 48 horas. El ARN de las VSMC fue extraído tras 1, 8 y 10 días, para el estudio de los osteogenes: Runx2, Msx2 y TNAP. El gen de la TNAP fue el primero en ser sobreexpresado en las células con 2mM de Pi en el medio (tras 8 días), mientras que Runx2 y Msx2 aumentaron respecto al grupo control a los 10 días. Esto confirmó los cambios osteogénicos esperados (Figura 2).

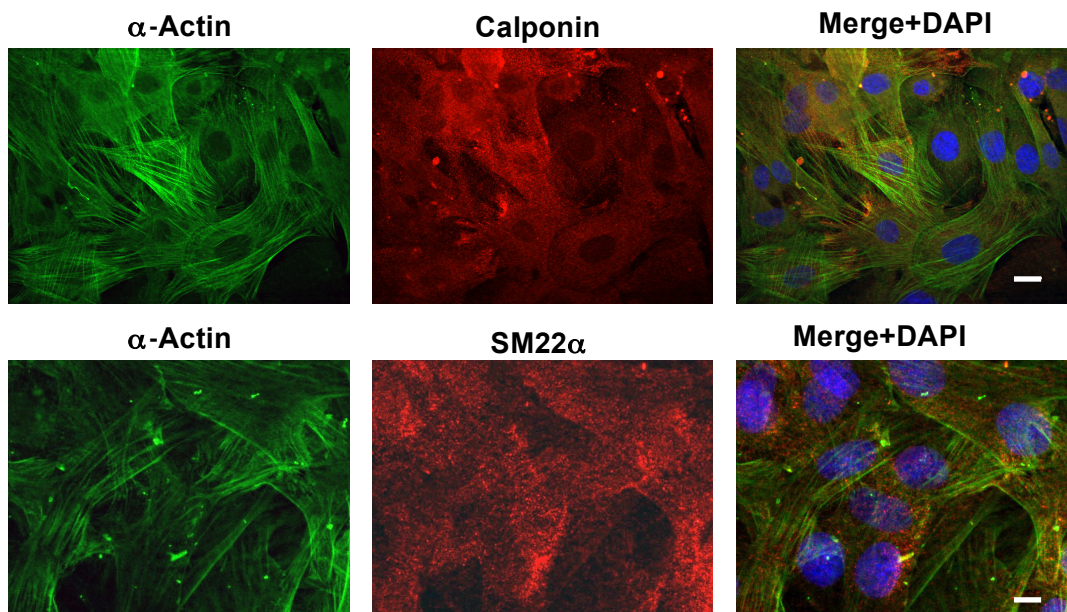


Figura1: Inmunofluorescencia de VSMC mostrando los marcadores de musculatura lisa: α -actina, calponina y SM22- α . La barra se corresponde con 20 μ m.

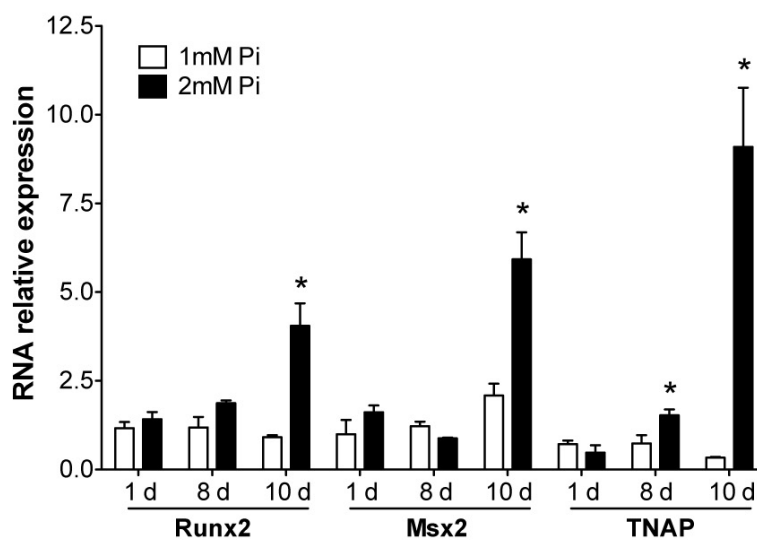


Figura 2: Expresión osteogénica de ARN en VSMC en cultivo con medio MEM y con 1 y 2 mM de Pi, durante 1, 8 y 10 días. ANOVA $p < 0.0001$ para los tres genes. *Diferencia significativa respecto a su control de 1 mM con test de Tukey y t-test de Student.

Tras estos análisis, procedimos al estudio de la muerte celular en cultivos de VSMC expuestas a alto Pi, dado que previamente se ha descrito la inducción de apoptosis en estas condiciones, llegándose a considerar como “toxina” urémica o vascular al Pi^{164,165}.

1.1. ESTUDIOS SOBRE LA MUERTE CELULAR *IN VITRO* Y SU RELACIÓN CON LA CALCIFICACIÓN VASCULAR.

En primer lugar, se analizó la correlación entre la aparición de depósitos de Ca^{2+} y la muerte celular total. Para ello, se crecieron VSMC en placas de 24 pocillos y cuando alcanzaron el 80% de confluencia, se les cambió a uno de quiescencia (MEM con 0.2% de SFB) con tres concentraciones diferentes de Pi: 1, 2 y 3 mM. Se cuantificó el porcentaje LDH al cambiar el medio (cada 48h) hasta el día 12, y en algunos casos el Ca^{2+} depositado en los pocillos al cambiar el medio (cada 48h) hasta el día 12. Se observó un aumento significativo en el % de LDH a los 4 días en los pocillos con 3mM de Pi, y a los 12 días en los de 2mM. En cuanto a los depósitos de Ca^{2+} , a los 8 días su presencia era ya masiva con 3mM de Pi, mientras que en 2mM de Pi aparecieron tras 10 días y de forma mucho menos exagerada (Figura 3).

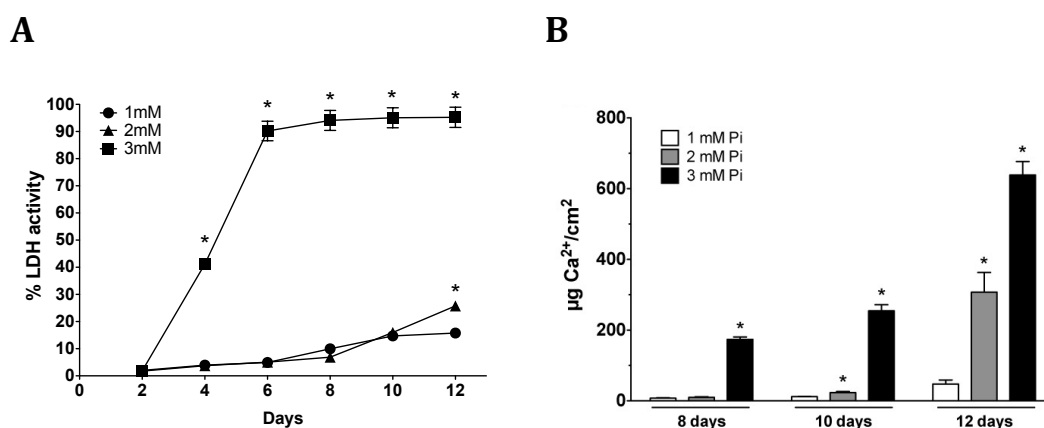
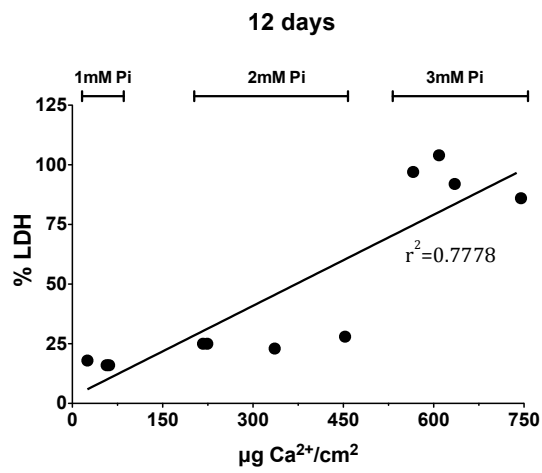


Figura 3: (A) Actividad de LDH acumulativa, como porcentaje del día 0. Las VSMC fueron incubadas con MEM y con 1, 2 y 3 mM de Pi hasta 12 días. ANOVA $p < 0.0001$, *Diferencia significativa con el control de 1 mM correspondiente mediante un test de Tukey. La diferencia de 2 mM a 12 días es también significativa con un t-test de Student. ($p < 0.0001$). (B) Depósitos de calcio a 8, 10 y 12 días. ANOVA, $p < 0.0001$; * Diferencia significativa con el control de 1 mM correspondiente mediante un test de Tukey.

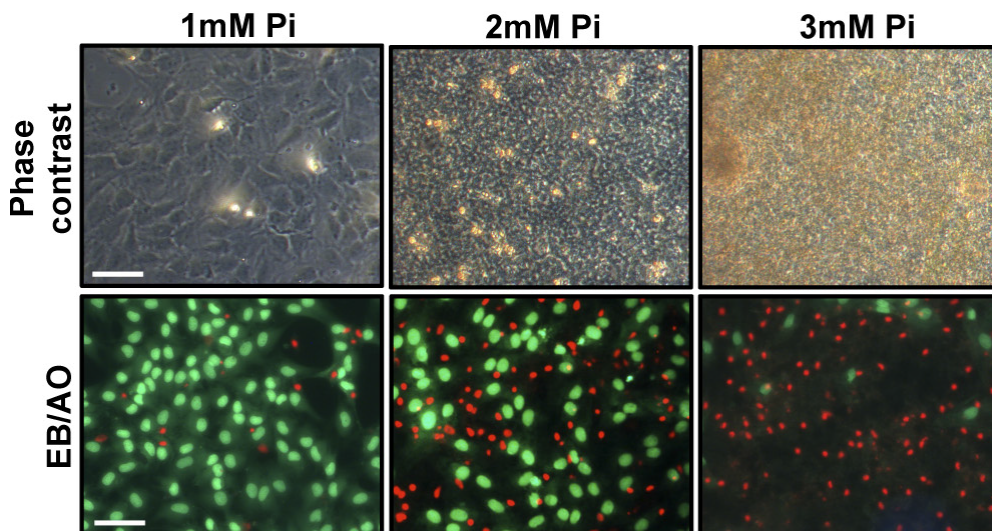
La correlación entre los depósitos de Ca^{2+} y el % de LDH fue de 0.7778, corroborando una relación entre ambos factores (Figura 5A). Para confirmar los hallazgos de % de LDH, determinamos la muerte células con otras técnicas. En primer lugar, cultivamos VSMC en cámaras de microscopía con las condiciones

indicadas previamente durante 12 días tras lo que se observaron los depósitos de calcio por microscopía de contraste de fases, así como la tinción vital de BrEt/NA, para confirmar por microscopía de fluorescencia el aumento de la muerte celular detectado por cuantificación de LDH (Figura 5B). Así mismo, se cuantificó el ADN y las proteínas totales tras 12 días de incubación con las citadas condiciones, detectando cambios coherentes con lo observado en la LDH y la tinción de BrEt/NA (Figura 5C).

A



B



C

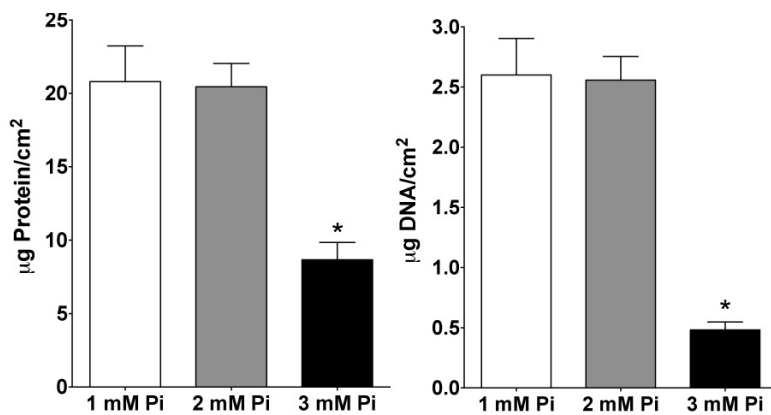


Figura 5: (A) Correlación entre el calcio depositado y la actividad de LDH tras 12 días de calcificación *in vitro*. (B) Fotografías de microscopía de contraste de fases (arriba) y fluorescencia para la tinción vital de BrEt/NA (abajo), tras 12 días. La barra de error corresponde con 50 μm . (C) Proteína total y contenido de ADN (ANOVA, $p < 0.005$), de ADN tras 12 días de exposición a los medios con diferentes concentraciones de Pi. *Diferencia significativa con el control de 1 mM correspondiente mediante un test de Tukey.

1.2. ANÁLISIS DEL EFECTO DE VARIOS PARÁMETROS DE CULTIVO CELULAR SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

Tras la detectar un importante aumento en la muerte celular en el modelo de CV *in vitro*, consideramos el estudio de ciertos factores del modelo que podían estar generando este aumento de la muerte celular sin ir directamente relacionado con el Pi. Para todos estos análisis se usaron VSMC con un 80% de confluencia, en placas de 24 pocillos.

En primer lugar, estudiamos el efecto de la concentración de SFB en el medio de quiescencia (MEM) sobre el % de LDH, para lo que se utilizó 4 concentraciones de SFB: 0.2, 0.4 o 0.6 %. Las mediciones se hicieron al cambiar el medio cada 2 o 6 días hasta el día 12, sin observar ninguna diferencia entre las condiciones estudiadas (Figura 6).

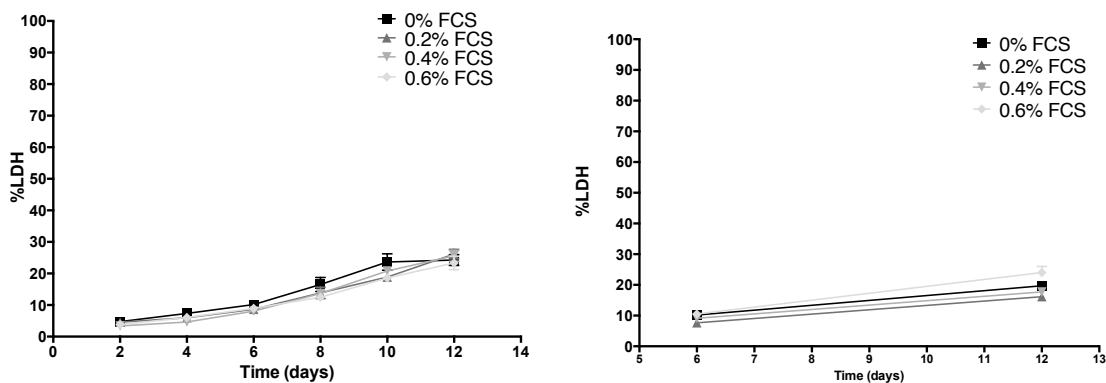


Figura 6: Efecto del % de SFB en MEM sobre el % de LDH. No se observa diferencias entre el % de LDH entre la frecuencia del cambio de medios (2 o 6 días).

Tampoco se observaron diferencias en el porcentaje de LDH ni en los depósitos de Ca^{2+} cuando se comparó la utilización de 0.53 o 1.1 mL/cm² de medio MEM con 0.2% de SFB (1ml o 2ml en placas de 24 pocillos), con las 3 concentraciones de Pi comentadas en el punto anterior (1, 2 y 3 mM). Por otro lado, de nuevo se observaron diferencias entre las condiciones de Pi, tanto en LDH como en los depósitos de Ca^{2+} (figura 7).

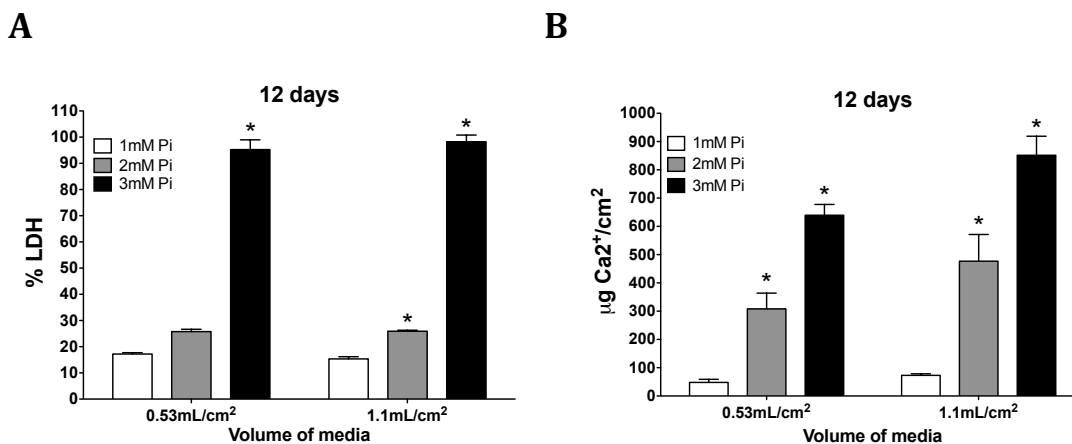


Figura 7: (A): Efecto del volumen de medio con diferentes concentraciones de Pi sobre la viabilidad celular. ANOVA, $p < 0.0001$; *Diferencia significativa con el (1 mM) dentro del mismo volumen de medio mediante un test de Tukey. Los asteriscos representan la diferencia entre condiciones de Pi con el mismo volumen. (B) Depósitos de calcio en el mismo experimento. La estadística es la misma que en (A).

Por último, se decidió comparar los principales tipos de medios de cultivo utilizados en el método de calcificación de VSMC *in vitro* (DMEM-F12, MEM y

DMEM), siempre trabajando con las diferentes concentraciones de Pi (1, 2 y 3 mM), y manteniendo el cultivo de VSMC durante 8 días.. En este caso, se encontraron diferencias significativas entre ellos en presencia de 2 y 3 mM de Pi, tanto en porcentaje de LDH (figura 8) como en calcio depositado (figura 9). Mientras que con DMEM-F12 tras 8 días no se detectó ninguna diferencia entre las diferentes concentraciones de Pi del medio, en el MEM con 3mM de Pi se observó un aumento en el porcentaje de LDH y una mayor formación de depósitos de calcio. Por otro lado, con DMEM estos cambios se observaron incluso con 2 mM de Pi. Además, se encontraron 8 y 10 veces más depósitos de calcio con 2 y 3 mM de Pi respectivamente, en DMEM que en MEM (Figura 9).

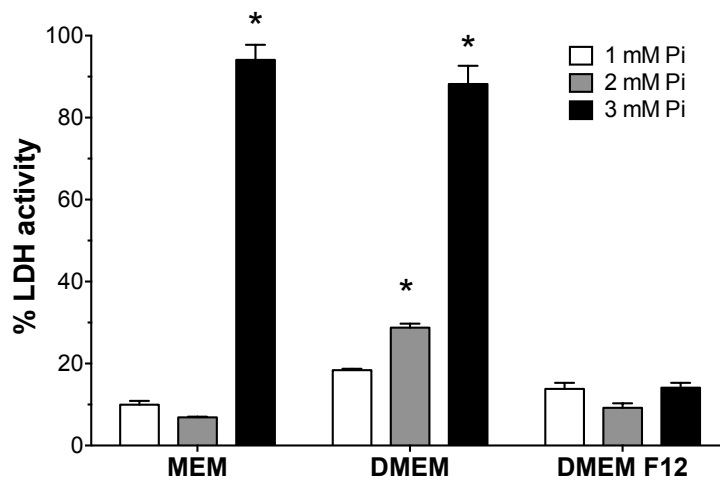


Figura 8: Efecto del tipo de medio de cultivo en la citotoxicidad del Pi tras 8 días. La ANOVA es $p < 0.0001$; *Diferencia significativa con el control de 1 mM correspondiente mediante un test de Tukey.

Debido a que la principal diferencia entre los medios MEM y DMEM es que DMEM contiene 18 mM más de bicarbonato, se decidió incluir en los experimentos de cuantificación del calcio una variable más, MEM con 18 mM extra de NaHCO_3 , para comprobar si la diferencia en el contenido de calcio era inducida por esta diferencia. Como se muestra en la figura 9, no hubo cambio alguno entre DMEM y MEM con 18mM de NaHCO_3 , y sí de estos últimos con MEM, asumiéndose que estos cambios eran producidos por la concentración bicarbonato.

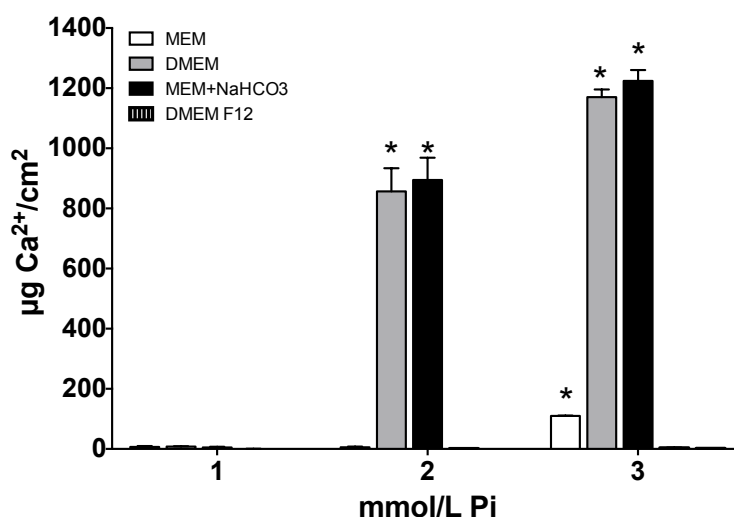


Figura 9: Cuantificación del calcio depositado tras 8 días de tratamiento con diferentes Pi y diferentes medios de cultivo. Las cuatro ANOVAs (una por tipo medio de cultivo) son $p < 0.0001$; *Diferencia significativa con el control de 1 mM correspondiente mediante un test de Tukey. También son significativas las diferencias entre medios con 2 mM y 3 mM de Pi.

1.3. EFECTOS DEL pH DEL MEDIO DE CULTIVO DURANTE LOS EXPERIMENTOS DE CALCIFICACIÓN.

Debido a que en MEM y DMEM el bicarbonato es el principal tampón para controlar el pH en la estufa de CO₂, y como afectaba a la formación de depósitos del calcio, decidimos medir el pH de estos medios.

En primer lugar medimos el pH de los medios fuera de la estufa de CO₂ (en la campana de cultivos) tras dos días de incubación de los mismos dentro de la estufa, obteniendo un pH 0.2 unidades superior en DMEM respecto al medido en MEM, independientemente de la concentración de Pi (Figura 10 A). A continuación evaluamos el efecto del metabolismo celular sobre el pH del medio; para ello, incubamos durante 48h (en la estufa de CO₂) placas con VSMC vivas y otras con VSMC muertas (fijadas con PFA al 2%)¹⁶¹, en medio MEM y DMEM y con las 3 concentraciones de Pi comentadas previamente. Al medir el pH, no se observaron variaciones del mismo con las diferentes concentraciones de pH, pero en ambos medios se observó un mayor pH en las células muertas que en las vivas. El pH más bajo fue observado en MEM con células vivas, mientras que el más alto con células muertas en DMEM (Figura 10 B).

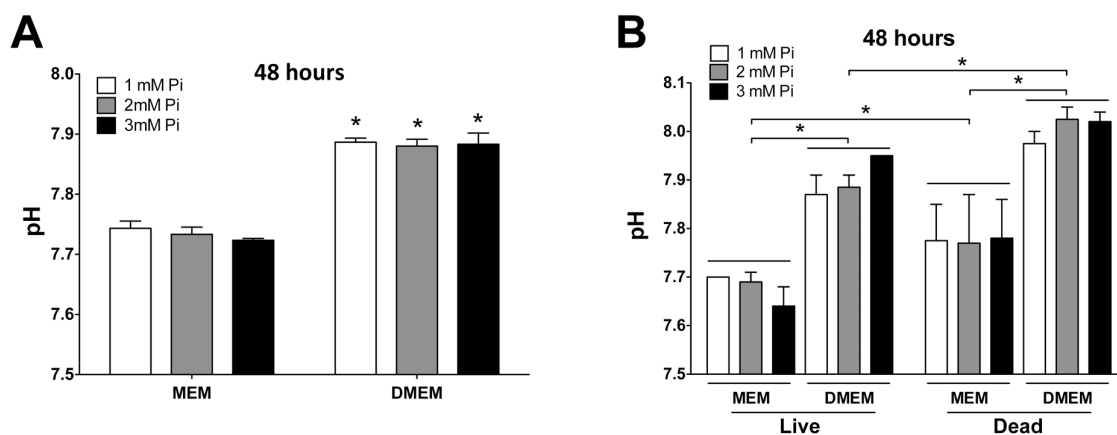


Figura 10: (A) pH del medio de cultivo, medido en la campana de flujo laminar tras dos días de tratamiento con diferentes concentraciones de Pi. ANOVA, $p < 0.0001$. * Diferencia significativa con el control de 1 mM correspondiente mediante un test de Tukey. (B) pH del medio tras dos días de tratamiento con diferentes concentraciones de Pi en VSMC vivas y muertas, $p < 0.0001$ para los 4 grupos. Debido a que no hubo diferencias de pH debidas a las diferentes concentraciones de Pi dentro de cada grupo, se realizó una comparación múltiple de todos los grupos, utilizando la media de cada grupo. Todas las comparaciones entre grupos fueron significativas con un test de Tukey.

Estos resultados apuntaban a que las VSMC participan en el control del pH del medio, si bien los resultados de pH hallados fueron superiores a los esperados en todos los casos (dado que deberían ser más cercanos a 7.4). Debido a que estos cambios en el pH podían ser de gran importancia al facilitar la precipitación de cristales de Ca/P (lo que explicaría la mayor cantidad de Ca depositado en algunos casos), se procedió a un examen más detallado de los cambios del pH en cultivo. Para ello, se evaluaron los cambios del mismo en MEM, DMEM y DMEM F12, en los momentos en los que este puede cambiar de forma más pronunciada. Estos momentos son al entrar y salir de la estufa de CO₂, debido al cambio brusco en la temperatura, así como en la saturación de CO₂. Para esto, se comenzó midiendo el pH del medio recién preparado a 37°C (tiempo 0). Tras esto se repartió el medio de cultivo preparado en placas de 24 pocillos, pipeteando 1 ml en cada uno, y llevándose a la estufa de CO₂ (5% CO₂ y 37 °C), midiéndose en su interior de forma periódica la evolución del mismo. Este experimento reveló una bajada exponencial del pH en estas condiciones. Los datos fueron ajustados por regresión no lineal a una ecuación exponencial de decaimiento, confirmando los hallazgos experimentales. En la campana, los valores de pH para cada medio fueron: DMEM 8.67 ± 0.02 , MEM 8.39 ± 0.05 y DMEM F12 7.58 ± 0.03 . Los valores más bajos de pH

se alcanzados en equilibrio dentro de la estufa, fueron: DMEM 7.95 ± 0.03 , MEM 7.68 ± 0.06 y DMEM F12 7.36 ± 0.04 ; lo que supone una bajada de 0.72 ± 0.03 , 0.71 ± 0.07 , y 0.22 ± 0.04 unidades de pH para DMEM, MEM y DMEM F12, respectivamente. Los tiempos medios para alcanzar estos equilibrios fueron: 22.6, 28.4, and 26.0 minutos. Un ajuste global reveló que las curvas fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.0001$, $F = 265.0$) (Figura 11).

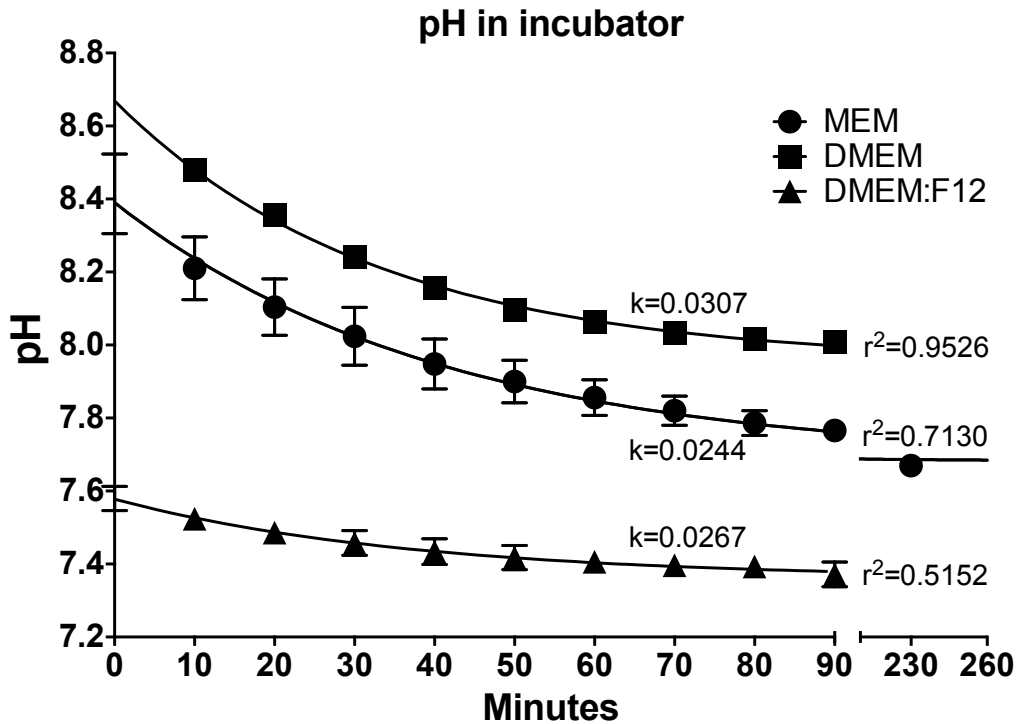


Figura 11: Evolución del pH de medios recién preparados y añadidos a placas de 24 pocillos, para ser introducidas a continuación en la estufa de CO₂. Los valores experimentales de pH fueron ajustados a una curva de decaimiento exponencial, $pH_t = (pH_0 - pH_1) \cdot e^{-k \cdot t} + pH_1$, por regresión no lineal donde pH₀ es el pH inicial (en la campana) y el pH₁ es el pH más bajo alcanzado. En la gráfica están incluidas las constantes (k) y la r² de cada ajuste.

Cuando el experimento fue llevado a cabo a la inversa, es decir, comenzando la medición en el interior de la estufa de CO₂, para sacar la placa y continuar las mediciones en la campana de flujo laminar, el pH creció, y lo hizo en dos fases: en la primera (de aproximadamente 30 segundos) el pH subió rápidamente, tras lo cual se produjo una segunda fase de crecimiento mucho más lento hasta alcanzar el equilibrio, ajustándose estas mediciones a una curva exponencial de dos fases. Los valores de pH en el *plateau* de las curvas fueron: DMEM 8.50 ± 0.05 , MEM 8.41 ± 0.08 y DMEM F12 7.74 ± 0.10 . Los tiempos medios en llegar al equilibrio fueron

5.1, 4.6, and 5.7 minutos para DMEM, MEM y DMEM F12 respectivamente. De nuevo el ajuste de las curvas mostró diferencias estadísticas significativas ($p < 0.0001$, $F = 295.8$) (Figura 12). Estos experimentos fueron confirmados utilizando medios de otras casas comerciales además de GIBCO (como Sigma-Aldrich y Lonza). Los resultados mostraron como ni MEM ni DMEM son medios adecuados para VSMC en un atmósfera de CO_2 del 5%, mostrándose incapaces de alcanzar el pH óptimo (7.4). Por otro lado DMEM F12, con una mezcla de bajo bicarbonato y HEPES como tampones, demostró ser ideal para mantener dicho pH.

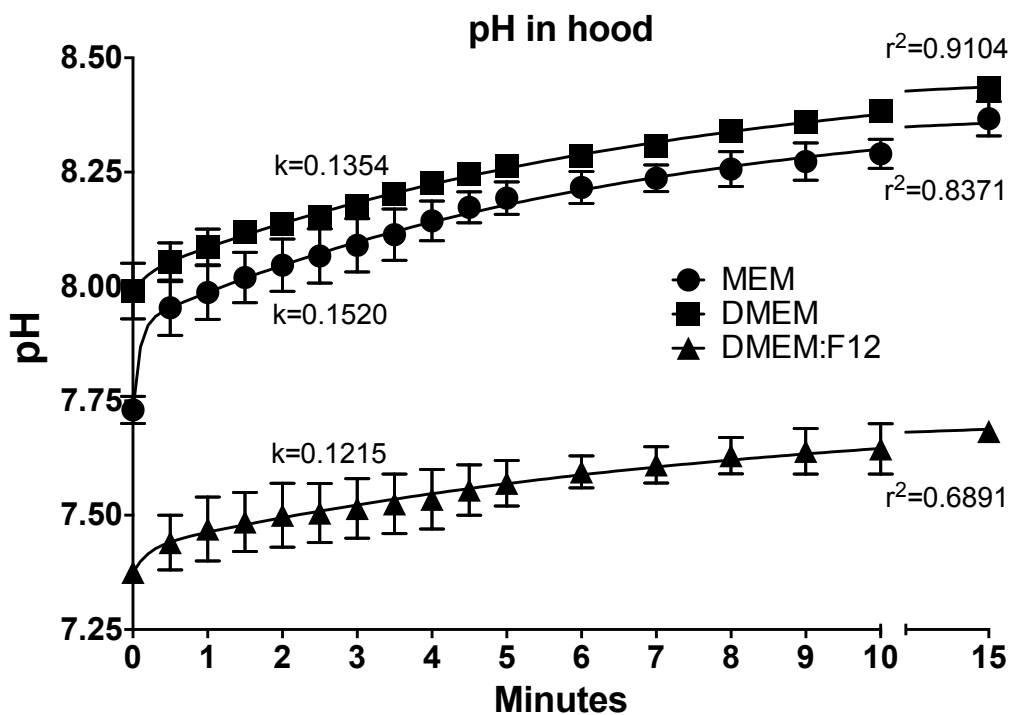


Figura 12: Evolución del pH al sacar las placas de cultivo de la incubadora de CO_2 . Tras 0.5 minutos de rápida subida, el pH crece de forma más lenta y por lo tanto, los datos deben ajustarse a una ecuación exponencial de dos fases: $\text{pH}_t = \text{pH}_\infty + (\text{pH}_0 - \text{pH}_\infty) * \% \text{Fast} * 0.1 * e^{-k_{\text{fast}} * x} + (\text{pH}_0 - \text{pH}_\infty) * (100 - \% \text{Fast}) * 0.1 * e^{-k_{\text{slow}} * x}$. La constante que aparece en la gráfica se refiere a la fase lenta (la más larga), mientras que el r^2 corresponde al ajuste completo.

Basados en las diferencias en el pH, según el porcentaje de CO_2 y a la concentración de bicarbonato del medio indicadas más arriba y basados así mismo en el hecho de que la medición del pH en las células muertas fue más alto, decidimos medir el pH del medio MEM durante el proceso de calcificación en el interior de la estufa de CO_2 usando las tres concentraciones de Pi habituales 1, 2 y 3 mM, y cambiando el medio cada dos días y con 0.53 ml/cm² de medio. Como se

puede observar en la figura 13 A, el pH sigue el mismo patrón que la muerte celular y la formación de depósitos de calcio durante la calcificación, incrementándose de forma significativa a 3mM durante todo el experimento, y despuntando a 12 días con 2mM de Pi en el medio. Estos hallazgos indican que el metabolismo celular previene mayores subidas del pH y que el aumento del pH durante la calcificación es principalmente causado por la muerte celular, más que por las condiciones calcificantes. Por lo tanto, esta subida del pH produce un mayor índice de precipitación (Figura 13 B).

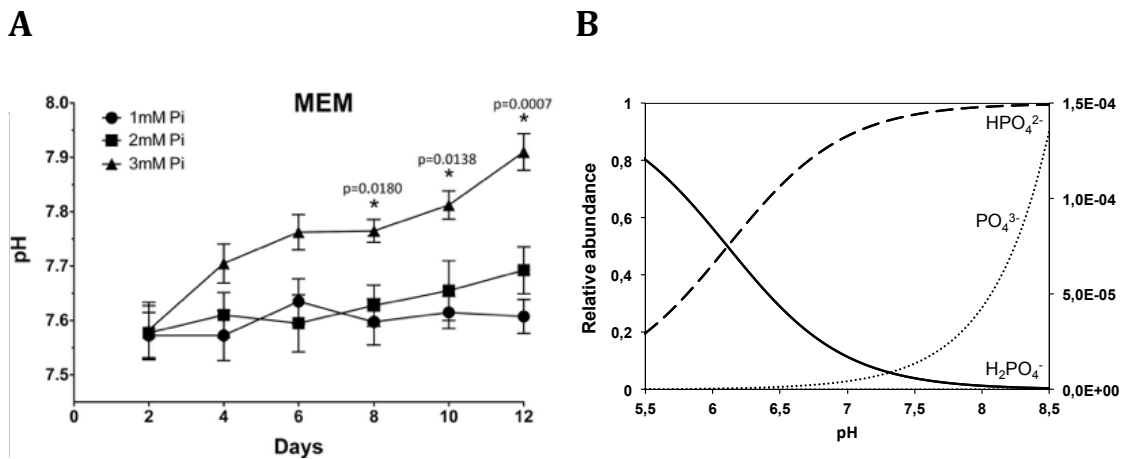


Figura 13: (A) Evolución del pH durante la calcificación de VSMC en MEM con 1, 2 y 3 mM de Pi, durante 12 días. Las mediciones fueron realizadas en el interior de una estufa de CO₂ (5%). Se realizó una ANOVA por cada día en el que se midió el pH. *Diferencia significativa con el control de 1 mM correspondiente mediante un test de Tukey. (B) Variación de la concentración relativa de diferentes especies de fosfato según el pH. El eje vertical derecho muestra el ratio de PO₄.

1.4. NUCLEACIÓN DE FOSFATOS DE CALCIO.

El inicio de la formación de precipitados de Ca/P fue estudiada por DLS (Figura 14 A). En primer lugar se estudió la precipitación en ausencia de células, sólo con los medios (MEM y DMEM, debido a que fueron en los que se había observado previamente formación de depósitos de Ca²⁺) con las 3 concentraciones de Pi previamente estudiadas (Tabla 1), en placas de cultivo. Estas placas se mantuvieron en la estufa de CO₂ (5%) a 37°C, durante seis días, sin cambiar el medio, tomándose alícuotas y analizándose por DLS cada hora hasta completar las primeras 24 horas, y cada días tras esto. En presencia de 1mM, no precipitó ninguno de los medios (en el momento 0 aparece un pico de 10 nm que no

evoluciona en ningún momento), mientras que con 2 mM de Pi en MEM, a las 24 horas se detectaron picos de 120 y 190 nm que podría corresponderse con precipitados de calcio fosfato, y que aumenta de tamaño (creciendo o por agregación de partículas) con el tiempo hasta alcanzar 1 μm a los 3 días, manteniendo este tamaño los últimos 3 días. En el caso de el MEM con 3 mM de Pi, a las 6 horas ya se detectan partículas de 220 nm, alcanzando estas 1 μm tras 48h, haciéndose visible para el ojo humano la presencia de precipitados en el fondo de los pocillos. Por otro lado, en DMEM con 2 mM de Pi, las partículas fueron detectadas tras la primera hora de incubación (con tamaños de 100 y 150 nm). Tras 24 horas, las partículas depositadas ya podían ser observadas como agregados. En presencia de 3 mM de Pi en DMEM, se observó un comportamiento parecido de las partículas, excepto por el tamaño, que a las 3 horas disminuyó, probablemente por la densificación de los precipitados (como será descrito más adelante en la sección de caracterización de las partículas por TEM).

A continuación, se procedió a realizar el mismo estudio, pero en presencia de células (Figura 14 B), observándose una inhibición clara de la formación de precipitados. En este caso los medios fueron cambiados cada 48 horas, y en consecuencia, los análisis de los medios sólo se hicieron hasta ese momento. Tanto en MEM como DMEM con 2 mM de Pi, no se observaron precipitados de un tamaño significativo hasta casi las 48 horas, cuando aparecieron cristales de 100 nm. En cuanto a los medios con 3 mM de Pi, la nucleación apareció más tarde que en el medio sin células, pero los tamaños fueron similares: las partículas fueron observadas tras 4 horas en MEM y tras 2 en DMEM.

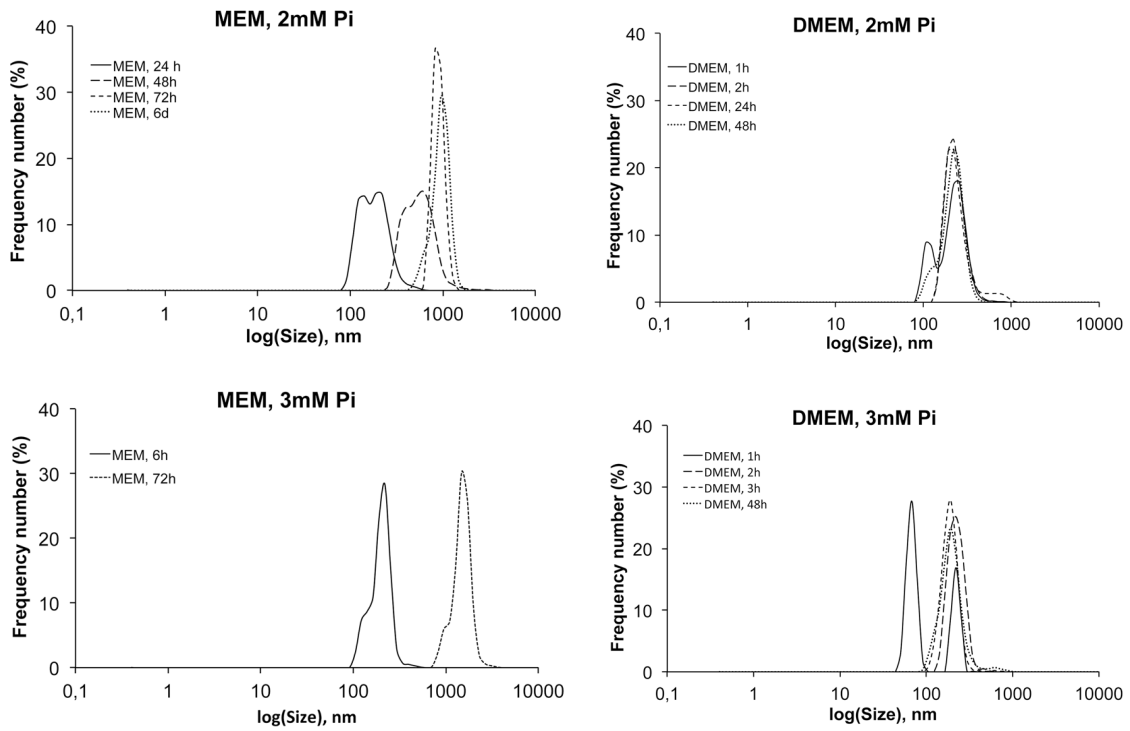
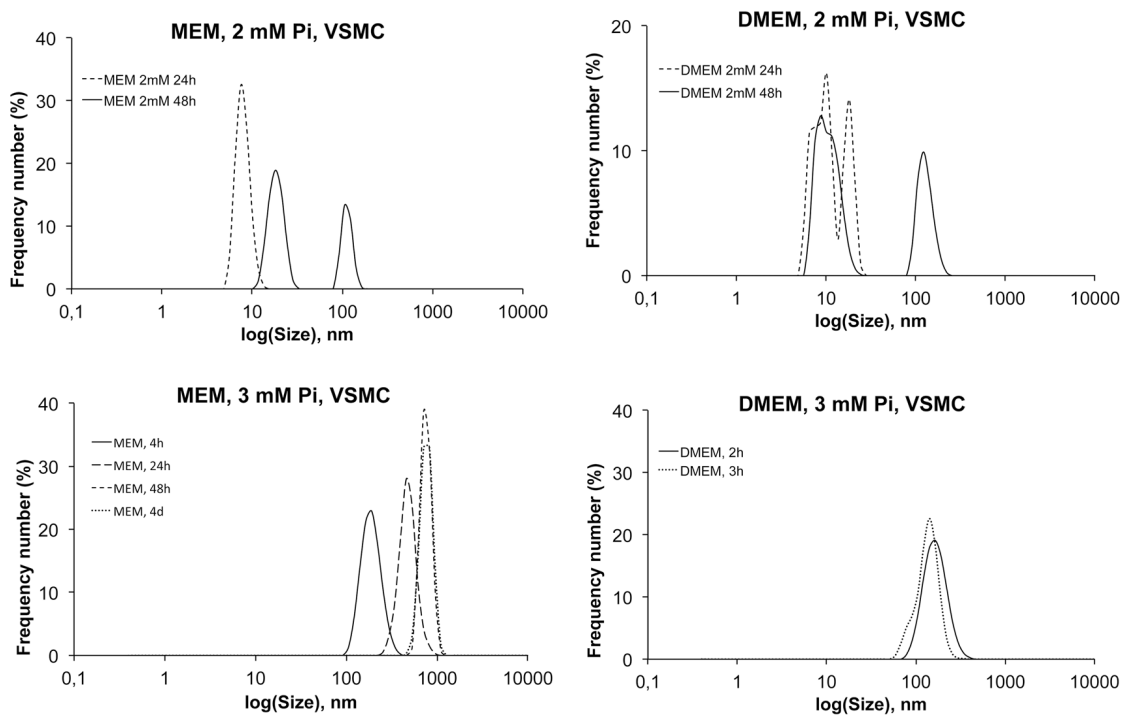
A**B**

Figura 14: Análisis por DLS de la formación de nanocristales. (A) Las gráficas muestran la formación de núcleos de Ca/P en MEM o DMEM sin células en la estufa de CO₂ en los tiempos indicados, y en presencia de 2 o 3 mM de Pi. (B) El mismo experimento que en (A), en presencia de VSMC con las concentraciones de Pi y tiempos de incubación indicados.

| $[Ca^{2+}]_0$ | $[PO_4^{3-}]_0$ | buffer | $[HCO_3]$ | pH_0-pH_∞ | $a(Ca)_0$ | $a(PO_4)_0$ | S | S | S | (HAP) |
|---------------|-----------------|----------|-----------|------------------|-----------|-------------|-----------|-----------|-------|-------|
| mM | mM | | mM | | mM | mM | (ACP) | (DCPD) | (OCP) | (HAP) |
| 1.8 | 1 | DMEM | 44.05 | 8.67-7.95 | 0.58 | 0.32 | 1.15-0.74 | 0.78-0.78 | 23-13 | 49-24 |
| 1.8 | 2 | DMEM | 44.05 | 8.67-7.95 | 0.58 | 0.64 | 1.40-0.90 | 1.06-1.05 | 31-17 | 58-28 |
| 1.8 | 3 | DMEM | 44.05 | 8.67-7.95 | 0.58 | 0.96 | 1.54-1.00 | 1.24-1.23 | 36-20 | 63-30 |
| 1.8 | 1 | MEM | 26.19 | 8.39-7.68 | 0.58 | 0.32 | 0.96-0.63 | 0.78-0.77 | 18-10 | 37-18 |
| 1.8 | 2 | MEM | 26.19 | 8.39-7.68 | 0.58 | 0.64 | 1.18-0.77 | 1.06-1.05 | 24-13 | 44-21 |
| 1.8 | 3 | MEM | 26.19 | 8.39-7.68 | 0.58 | 0.96 | 1.30-0.85 | 1.24-1.23 | 28-15 | 47-23 |
| 1.05 | 1 | DMEM:F12 | 14.29 | 7.58-7.36 | 0.34 | 0.32 | 0.36-0.33 | 0.62-0.61 | 7-5 | 15-8 |
| 1.05 | 2 | DMEM:F12 | 14.29 | 7.58-7.36 | 0.34 | 0.64 | 0.44-0.41 | 0.83-0.82 | 9-7 | 17-10 |
| 1.05 | 3 | DMEM:F12 | 14.29 | 7.58-7.36 | 0.34 | 0.96 | 0.48-0.45 | 0.96-0.96 | 11-8 | 19-11 |

Tabla 1: Concentración total inicial de $[Ca^{2+}]_0 = 1.8\text{mM}$ para DMEM y MEM y 1.05mM para DMEM:F12; coeficiente de actividad de la ecuación de Davies, $\gamma = 0.32$; actividad iónica del producto de Ca/P amorfo, $IAP(ACP) = [a(Ca^{2+})][a(PO_4^{3-})]^{0.74}[a(H^+)]^{0.22}$ and $K_{sp}(ACP) = 2.29 \times 10^{-11}$; actividad del producto de fosfato dicalcico dihidrato, DCPD, $IAP(DCPD) = [a(Ca^{2+})][a(H_2PO_4^-)]$ y $K_{sp}(DCPD) = 2.4 \times 10^{-7}$ actividad del product de fosfato de octacalcio, OCP, $IAP(OCP) = [a(Ca^{2+})]^8[a(H_2PO_4^-)]^2[a(PO_4^{3-})]^4$ y $K_{sp}(OCP) = 2.5 \times 10^{-99}$; actividad del producto de hidroxiapatita HAP, $IAP(HAP) = [a(Ca^{2+})]^{10}[a(PO_4^{3-})]^6[a(OH^-)]^2$ y $K_{sp}(HAP) = 5.5 \times 10^{-118}$. Los índices de sobresaturación fueron calculados para los valores de pH en el comienzo (pH_0) y en equilibrio con 5% de CO_2 (pH_∞) en el ambiente, y fueron definidos como $S = \left(IAP/K_{sp}\right)^{1/v}$, donde v es la suma de los exponentes en la formula de la IAP.

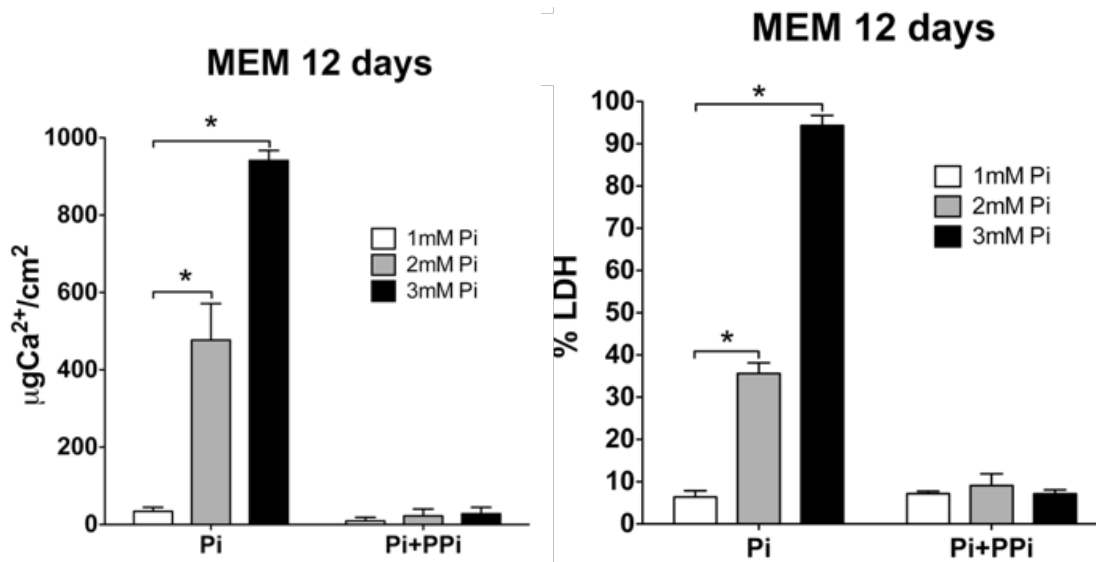
1.5. CARACTERIZACIÓN DE LA TOXICIDAD DEL Pi.

La muerte celular observada en el punto 1.1. podía estar provocada por agentes causales, tales como: toxicidad del Pi, indirectamente por endocitosis de nucleos cristalinos, por daño físico por la precipitación masiva de partículas de Ca/P, por la alcalinidad del medio, por agotamiento de Ca^{2+} ...

Para resolver este interrogante, decidimos llevar a cabo varios experimentos. En primer lugar incubamos VSMC durante 12 días con 1, 2 y 3 mM de Pi en MEM y DMEM, añadiéndole $12 \mu\text{M}$ de pirofosfato inorgánico (PPi), el cual es un potente inhibidor de la calcificación (Figura 15 A). Como se esperaba, el PPi inhibió completamente la formación de depósitos de Ca/P, pero además bloqueó completamente el aumento de la muerte celular. De esto se desprende que la toxicidad celular del Pi no es la causa del aumento en la muerte celular, ni siquiera a 3mM. La TNAP, hidroliza el PPi en dos moléculas de Pi. Para confirmar el aumento de la expresión de la misma observada por ARN (figura 2), medimos a diferentes tiempos, la actividad de la TNAP en lisados de VSMC tratadas con

medios calcificantes, observando un aumento de la misma a los 4 y a los 8 días, confirmando el resultado obtenido con el ARN. (Figura 15 B). Una interpretación de estos resultados es, que la TNAP descende la cantidad de P*Pi* en el medio, requiriéndose P*Pi* extra para evitar la formación de cristales de Ca/P, y aumentando la muerte celular.

A



B

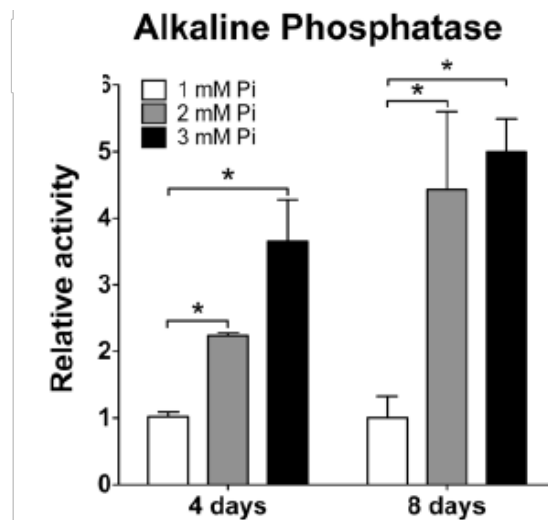


Figura 15: (A) Prevención de la calcificación y el aumento de la muerte celular durante 12 días con 12 μM de P*Pi* en MEM. ANOVA $p < 0.0001$ para la calcificación sin P*Pi*; *Diferencia significativa con el control de 1 mM correspondiente mediante un test de Tukey. (B) Actividad de TNAP relativa a la condición de 1 mM Pi en lisados de células incubadas durante 4 y 8 días con 1, 2 y 3 mM de Pi en MEM. ANOVA a 4 días $p=0.0065$; ANOVA a 8 días $p= 0.0195$. *Diferencia significativa mediante un test de Tukey.

Si bien el porcentaje de SFB ente 0 y 0.6% no afectaba a la muerte celular, decidimos comprobar la capacidad inhibidora de la calcificación del suero al 10%. Para ello usamos el mismo modelo de estudio con MEM o DMEM y 1,2 y 3mM de Pi, pero utilizando SFB al 10% en lugar de al el 0.2% de SFB por 10%. El suero consiguió inhibir la formación de depósitos, así como el aumento de la muerte celular en todos los casos excepto en DMEM con 3mM de Pi (Figura 16).

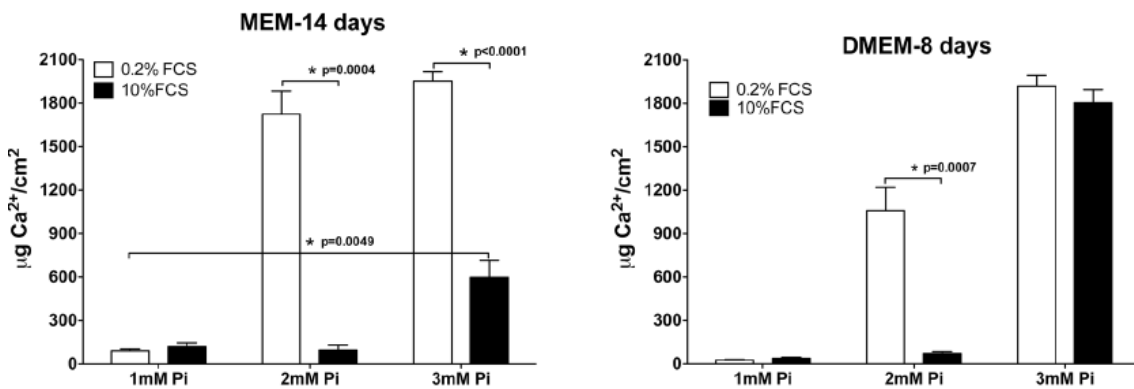


Figura 16: Tratamiento de VSMC con MEM con diferentes concentraciones de Pi (1, 2 y 3 mM) y 0.2-10% de SFB durante 14 días. Los asteriscos indican diferencias significativas de las medias con un test t de Student, mostrándose la p de cada análisis en la gráfica.

Por otro lado, otra causa para el aumento de la muerte celular era la disminución de Ca^{2+} y/o Pi por secuestro durante la formación de precipitados, por lo que decidimos en primer lugar determinar si se producían dichos descensos, cuantificando el Ca^{2+} y el Pi de los medios calcificantes (1, 2 y 3 mM en MEM). Las cuantificaciones mostraron una bajada mínima en el caso del fosfato, mientras que en el calcio, que originalmente se encuentra a una concentración 1.8 mM, prácticamente desaparecía en los medios con 3 mM de Pi (Figura 17 A). Tras esto, estudiamos el efecto de la baja concentración de Ca^{2+} en el medio, sobre las VSMC. Para ello tratamos VSMC con un medio MEM preparado por nosotros pero sin calcio, al que le añadimos diferentes concentraciones de Ca^{2+} , y cuantificamos el % de LDH durante 6 días (al cambiar el medio cada 2), mostrando un aumento de la muerte celular inversamente proporcional a la cantidad de calcio en el medio (Figura 17B), si bien este aumento no explicaría la totalidad del observado en los estudios de calcificación.

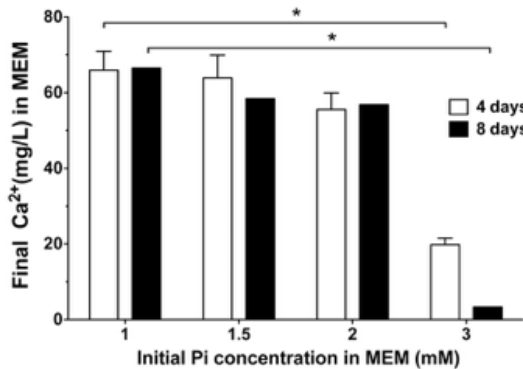
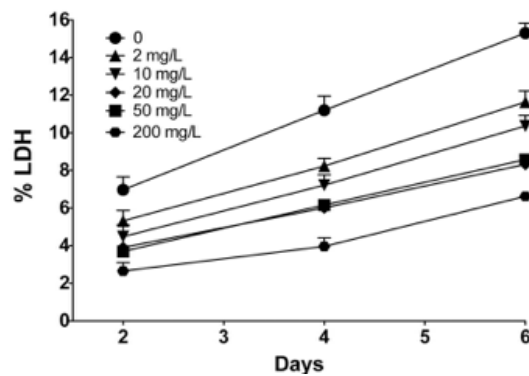
A**B**

Figura 17: (A) Variación de la concentración de calcio en MEM tras 4 y 8 días de incubación, usando la cantidad indicada de Pi. * $p < 0.0001$ con test t de student. (B) Mortalidad celular tras incubar VSMC con las concentraciones de calcio indicadas en un medio MEM hecho en el laboratorio.

1.6. ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DE LOS DEPÓSITOS

La ultraestructura y la composición de los depósitos fue analizada con TEM. Se crecieron VSMC en medio MEM o DMEM en presencia de 1, 1.75 y 2 mM de Pi durante 10 días y con 2.5 o 3 mM de Pi en MEM durante 16 días (en el segundo caso no se usó DMEM debido a que a esas concentraciones de Pi, DMEM inducía una precipitación masiva que es irrelevante para los sucesos *in vivo*). La figura 18A muestra una selección de las fotografías tomadas por microscopía electrónica.

Las VSMC tratadas con 1mM de Pi no mostraron depósitos relevantes, sólo se encontraron algunas nanopartículas de 50 nm compuestas por partículas más pequeñas cuya estructura era borrosa cuando se observaba a grandes aumentos. Las imágenes a bajos aumentos (columna de la izquierda en la figura 18 A) muestran que los precipitados generados con una concentración moderada de Pi (1.75 mM) eran bastante transparentes al haz de electrones, lo que coincide con una baja densidad de Ca y con un alto contenido en agua. La densidad de los depósitos incrementó progresivamente en los pocillos tratados con 2 mM de Pi, llegando a ser opaca con 3mM de Pi.

La microestructura de los depósitos se pudo observar ya en imágenes

obtenidas a medianos aumentos (columna central de la figura 18 A). Con 1.75 mM en MEM los depósitos observados fueron muy heterogéneos, formados por láminas que contenían partículas de material más denso con diferentes formas y tamaños. Sin embargo, cuando se usó 1.75 mM de Pi en DMEM, se encontró una estructura más organizada compuesta de láminas irregulares, más densas, que incluían nanopartículas elongadas dispuestas de forma radial. Los depósitos procedentes de los pocillos tratados con 2 mM Pi en MEM no mostraron sin embargo esas partículas elongadas, mientras que con la misma concentración de Pi pero en DMEM sí que lo hizo. En el caso de 2.5 y 3 mM en MEM, la mayor parte de la estructura estaba formada por partículas redondeadas, electrodensas y de 10 nm, estructuradas en “esferolitos”.

Por otro lado, las imágenes a grandes aumentos (columna de la derecha en la figura 18 A), mostraron nanopartículas con contornos difusos en los depósitos de 1.75 mM y 2 mM de Pi en MEM. En DMEM, los depósitos de 1.75 mM de Pi contenían varillas de un espesor de 3 nm y partículas redondeadas y pobremente definidas de 5 a 10 nm mientras que con 2 mM de Pi, los depósitos presentaron caras rectas, a pesar de que los planos cristalinos todavía no eran visibles (estos los fueron observados en los depósitos de 2.5 y 3 mM).

La cristalinidad de los depósitos fue también estudiada por difracción de electrones (Figura 18 B). Cuando las VSMC fueron incubadas durante 10 días usando 2 mM de Pi en MEM, la DE no reveló reflejos de los planos cristalinos y sólo detectó depósitos amorfos. Contrariamente, en los depósitos procedentes de células incubadas usando 2 mM de Pi en DMEM, la DE reveló cristalización con anillos en 2.81 y 3.52 Å, siendo estos cercanos a los de la hidroxiapatita (2.82 y 3.44 Å). Finalmente, en las VSMC incubadas en MEM con 2.5 y 3 mM de Pi durante 16 días, la DE mostró el típico patrón de la hidroxiapatita. Por lo tanto, al incrementar el bicarbonato, y por lo tanto el pH del medio de cultivo, se acelera así mismo la conversión de fosfato amorfo a hidroxiapatita cristalina, observándose este mismo efecto al aumentar la cantidad de Pi en el medio.

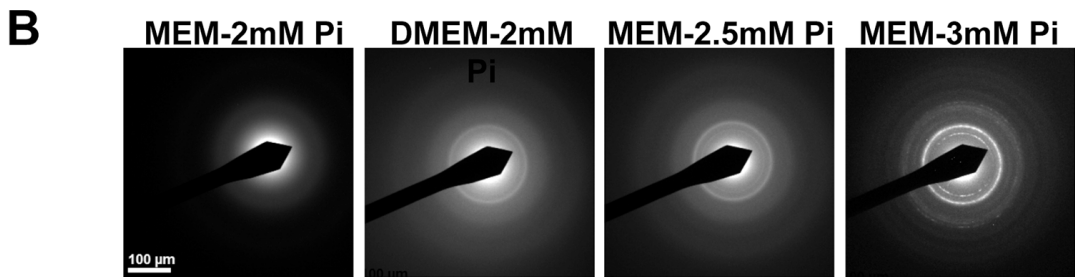
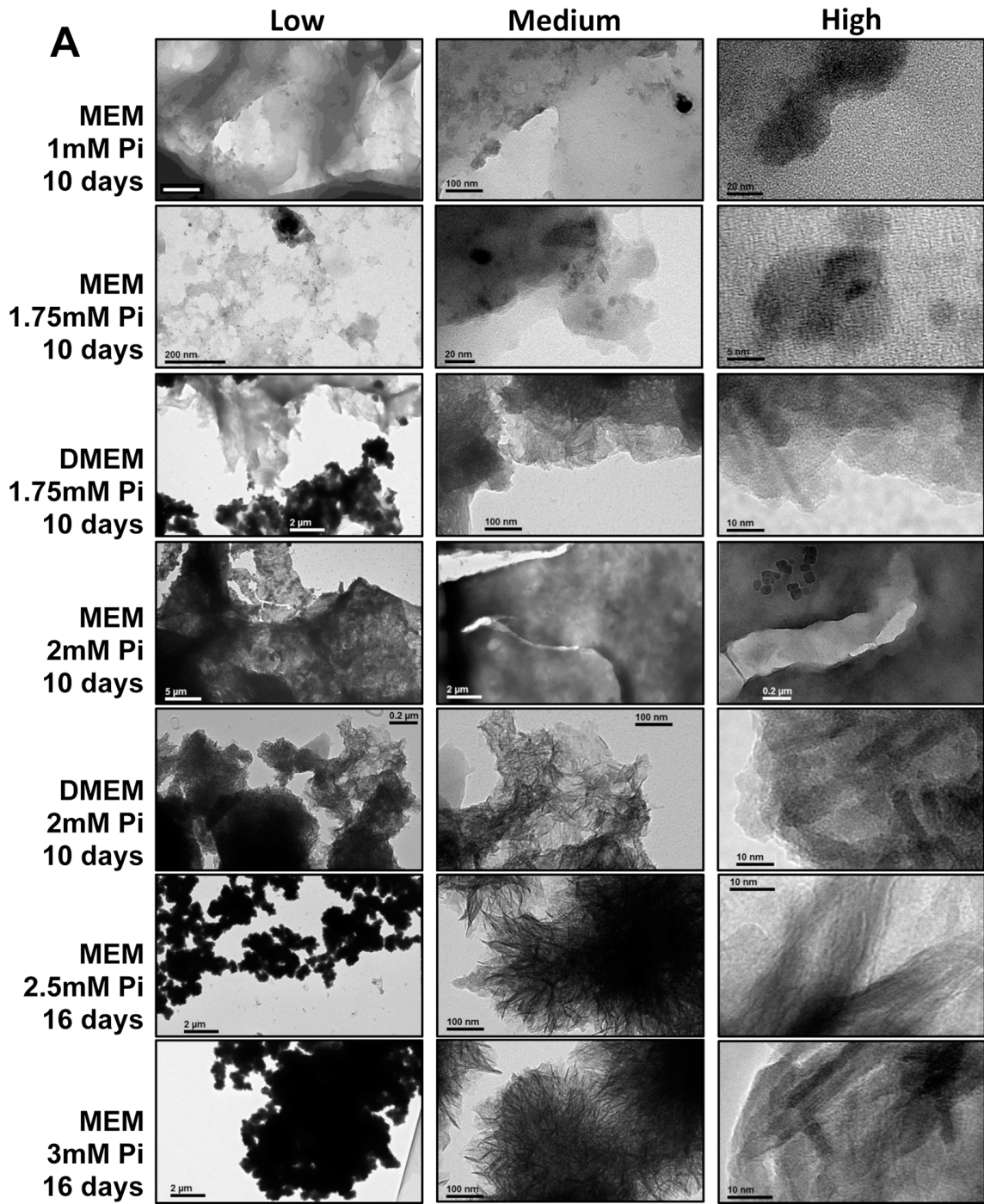


Figura 18: (A) Imágenes de TEM, a diferentes aumentos de los depósitos procedentes de VSMC incubadas con las condiciones que se indican a la izquierda en cada caso. Las imágenes de la primera columna (pocos aumentos) son indicativas de la densidad de los depósitos, que claramente

incrementa con la concentración de Pi; las imágenes en la segunda columna con medios aumentos, muestran las microestructuras de los depósitos, que gradualmente adoptan una distribución esferolítica de partículas similares a una aguja, a medida que la concentración de Pi aumenta; las imágenes de la tercera columna (altos aumentos) muestran la forma y el tamaño de las nanopartículas cristalinas. (B) Patrones de DE de los depósitos procedentes de los cultivos de VSMC de los que se ha hablado en (A), los cuales muestran un aumento en la cristalinidad de MEM a DMEM y de 2 mM a 3 mM de Pi. Usando MEM con 2 mM de Pi durante 10 días, LA DE no mostró reflejo de planos cristalinos, mientras que cuando se usó DMEM con la misma concentración de Pi aparecieron los anillos cristalinos de 2.81 y 3.52 Å, siendo estos compatibles con hidroxiapatita (2.82 y 3.44 Å). Los depósitos de VSMC incubadas en MEM con 2.5 y 3 mM de Pi durante 16 días también revelaron cristalización con el patrón de la hidroxiapatita.

2. EVOLUCIÓN LOS SUCESOS TEMPRANOS EN LA CALCIFICACIÓN VASCULAR EN RATAS CON NEFRECTOMÍA 5/6.

A pesar de los avances en la comprensión de la CVM asociados al desarrollo de la genética y la biología molecular y celular, aún quedan importantes incógnitas por resolver, como por ejemplo el/los desencadenante/s de esta patología. Debido a que la mayor parte de las investigaciones llevadas a cabo hasta el momento han estado centradas en el estudio de etapas avanzadas de la CV, en las que aparecen grandes formaciones cristalinas en la pared de las arterias, creemos que es importante esclarecer los cambios que se producen en el comienzo de la CVM, así como el orden de los sucesos que tienen lugar durante el desarrollo de la misma, dado que gran parte de las teorías al respecto están basadas en trabajos *in vitro* basados en artefactos experimentales como acabamos de comentar en el punto anterior. Por ello, decidimos utilizar el modelo animal de rata nefrectomizada 5/6 (el cual simula la ERC), para estudiar los cambios iniciales de la CVM asociada a la ERC.

Para este estudio, se llevó a cabo en primer lugar un experimento preliminar con ratas centinela para encontrar el primera vez en el que se observara un aumento en la cantidad de calcio o un aumento en la expresión de ARN de alguno de los genes de interés en la CVM estudiados en la aorta, presentando además una tinción de rojo de alizarina negativa. Como punto temporal final del estudio, se buscó también el aquel en que la tinción fuese positiva. Según los resultados de este primer estudio, con el que se fijó el tiempo inicial y final, se llevó a cabo otro experimento, estudiando los parámetros de interés a las 11, 12, 16 y 20 semanas tras la nefrectomía y el inicio de las dietas (0.6 de Pi en las control y 1.2% de Pi en

las nefrectomizadas). De este experimento con 4 puntos temporales se obtuvieron los resultados expuestos a continuación.

*En las figuras, se ha utilizado como control la media de todos los resultados procedentes de ratas control de todos los puntos temporales debido a que en ningún caso se encontraron diferencias significativas entre estos puntos, y se consideró que facilitaba la comprensión de los resultados.

2.1. CUANTIFICACIÓN DE Ca^{2+} y PPI AÓRTICOS.

La cuantificación por colorimetría del calcio aórtico reveló un aumento significativo de la concentración del mismo en el grupo de los animales nefrectomizados respecto al grupo control, en todos los casos, excepto a las 11 semanas. Los depósitos de calcio todavía no fueron visibles por microscopía de contraste de fases, ni con las tinciones de rojo de alizarina y von Kossa. Este resultado confirmó que la formación de estos depósitos en las aortas empieza mucho antes de que puedan ser detectados por observación directa o por medio de estas tinciones tradicionales (Figura 19 A).

Por otro lado, el PPI aórtico fue cuantificado por fluorimetría, a partir de lisados de segmentos aórticos fijados con PFA al 4%. En este caso no se observaron cambios significativos entre el grupo control y las nefrectomizadas en ninguno de los puntos temporales (Figura 19 B). Este resultado resulta en cierto modo sorprendente, dado que debido al aumento de la expresión de ARN y proteína de la TNAP, la cual hidroliza el PPI a dos moléculas de Pi, se esperaba un descenso del PPI. Por otro lado, si bien esto indica que no existe un cambio detectable por el kit utilizado (su margen de detección va de 1 a $300\mu\text{M}$), también existe la posibilidad de que este método no sea lo suficientemente sensible para detectar los cambios en el ambiente pericelular de las VSMC, siendo interesante su determinación en estudios futuros.

2.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LA AORTA

2.2.1. MICROSCOPIA ELCTRÓNICA DE BARRIDO

Tanto SEM como FSEM fueron utilizados en la localización de los primeros depósitos de Ca/P. Debido a que previamente se había encontrado aumentado el calcio en las aortas tras 12 semanas desde la nefrectomía, pero no mediante

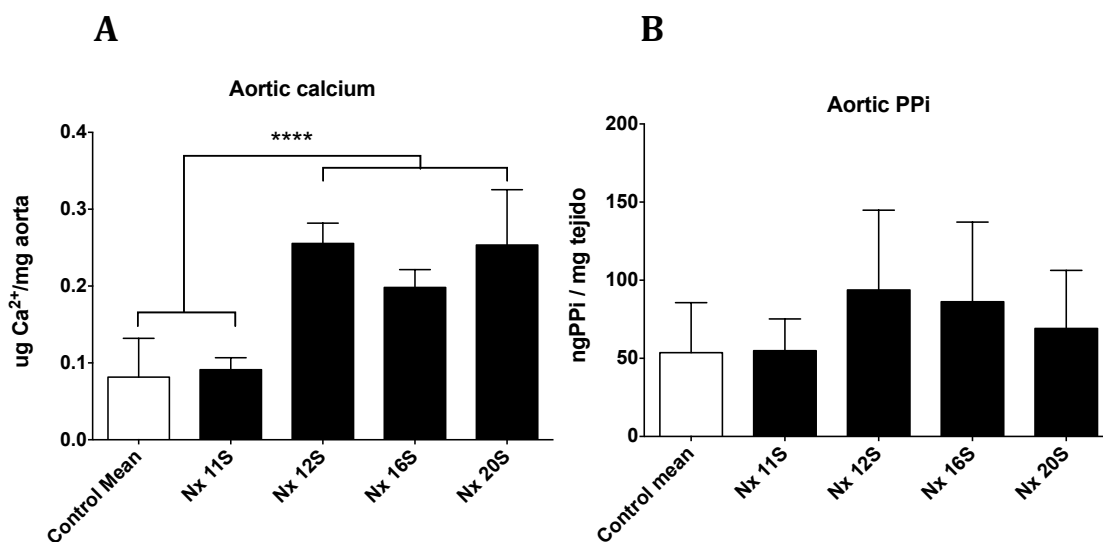


Figura 19: (A) Ca^{2+} en aorta de animales control y tras 11, 12 16 y 20 semanas tras la nefrectomía (ANOVA $p < 0.0001$), a partir de las 12 semanas tras la nefrectomía se observa un aumento significativo en el grupo de las nefrectomizadas respecto a la media de los controles (mediante un test de Tukey). (B) PPI en aorta de animales control y tras 11, 12 16 y 20 semanas tras la nefrectomía, no observó ningún cambio significativo con un test de ANOVA.

el punto anterior, decidimos llevar a cabo una búsqueda exhaustiva de nanopartículas de Ca/P en diferentes cortes de paredes aórticas procedentes de animales control y nefrectomizados de estos dos puntos temporales. Finalmente se encontraron partículas muy diseminadas de unos 300 nm (hasta $1\mu\text{m}$) en los animales nefrectomizados, a las 12 semanas (Figura 20), mientras que no se localizó ninguna ni en los controles ni en las nefrectomizadas a las 11 semanas, confirmando el paralelismo entre el aumento del calcio detectado por colorimetría, y la aparición de los primeros nanodepósitos de Ca/P.

2.2.2. TEM

En cuanto a la microscopía electrónica de transmisión (TEM), se estudiaron los estadios mas avanzados para diferenciar todas las estructuras sobre las que se depositaban los cristales de Ca/P. En estos estadios más avanzados se encontraron tanto cuerpos necrótico/apoptóticos, como vesículas de membrana y fibras de elastina afectadas por la calcificación (Figura 21).

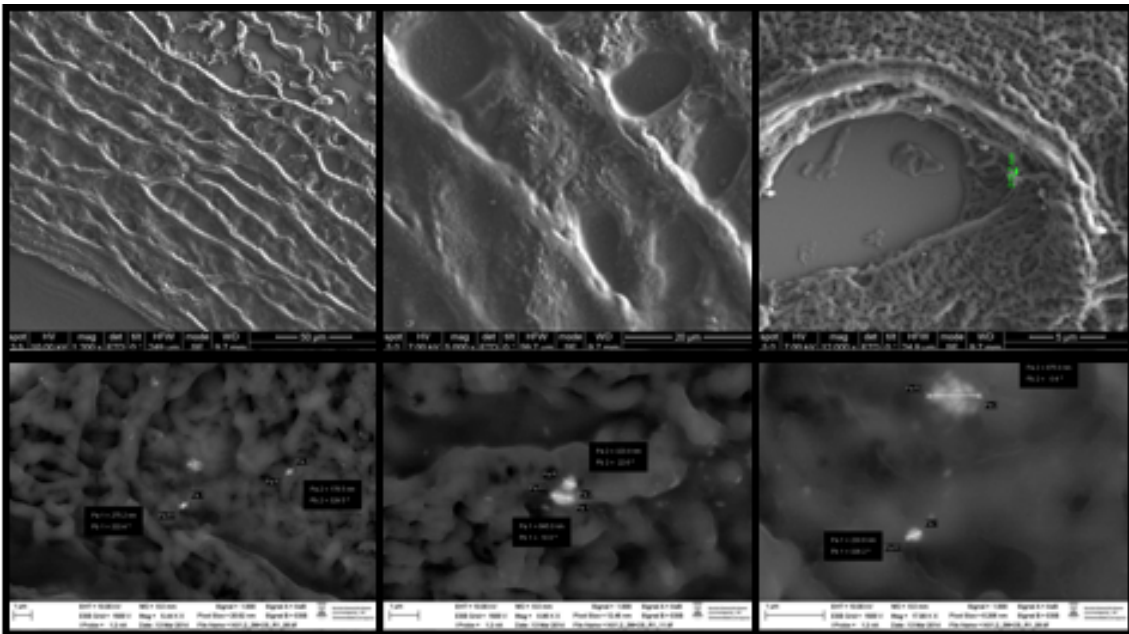


Figura 20: Imágenes de SEM a diferentes aumentos (de menor a mayor, de izquierda a derecha en la fila de arriba y de izquierda a derecha en la de abajo). Las imágenes muestran los nanoprecipitados encontrados en las aortas de ratas tras 12 semanas de la nefrectomía (la primera vez que fueron localizados). Los precipitados se encontraron en la zona celular de la media (correspondiente con las VSMC) y presentaron un tamaño de aproximadamente entre 0.3 y 1 μ m y un ratio Ca/P menor al de la hidroxiapatita, correspondiendo esto con estructuras todavía amorfas y por lo tanto con etapas mas iniciales de la cristalización.

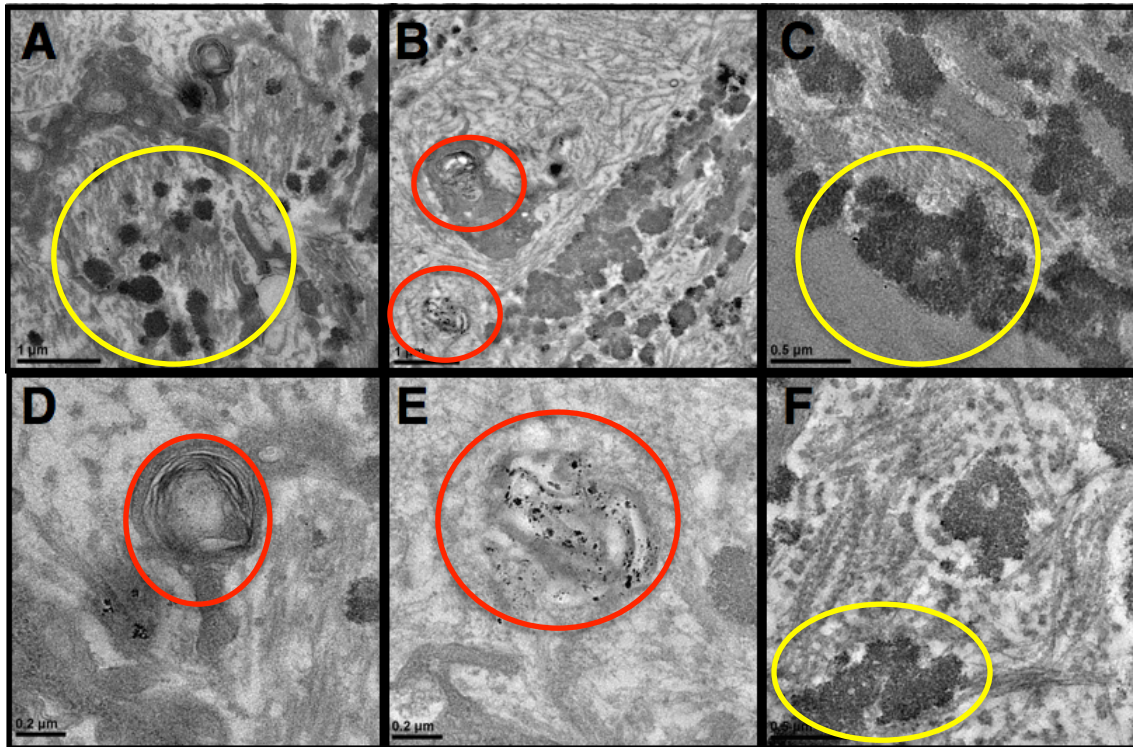


Figura 21: Imágenes de TEM en animales urémicos 20 semanas tras la nefrectomía, a diferentes aumentos. Las zonas señaladas corresponden con calcificaciones encontradas en diferentes componentes del tejido: Las marcas en amarillo corresponden con fibras elásticas calcificadas, mientras que en rojo se encuentran las vesículas calcificantes.

2.3. ESTUDIOS DE LA EXPRESIÓN DE ARN

Partiendo de un lisado procedente de la homogenización de tres segmentos aórticos diferentes (uno del cayado de la aorta, otro de la aorta torácica y otro de la aorta abdominal), se purificó el ARN total para llevar a cabo una retrotranscripción y obtener ADNc a fin de cuantificar la expresión de diferentes genes de interés por PCR en tiempo real. Los genes analizados están enumerados en el apartado 10.2 de la sección de material y métodos.

Los primeros genes en los que se detectó un cambio significativo en la expresión fueron TNAP y Dkk1, observándose un aumento de la expresión en el grupo de las nefrectomizadas desde la semana 11, (y apareciendo por lo tanto previamente al aumento en la cuantificación del calcio aórtico y de la visualización por SEM de los primeras partículas de Ca/P depositadas). Una de las características más interesantes del patrón de expresión de la TNAP fue que tras la aparición del primer aumento significativo pero no masivo de la misma a las 11

semanas, tras lo que en el siguiente punto temporal, la expresión alcanzó su punto más alto (siendo 4 veces superior a la de los animales control y aproximadamente 2 veces superior al de las nefrectomizadas en el resto de los puntos temporales), para luego continuar siendo más alta en el grupo de las nefrectomizadas que en el de los controles, pero poco a poco descendiendo conforme avanza la enfermedad (Figura 22 A). El interés de esta respuesta de expresión de TNAP en el tiempo, viene dado porque en el desarrollo óseo sucede lo mismo, tratándose de un agente calcificante temprano¹⁶⁶. Por otro lado, el papel de Dkk1 es todavía muy incierto¹²², puesto que es un inhibidor de la ruta metabólica de desarrollo Wnt, la cual favorece la calcificación en los huesos (siendo el Dkk1 circulante asociado a osteodistrofia)¹⁶⁷, pero por otro lado, se ha demostrado que su inhibición produce una activación de la transición endotelio-mesenquimatosa en los vasos sanguíneos (mediante la activación generada por proteínas como el AIIR) y la producción de TNAP favoreciendo todo esto la calcificación vascular por activación de la ruta de BMP2-Runx2¹²⁵. En nuestro caso, el patrón de expresión de ARN de Dkk1 fue paralelo al de TNAP (Figura 23), si bien en el caso de Dkk1 en los controles prácticamente no había expresión alguna, existiendo una correlación en la expresión de ambas: aumentando unas 5 veces a las 11 semanas en el grupo de las nefrectomizadas respecto al control, para encontrarse a continuación una expresión 20 veces mayor a los controles tras 12 semanas, descendiendo hasta volver a ser de 5 veces mayor en las nefrectomizadas respecto al control en las semanas 16 y 20 (Figura 22 B). Esto puede hacer pensar que, como inductor de la expresión de TNAP¹²⁵, la expresión de Dkk1 fue (al menos en parte) la responsable de los cambios en la misma.

En la semana 12, se encontró alterada la expresión de PHOSPHO1, BMP2, ANKH y Klotho. El aumento en la expresión de BMP2 en este punto (Figura 24 A) indica la evolución de la osteodiferenciación hacia la ruta BMP2-Runx2. PHOSPHO1 es una fosfatasa cuya participación en la calcificación fisiológica en hueso ha sido descrita recientemente¹⁶⁸, siendo interesantes sus cambios en la expresión en nuestro caso, puesto que a las 12 semanas aparece una disminución de la misma en el grupo de las nefrectomizadas hasta casi desaparecer, mientras que a las 20 semanas, se duplica la expresión respecto a los

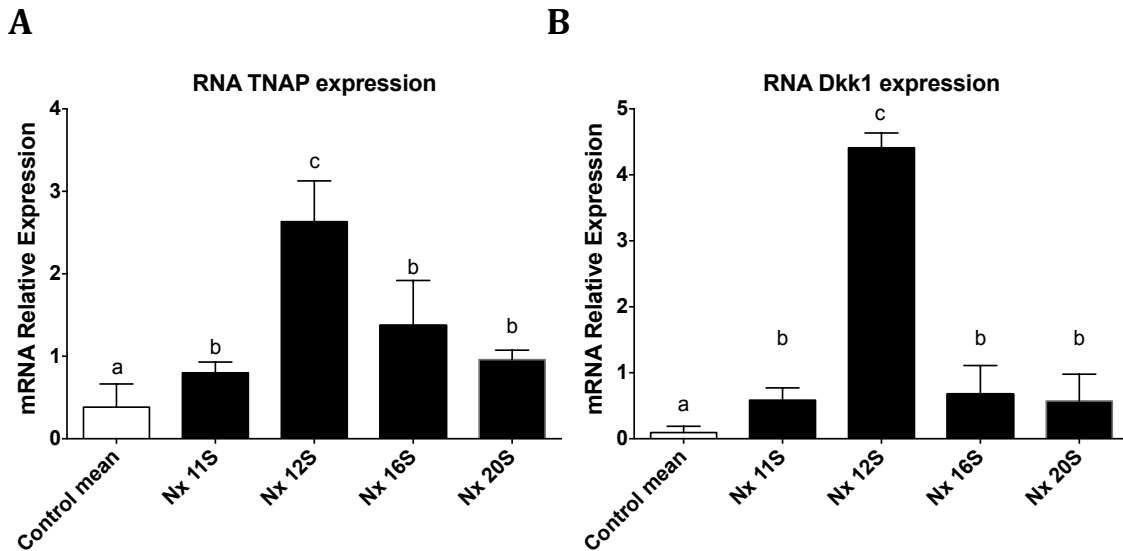


Figura 22: Expresión de TNAP (A) y de Dkk1 (B) en aorta de animales control y nefrectomizados tras 11, 12 16 y 20 semanas tras la nefrectomía. ANOVA $p < 0.0001$, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Se observa un aumento significativo de la expresión en todos los grupos de ratas nefrectomizadas, respecto al control, siendo este mayor 12 semanas tras la nefrectomía. En el caso de Dkk1 la expresión de las ratas control es prácticamente inexistente.

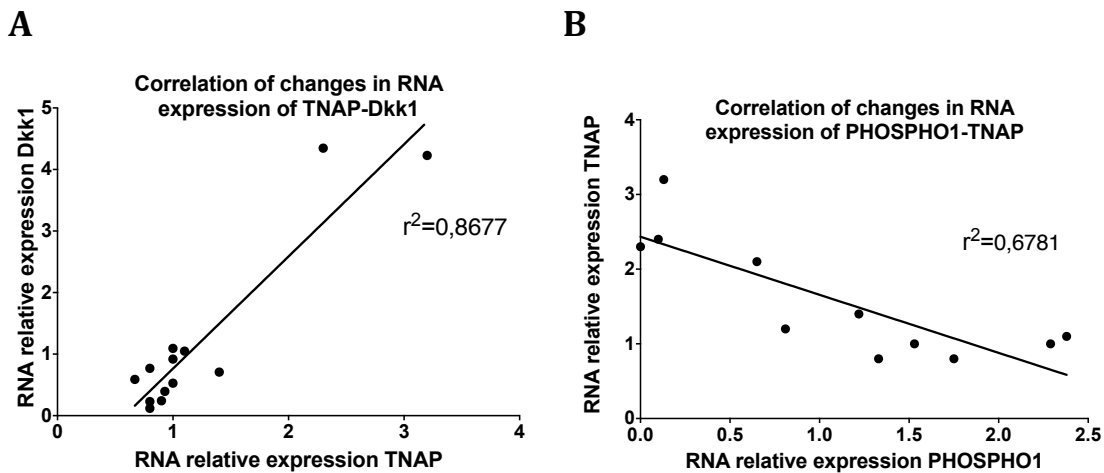


Figura 23: Correlación entre los cambios de expresión en TNAP y Dkk1 (A) y PHOSPHO1 y TNAP (B).

controles (Figura 24 B). Este bloqueo en la expresión a las 12 semanas, coincide con el pico máximo de expresión de la TNAP, por lo que puede ser que ambos cambios estén relacionados (de hecho, se detectó una correlación negativa con un r^2 de 0.6781 entre los cambios en PHOSPHO1 y los de TNAP, como se muestra en la figura 23 B), disminuyendo la expresión de PHOSPHO1 por, probablemente, retroalimentación negativa de TNAP. El aumento en la expresión de ANKH,

triplicándose respecto al control a las 12 semanas (Figura 24 C), también podría guardar relación con la sobreexpresión de TNAP. ANKH es una proteína de membrana que actúa movilizándolo el PPi intracelular al espacio extracelular, por lo que si realmente la TNAP se encontrara hidrolizando el PPi en el espacio extracelular, no sería raro que la VSMC en respuesta a ello intentara movilizar más PPi hacia el exterior^{137,169}. Así mismo, en este punto se detectó un aumento en la expresión de Klotho (Figura 24 D). La expresión de esta proteína en las arterias ha sido descrita previamente, sin quedar aún muy claro cual es el tipo celular que lo genera⁹⁷. En nuestro caso encontramos expresión incluso en los controles, duplicándose en las nefrectomizadas a partir de las 12 semanas.

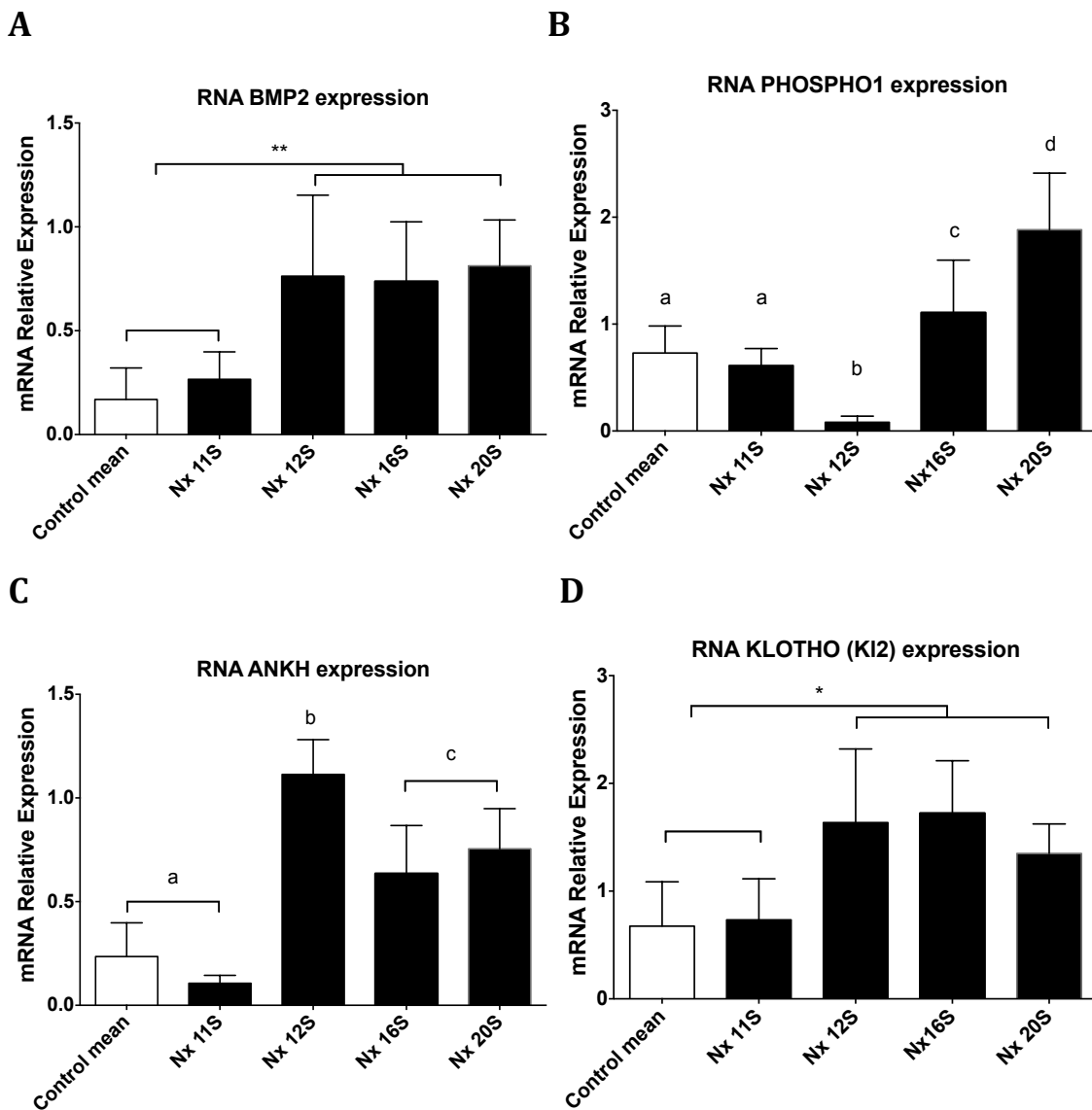


Figura 24: Expresión de ARN en aorta de animales control y nefrectomizados tras 11, 12 16 y 20 semanas tras la nefrectomía. (A) Expresión de BMP2. ANOVA $p < 0.0001$. Se detectó un

aumento significativo de la expresión en todos los grupos de Nx tras 12 semanas de la nefrectomía respecto a la media de los controles (mediante un test de Tukey). (B) Expresión de PHOSPHO1. Kurksal-Wallis $p < 0.001$. Se detectó una disminución significativa de la expresión en el grupo de Nx tras 12 semanas de la nefrectomía ($p < 0.001$, mediante un test de Mann-Whitney respecto al control), así como un aumento significativo de la expresión en el grupo de Nx tras 20 semanas de la nefrectomía ($p < 0.0001$, mediante un t-test respecto al control). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). (C) Expresión de ANKH. ANOVA $p < 0.0001$. Se detectó un aumento significativo de la expresión en todos los grupos de Nx tras 12 semanas de la nefrectomía respecto a la media de los controles (mediante un test de Tukey). Si bien a las 16 y a las 20 semanas tras la nefrectomía, se ve una disminución significativa y progresiva de la expresión del mismo, ANOVA $p < 0.05$. Diferentes letras implican diferencias significativa $p < 0.05$ (D) Expresión de Klotho (Kl2). ANOVA $p < 0.001$, se detectó un aumento significativo de la expresión en todos los grupos de Nx tras 12 semanas de la nefrectomía respecto a la media de los controles (mediante un test de Tukey).

Tras 16 semanas, la osteodiferenciación siguió avanzando, duplicándose la expresión de Runx2 (Figura 25 A) en el grupo de las nefrectomizadas, triplicándose a las 20 semanas, y confirmando el avance de la diferenciación fenotípica. Así mismo, se observó que las expresiones de los transportadores Na-dependientes de fosfato Pit1 y Pit2, se habían duplicado y que continuaría duplicada también a las 20 semanas en el caso de Pit2 (Figura 25 B, C), mientras que en Pit1 llegaría a triplicarse. Por otro lado, la citoquina TNF- α , también comenzó a sobreexpresarse en el grupo de las nefrectomizadas, alcanzando su punto máximo tras 20 semanas (Figura 25 C). Si bien las funciones de TNF- α son muy diversas, las principales son la de señalización celular, activación de la cascada inflamatoria y la inducción de apoptosis; también ha sido descrito como activador de la señalización Wnt y de la ruta osteogénica de BMP2-Runx2. En nuestro caso el aumento de TNF- α fue posterior al inicio de los cambios de expresión y la formación de los primeros depósitos de Ca/P, por lo que no parece que su papel sea como iniciador, si bien es cierto que quizá podría ser el responsable del descenso de Dkk1 para el rescate de la ruta de señalización Wnt.

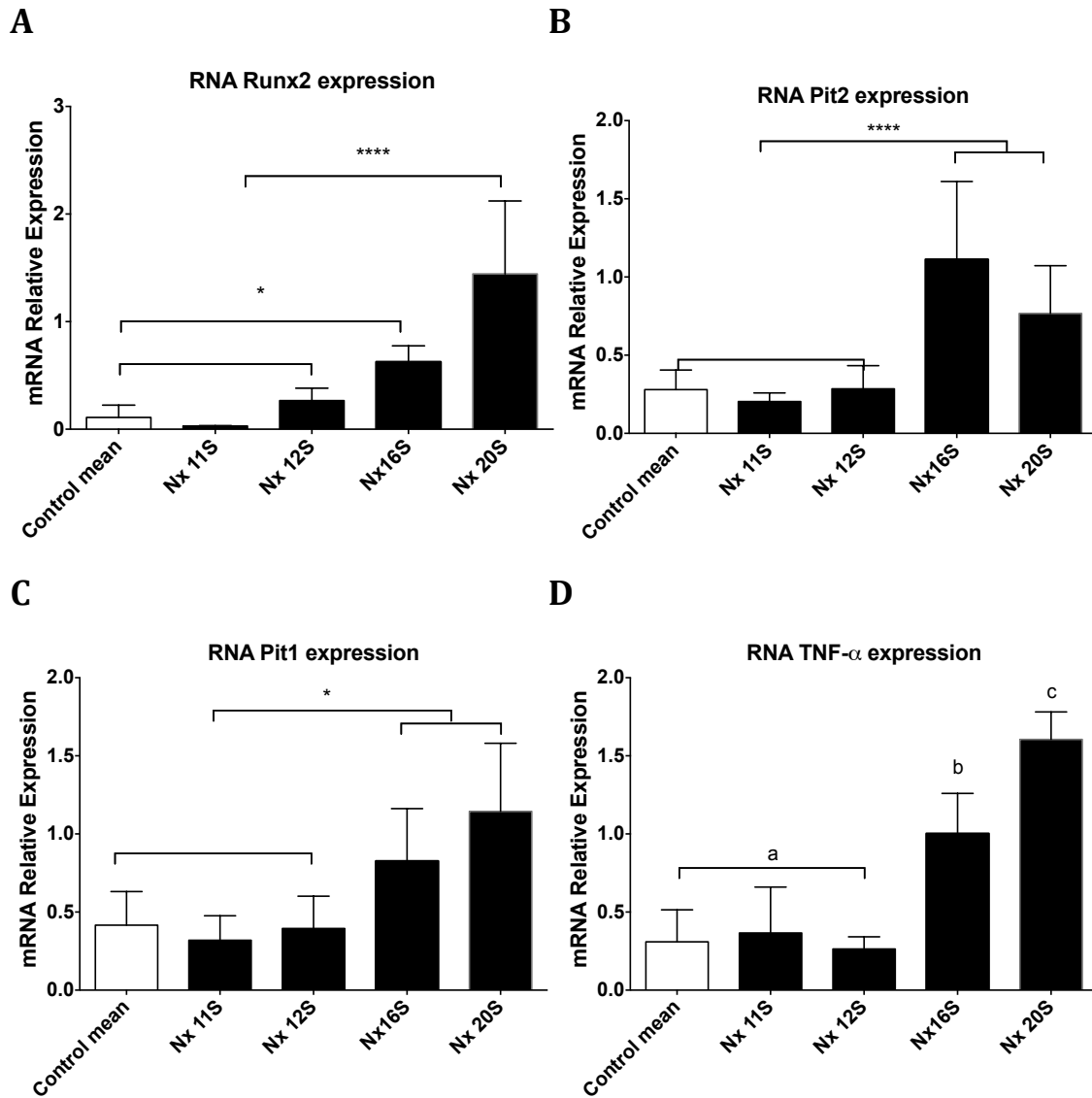


Figura 25: Expresión de ARN en aorta de animales control y nefrectomizados tras 11, 12 16 y 20 semanas tras la nefrectomía. (A) Expresión de Runx2. ANOVA $p < 0.0001$, se detectó un aumento significativo de la expresión en todos los grupos de Nx tras 16 semanas de la nefrectomía respecto a la media de los controles (mediante un test de Tukey). (B) Expresión de Pit2. Kruskal-Wallis $p < 0.0001$, se detectó un aumento significativo de la expresión en todos los grupos de Nx tras 16 semanas de la nefrectomía respecto a la media de los controles (mediante un test de Dunn). (C) Expresión de Pit1 Kruskal-Wallis $p < 0.0001$, se detectó un aumento significativo de la expresión en todos los grupos de Nx tras 16 semanas de la nefrectomía respecto a la media de los controles (mediante un test de Dunn). (D) Expresión de TNF- α ANOVA $p < 0.0001$, se detectó un aumento significativo de la expresión en todos los grupos de Nx tras 16 semanas de la nefrectomía respecto a la media de los controles (mediante un test de Tukey). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Finalmente, a las 20 semanas desde la nefrectomía, se observó una amplia gama de genes alterados, como el aumento de la expresión de PHOSPHO1 comentada anteriormente (Figura 24 C). En este punto se detectó el avance de la osteodiferenciación, produciéndose un aumento de la proteína biomineralizante OPN (Figura 26 A), la cual une con gran afinidad moléculas de Ca/P, Ca/CO₃²⁻... De la misma manera, se encontró aumentada ENPP1 (Figura 26 B), implicada en el aumento de la producción del inhibidor de la calcificación PPI, indicando también un cambio generalizado hacia un fenotipo osteocondrocítico. Por otro lado, debido a que en ambientes con pH ácido la formación de precipitados y cristales de Ca/P se ve ralentizada o incluso abolida, decidimos estudiar posibles cambios de expresión en la familia de las anhidrasas carbónicas. En primer lugar, no observamos expresión de las ACs I, Va, VI, VII, X, XII, XIV y XV. En las que sí se observó expresión, no hubo cambios en ninguna de las semanas estudiadas (Figura 27), excepto en la AC II, la cual apareció sobreexpresada a las 20 semanas (Figura 26 C). Finalmente, también estudiamos la expresión de Homeobox A10, es un factor de transcripción de la embriogénesis y el desarrollo que participa, por ejemplo, en la osteogénesis, ya que es activado por BMP2, y a su vez activa la expresión de Runx2. Si bien su expresión fue casi inexistente en los grupos control, a las 20 semanas se observa una gran sobreexpresión del mismo (Figura 26 D), pudiendo confirmar su participación en la calcificación. A pesar de esto, no parece que su papel en la ruta BMP2-Runx2 sea básico o al menos inicial, dado que su expresión aparece una vez que ambos genes están ya sobreexpresados.

Hasta ahora se han comentado los genes en los que se observó un cambio en la expresión durante el experimento, pero no fueron los únicos estudiados. En la figura 27 se muestran las gráficas de los genes en los que no se encontraron cambios en la expresión. Curiosamente, no se observó aumentada la expresión del osteogen Msx2 a pesar de que esta ha sido descrita por otros grupos tan *in vivo*, como *in vitro*¹⁶⁷. Por otro lado, estos hallazgos fueron descritos en un modelo animal de hiperlipidemia y DT2, no en condiciones urémicas (los hallazgos *in vitro* se obvian debido al uso de concentraciones aberrantes de Pi). Otros de los genes en los que no se detectaron cambios de expresión, fue el potente inhibidor de la calcificación MGP, la OPG (otro inhibidor de la calcificación), las Anexinas 2 y 5

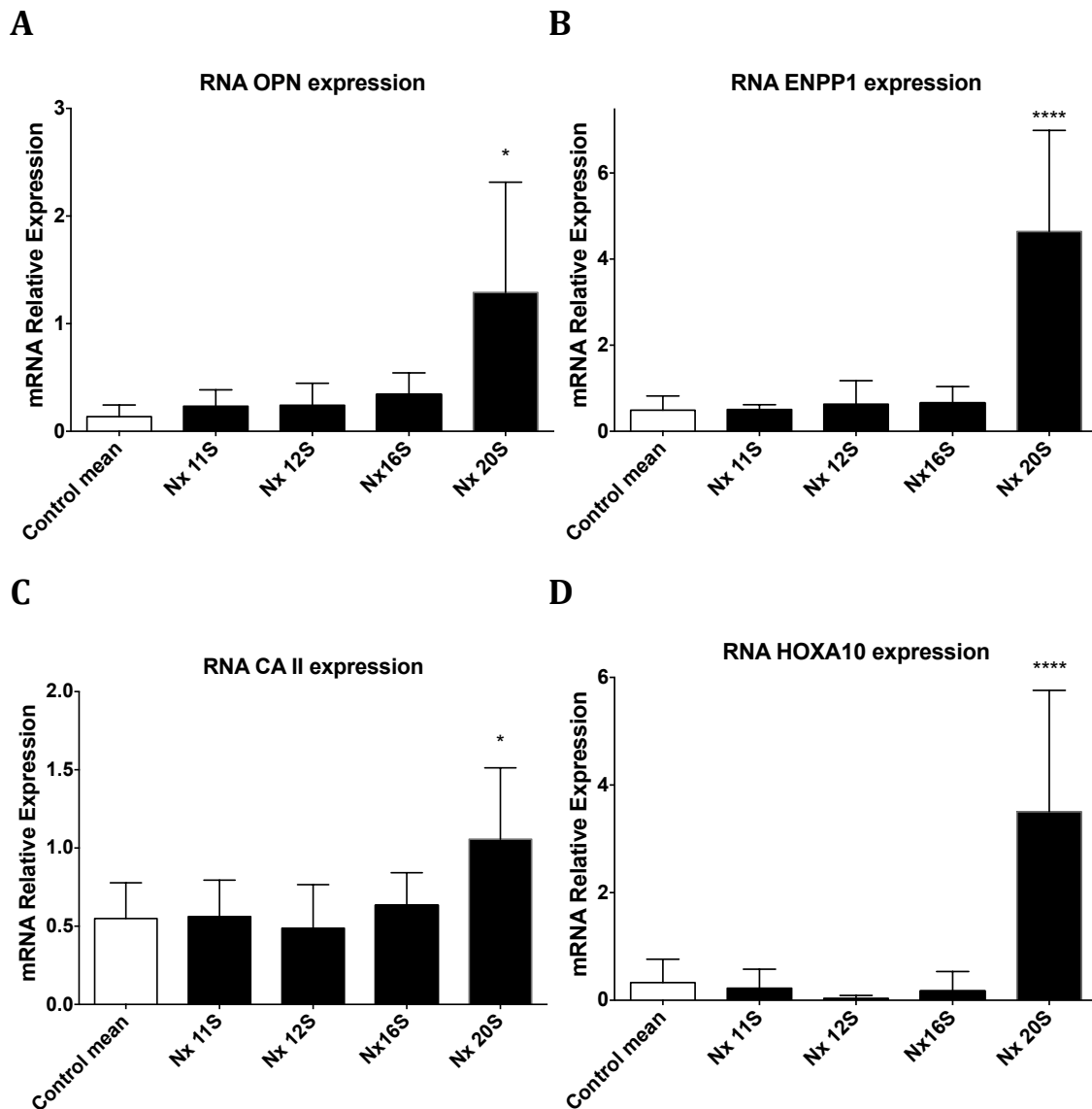
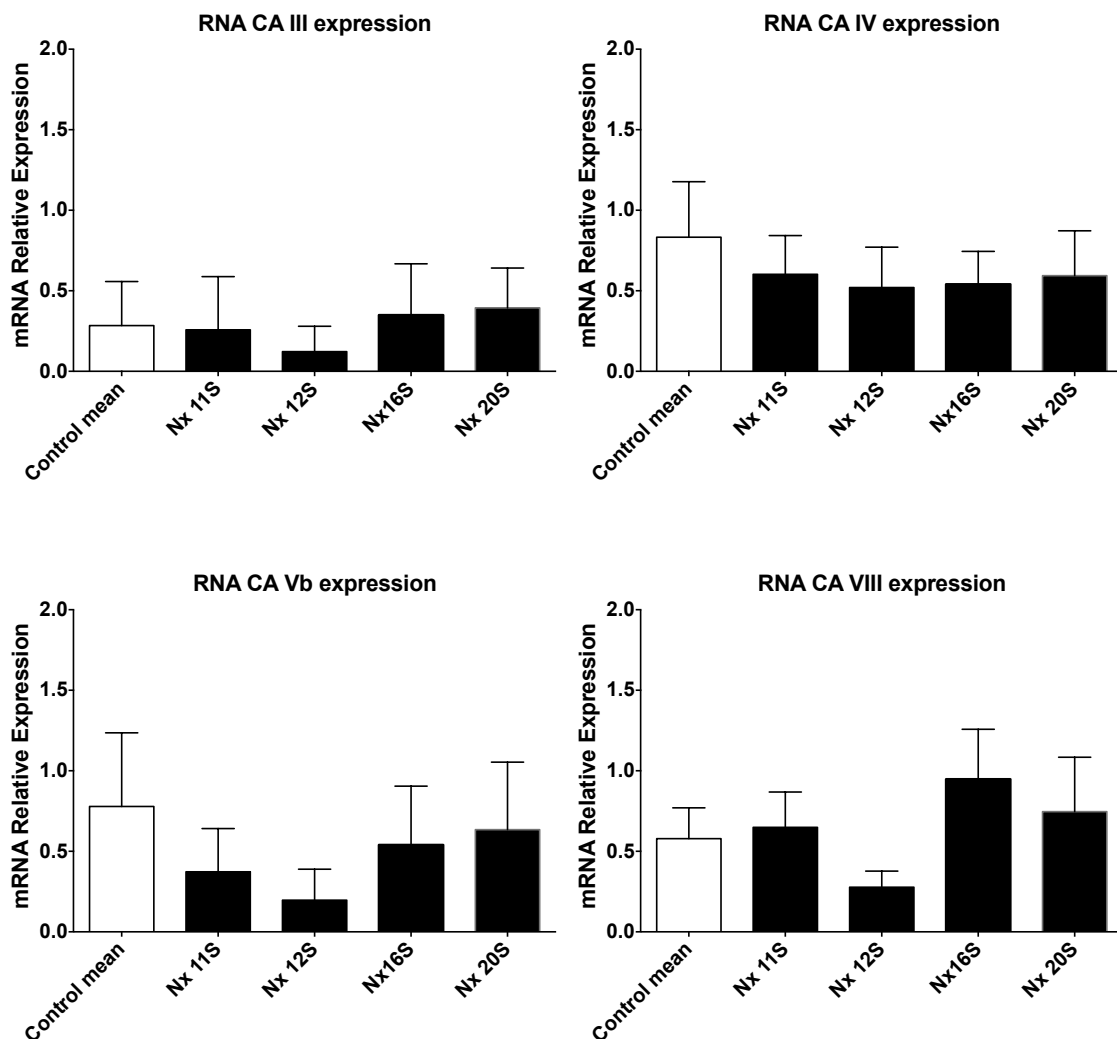


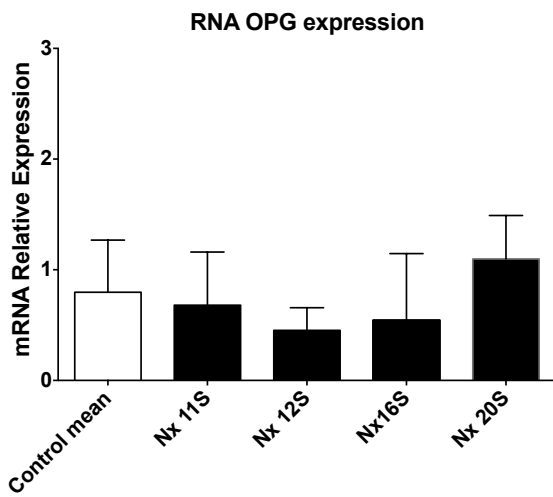
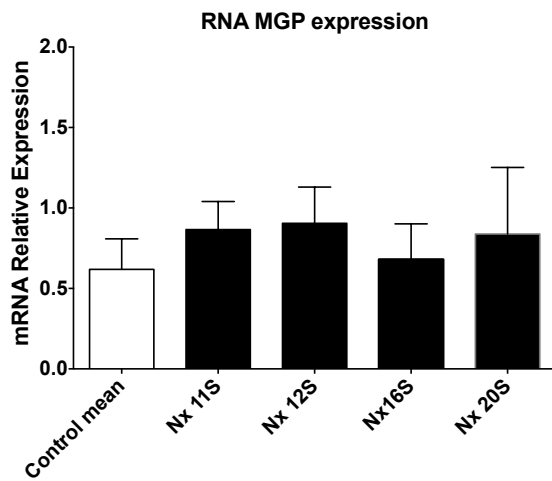
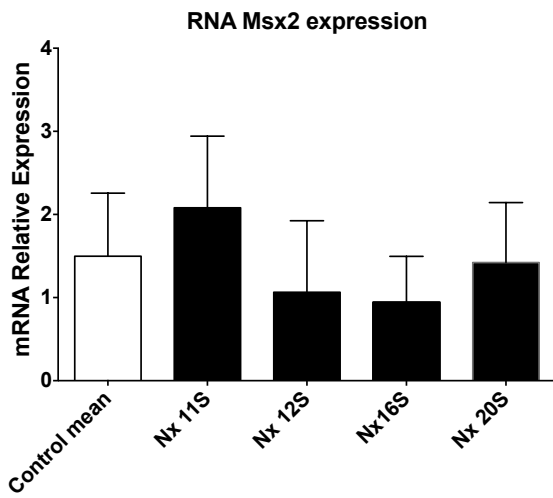
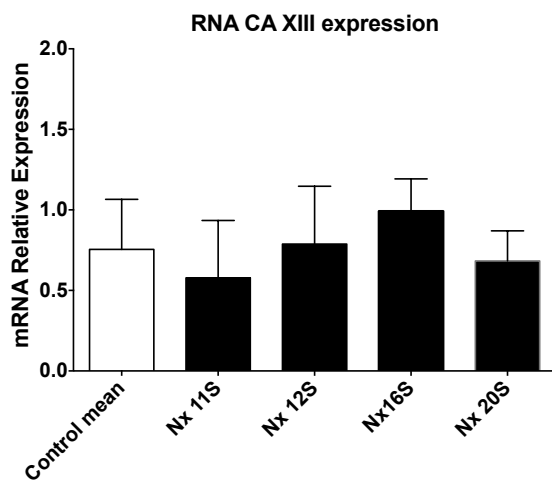
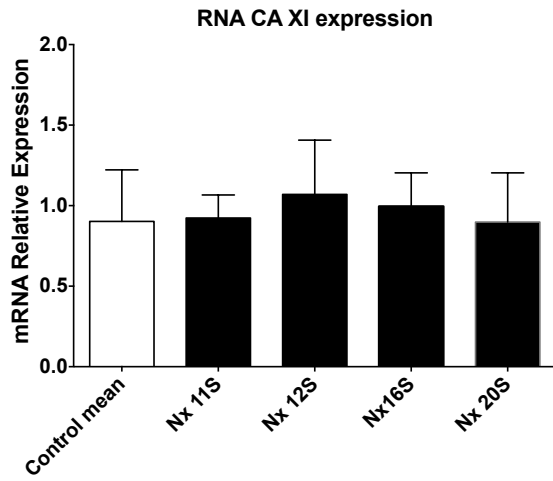
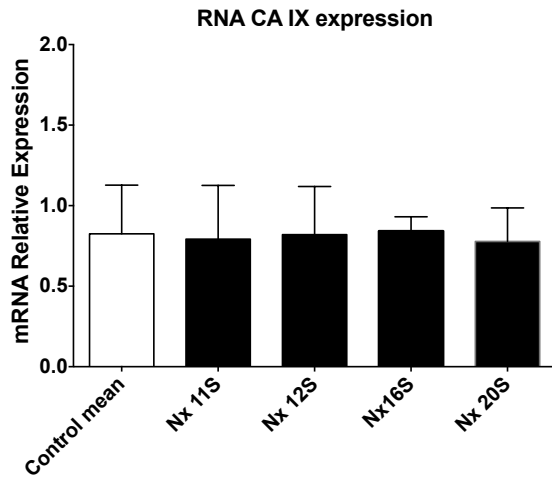
Figura 26: Expresión de ARN en aorta de animales control y nefrectomizados tras 11, 12 16 y 20 semanas tras la nefrectomía. (A) Expresión de OPN. ANOVA $p < 0.01$, (B) Expresión de ENPP1. ANOVA $p < 0.0001$. (C) Expresión de CAII. ANOVA $p < 0.05$. En los tres casos se detectó un aumento significativo de la expresión en el grupo de Nx tras 20 semanas de la nefrectomía respecto a la media de los controles (mediante un test de Tukey). (D) Expresión de CAII. Kruskal-Wallis $p < 0.05$, se detectó un aumento significativo de la expresión en el grupo de Nx tras 20 semanas de la nefrectomía respecto a la media de los controles (mediante un test de Dunn).

(pudiendo indicar la ausencia de activación de rutas apoptóticas), los receptores de Activina II y PTH (los cuales a pesar de no estar alterada su expresión, si que se expresan en la aortas) y finalmente la ectonucleosidasa CD39, la cual hidroliza el ATP en una molécula de AMP y dos Pi.

Está establecido que en las VSMC no se produce Fetuina A, la cual es un potente inhibidor de la calcificación, sino que es sintetizada por el hígado y

transportada por la sangre hasta los tejidos¹⁷⁰, y en concreto en las VSMC, incorporada y reciclada por medio de exosomas¹⁷¹. En nuestro caso, hemos encontrado expresión de Fetuina A en las arterias de las ratas nefrectomizadas (excepto tras 11 semanas de la nefrectomía) (Figura 27), pero utilizando grandes cantidades de cDNA (1.5 µg), y con 45 ciclos de PCR en tiempo real (apareciendo en el ciclo 40 aproximadamente), lo que indica que a pesar de que probablemente exista una pequeña expresión de la misma, ésta es poco significativa frente a la que llega a través del flujo sanguíneo.





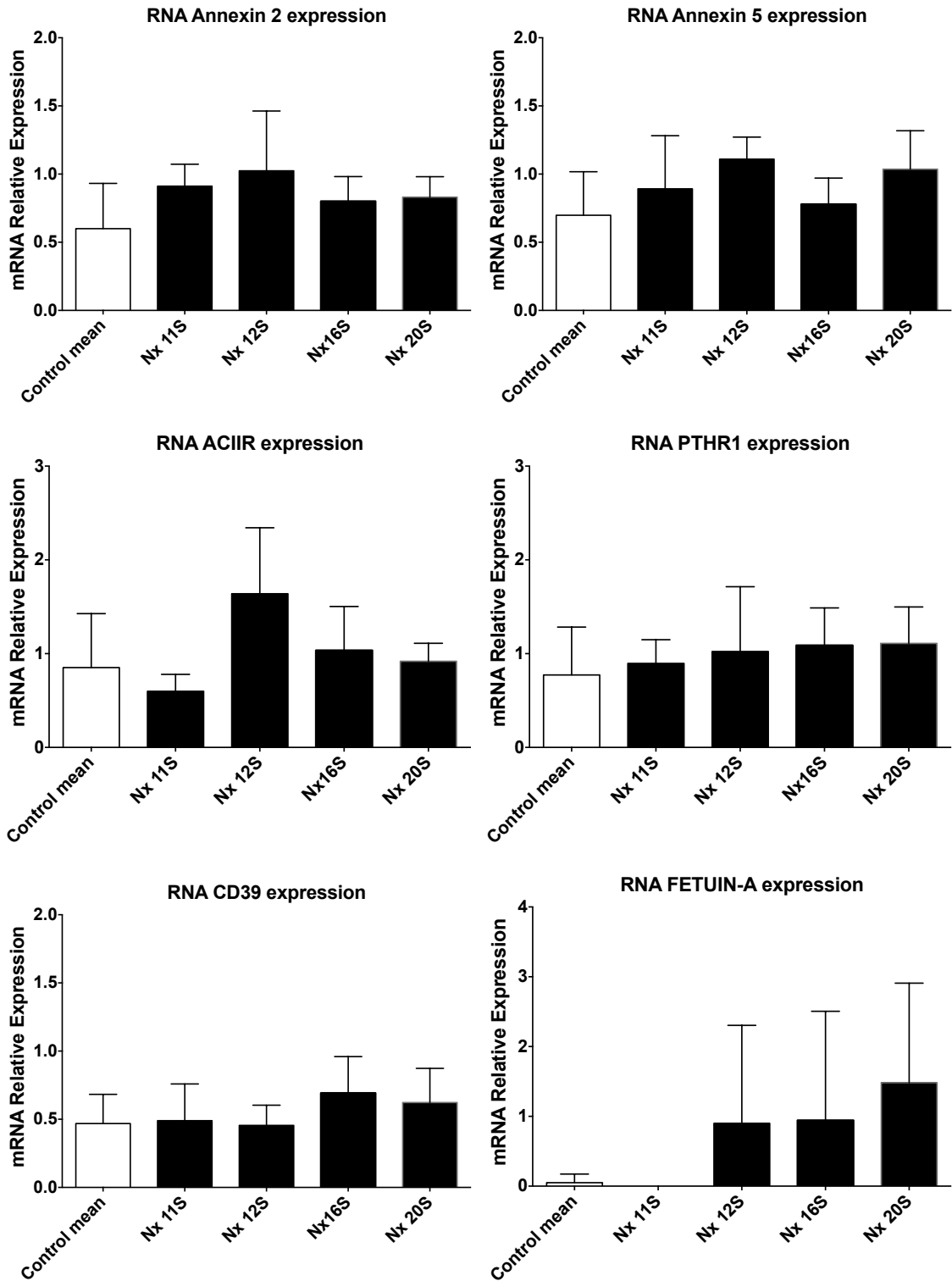


Figura 27: Expresión de ARN en aorta de animales control y nefrectomizados tras 11, 12 16 y 20 semanas tras la nefrectomía. Ningún cambio significativo fue detectado en la expresión de ARN de estos genes, en ningún punto temporal.

2.4. DETECCIÓN Y LOCALIZACIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNIHISTOQUÍMICA.

Para confirmar que los cambios en la expresión de ARN conllevaban un aumento en la expresión de proteínas, así como para localizar su expresión en la pared de la aorta, llevamos a cabo estudios de IHC para proteínas de especial interés. Para descartar una unión inespecífica de los anticuerpos secundarios, se llevaron a cabo varias IHC sin anticuerpo primario (Figura 28: GOAT y RAT)

En el caso de la TNAP, llevamos a cabo IHC de segmentos de aorta de animales control y nefrectomizados a las 11 semanas, dado que fue el primer momento en ser detectada su sobreexpresión. Las imágenes de la Figura 28 A muestran como el límite de la túnica adventicia y la media (así como ciertas zonas que se corresponden con VSMC), está mucho más teñido en las Nx que en las ratas control, si bien en éstas también se detecta presencia de TNAP, dado que las aortas son un lugar habitual de expresión, sobre todo en el límite señalado.

Por otro lado, la unión en el caso de BMP2 fue diferente como se puede observar en la Figura 28 B, ya que no se observó casi en las aortas controles, mientras que se apreciaron focos diseminados por toda la media en los cortes tisulares procedentes de Nx tras semanas.

En el caso del Klotho se utilizaron tres anticuerpos diferentes, para diferentes epíttopos de la proteína Klotho (KM2076 para Kl1 y KM2119 para Kl2) y otro de la casa SantaCruz hecho frente a una parte recombinante de klotho pero de la que la casa comercial no comenta su localización. Con el anticuerpo KM2076 no se observó ninguna tinción, mientras que con los otros dos sí. Así mismo, los cebadores de PCR en tiempo real utilizados para detectar Klotho habían sido diseñados en la zona del gen donde se codifica Kl2, por lo que los resultados obtenidos con KM2119 estarían de acuerdo con los resultados de expresión del ARN. También estudiamos las expresiones en cortes de aortas de ratas NX de 20 semanas y de sus controles, confirmando también los resultados de cuantificación de ARN al observarse la expresión proteica por toda la media (Figura 28 C1 Y C2).

Finalmente, se llevó a cabo la confirmación de los interesantes resultados obtenidos en la expresión de PHOSPHO1, desapareciendo las zonas de tinción en los cortes procedentes de ratas tras 12 semanas de la nefrectomía, mientras que sí que se observaban algunas zonas de marcaje en las control (Figura 28 D).

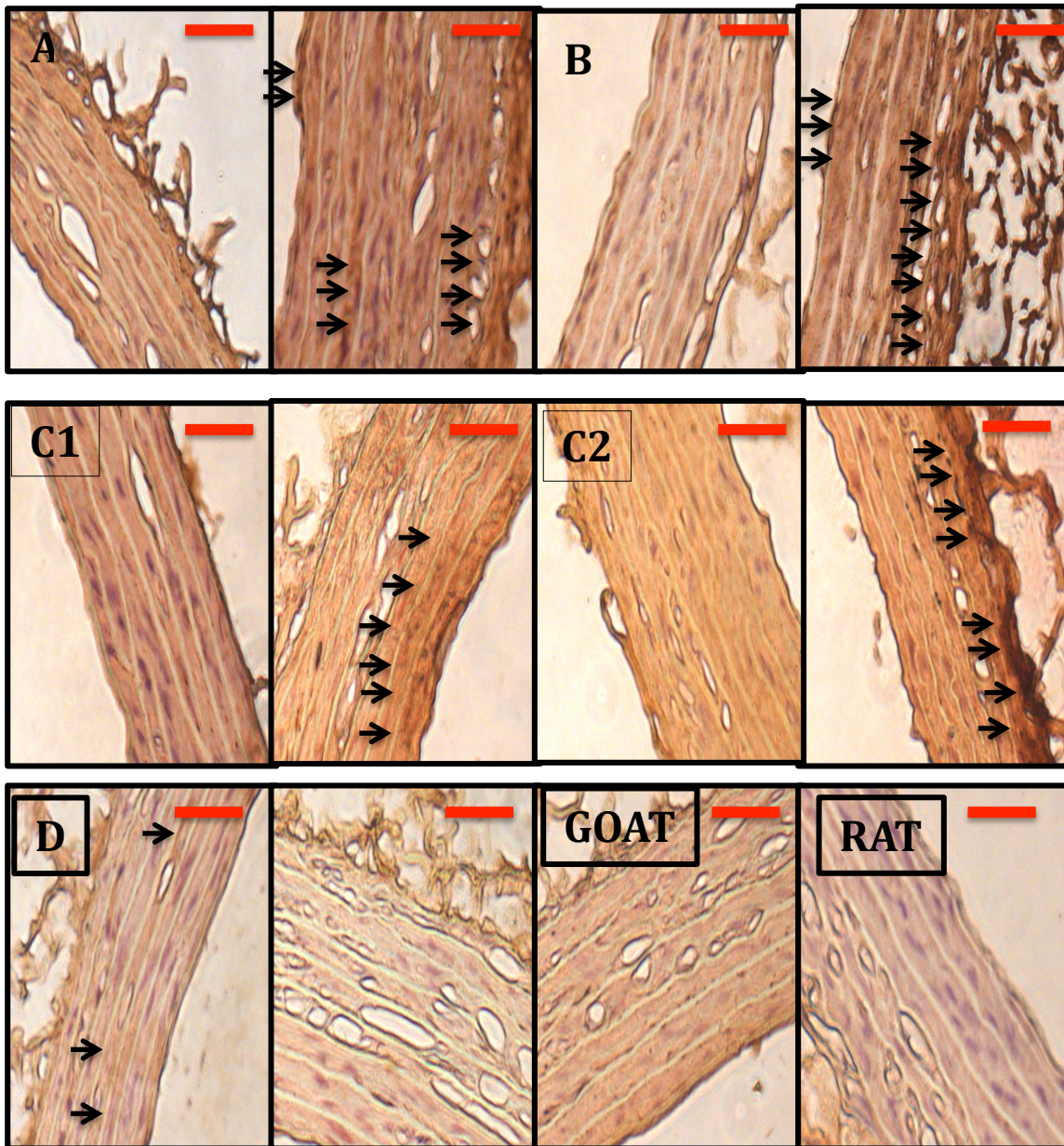


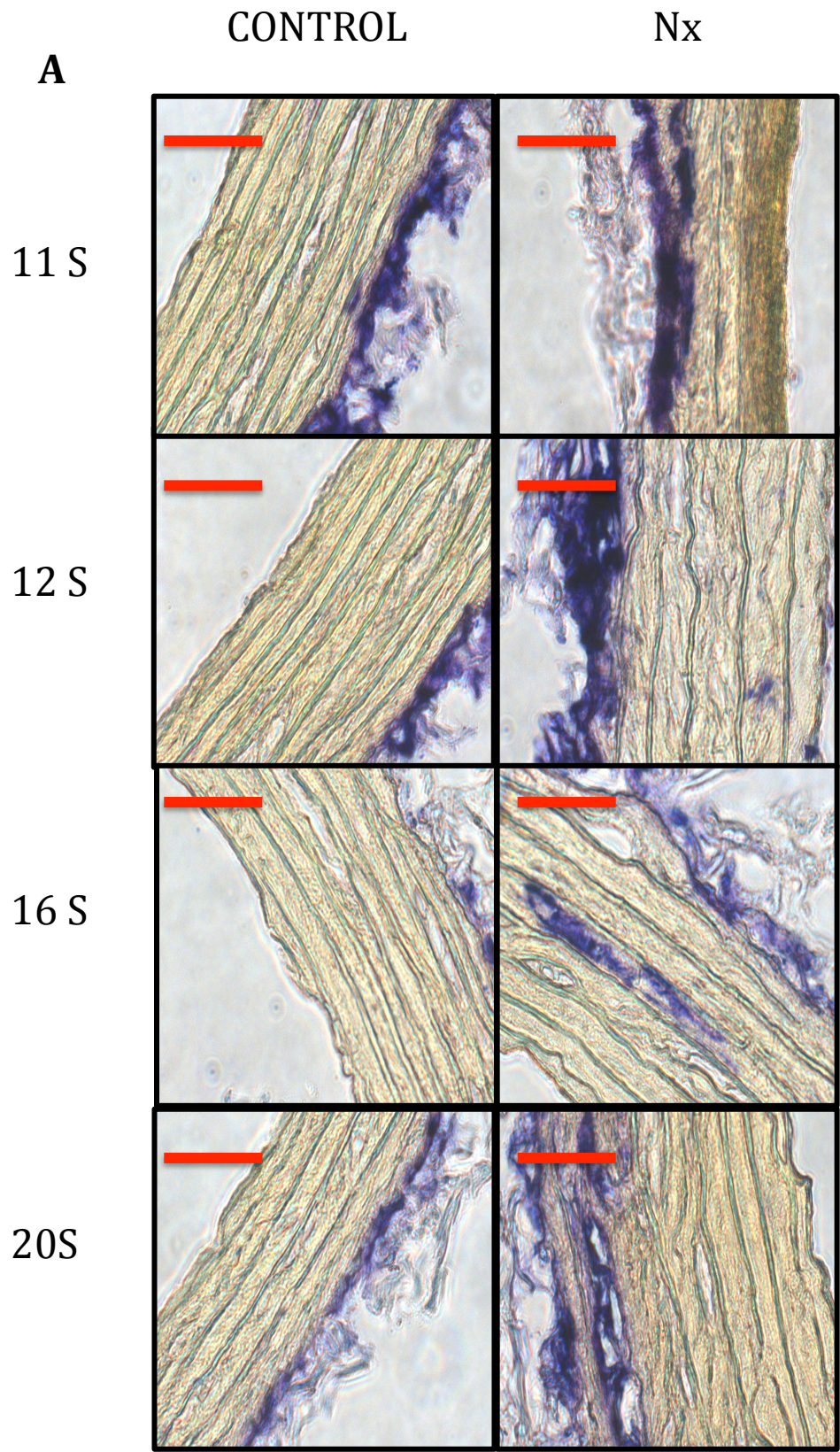
Figura 28: **IHC aórtica**. De la (A) a la (D), a la izquierda se encuentra el control y a la derecha la nefrectomizada. (A) TNAP tras 11 semanas de la nefrectomía, se observa una mayor tinción en el límite entre la adventicia y la media, así como en la zona celular de la media. (B) BMP2 tras 12 semanas de la nefrectomía, se observa un aumento muy marcado de la coloración tanto en la media como en la adventicia. (C1) Klotho (anticuerpo SC-22220) tras 20 semanas de la nefrectomía, se observa una mayor coloración en la zona celular de la media. (C2) Klotho (K12, anticuerpo KM2119) tras 20 semanas de la nefrectomía, se observa una mayor coloración tanto de la íntima como de la

media. (D) PHOSPHO1 tras 12 semanas de la nefrectomía, la leve coloración encontrada en el control, no aparece en la nefrectomizada, confirmando la disminución de su expresión. GOAT y RAT: Imágenes obtenidas al utilizar solo el anticuerpo secundario de cabra (GOAT) y el de rata (RAT), sin anticuerpo primario. En el caso del secundario de cabra existe un mínimo de unión inespecífica, mientras que en el de rata no se observa nada de ruido de fondo significativo. . Las barras de se corresponden con 50 μ m.

2.5. TINCIONES AÓRTICAS

2.5.1. ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA

Con el fin de confirmar no sólo la presencia de la TNAP, si no su actividad, se realizaron dos tinciones diferentes para la detección de la misma en cortes histológicos de las aortas: la tinción rápida con azul rápido RR (Figura 29 A) y el protocolo NBT/BCIP (Figura 29 B). Para comprobar los cambios a lo largo de todas las semanas, se realizaron tinciones del grupo control y el grupo nefrectomizado en todos los puntos temporales. Si bien la tinción con azul rápido no fue tan sensible como la de NBT/BCIP, ambas marcaron una actividad masiva en el límite entre la adventicia y la media, así como focos de color en la media, siendo más prevalentes en las capas más externas (Figura 29), y siguiendo el mismo patrón de aparición que el de la expresión de ARN (Figura 22 A) y proteína de TNAP (Figura 28 A).



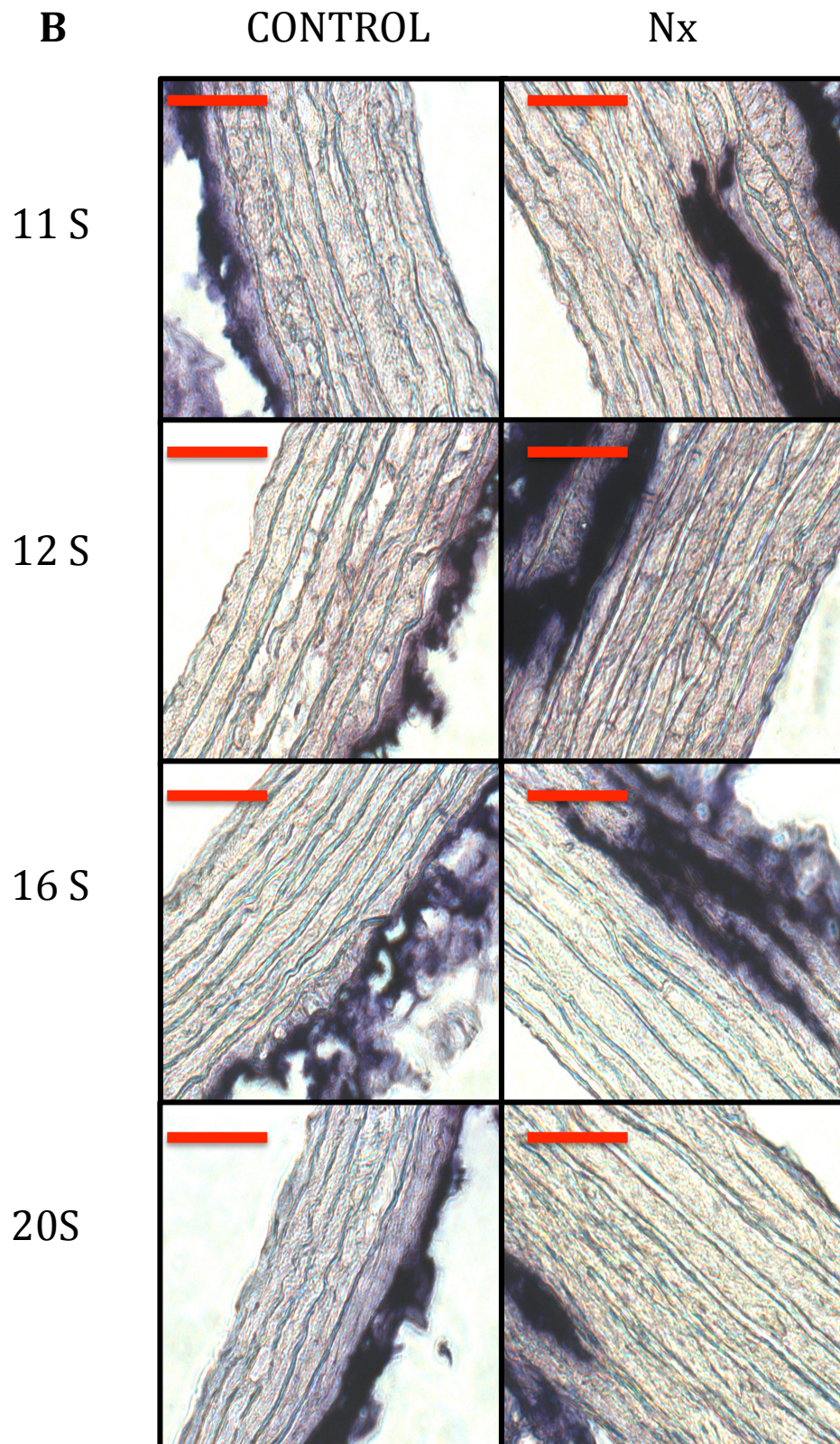


Figura 29: Tinciones para la detección de la actividad de TNAP. Tanto en (A) como en (B) la columna de la izquierda son los controles y la de la derecha las nefrectomizadas. Las filas se han ordenado por orden temporal siendo los de mas arriba los cortes 11 semanas tras la nefrectomia y la última los cortes tras 20 semanas desde la misma. (A) Azul rápido RR. (B) NBT/BCIP. Las barras de se corresponden con 50 μ m.

2.5.2. TINCIONES DE LOS DEPÓSITOS DE CALCIO Y FOSFATO

Por otro lado, tanto la tinción de rojo de alizarina (la cual tiñe el calcio) como la de von Kossa (que tiñe fosfato), se hicieron en todos los puntos temporales, con el fin de confirmar la ausencia de cristales de Ca/P masivos en la aorta hasta las 20 semanas . Según lo esperado, ninguna de las dos tinciones mostró tinción positiva en ningún segmento aórtico hasta 20 semanas tras de la nefrectomía, cuando se observó una tinción masiva en algunas ratas nefrectomizadas, confirmando lo observado por nuestro grupo y otros, y utilizando por lo tanto este punto como referencia de la calcificación más avanzada con la que generalmente se trabaja (Figura 30). Con estos resultados queda confirmada la idea de que los primeros depósitos que aparecen en la calcificación vascular (detectados primero por cuantificación de calcio aórtico y encontrados por microscopía electrónica después) lo hacen mucho antes de que puedan ser detectados por las tinciones tradicionales.

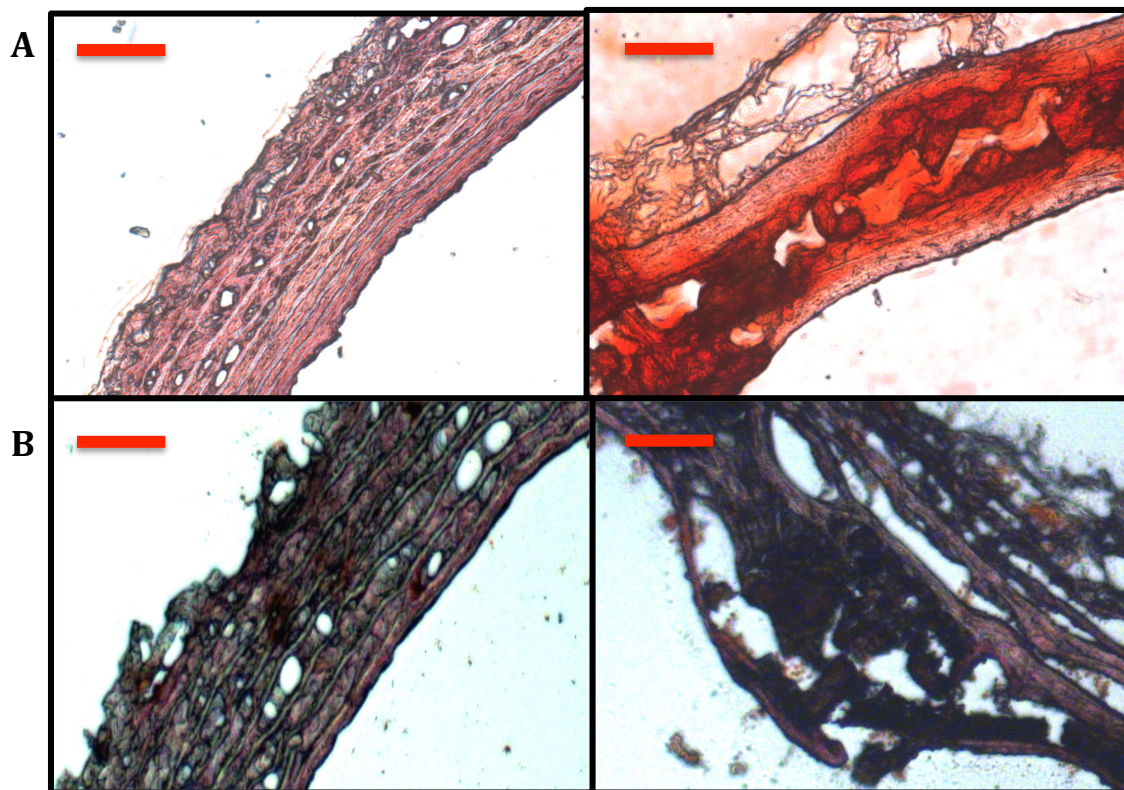


Figura 30: Tinción de rojo de alizarina (A) y von Kossa(B) aórticas. Aortas control a la izquierda y aortas de Nx tras 20 semanas de la nefrectomía a la derecha. Estas imágenes muestran el caso mas extremo de formación de cristales en la túnica media, alterando su estructura macroscópica completamente. Las barras de se corresponden con 50 μm .

2.6. BIOQUÍMICA SANGUÍNEA

Para evaluar el estado de factores circulantes sanguíneos de interés en la aparición y desarrollo de la CV, en los estadios más tempranos de la misma, llevamos a cabo varias cuantificaciones colorimétricas (Ca^{2+} , Pi, urea y ureatinina) de los plasmas sanguíneos y determinaciones inmunológicas mediante ELISA (TNF- α , PTH y FGF23) en plasmas sanguíneos, procedentes de animales controles y nefrectomizados de todos los puntos temporales estudiados.

Tanto la urea como la creatinina plasmáticas se encontraron aumentadas en todos los puntos temporales en el grupo de las nefrectomizadas respecto al control. Así mismo tanto los niveles de urea como los de creatinina presentaron una tendencia ascendente con el paso del tiempo en el plasma de los animales nefrectomizados (Figura 31), confirmando el avance de la ERC.

La colorimetría de Ca^{2+} y Pi se realizó el mismo día que se tomaron las muestras para eliminar la posibilidad de precipitaciones. Con el kit colorimétrico de Ca^{2+} no se detectó ningún cambio de la calcemia en el tiempo, ni entre grupo control y nefrectomizadas (Figura 32 A). Por otro lado, en el caso del Pi, en el último punto (tras 20 semanas), se observó un aumento significativo de la fosfatemia en el grupo de las ratas nefrectomizadas, coincidiendo este con el aumento que se produce en la enfermedad renal crónica conforme la enfermedad avanza (Figura 32 B).

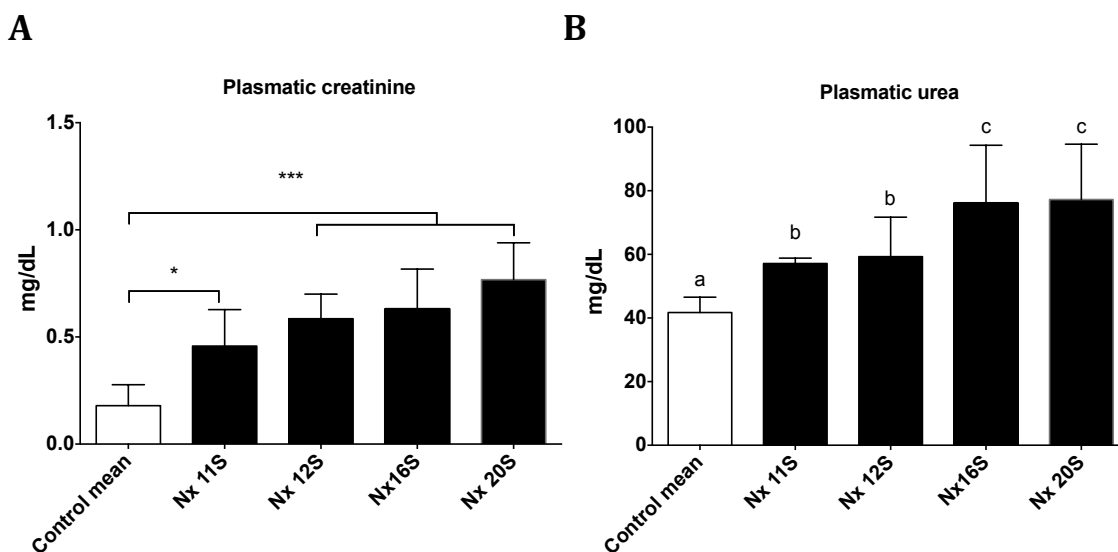


Figura 31: Creatinina (A) y urea (B) en plasma sanguíneo. ANOVA $p < 0.0001$, se detecto un

aumento significativo de los niveles de ambos parámetros en el plasma de los animales nefrectomizados (en todos los casos) respecto a los control (mediante un test de Tukey). Diferentes letras implican diferencias significativas ($p < 0.05$). Tanto en la (A) como en (B) se observa además un aumento progresivo de los niveles plasmáticos de ambos parámetros, correspondientes con el avance de la ERC.

se observó un aumento significativo de la fosfatemia en el grupo de las nefrectomizadas, coincidiendo este con el aumento que se produce en la enfermedad renal crónica conforme la enfermedad avanza (Figura 32 B).

La detección de FGF23 por ELISA reveló resultados muy interesantes, con un aumento de esta fosfatona en todas los grupos de ratas nefrectomizadas respecto a su control y aumentando de forma significativa también entre grupos de nefrectomizadas con el avance del experimento (Figura 33 A). Si bien el grupo de las ratas nefrectomizadas estuvo alimentado con una dieta alta en fosfato,

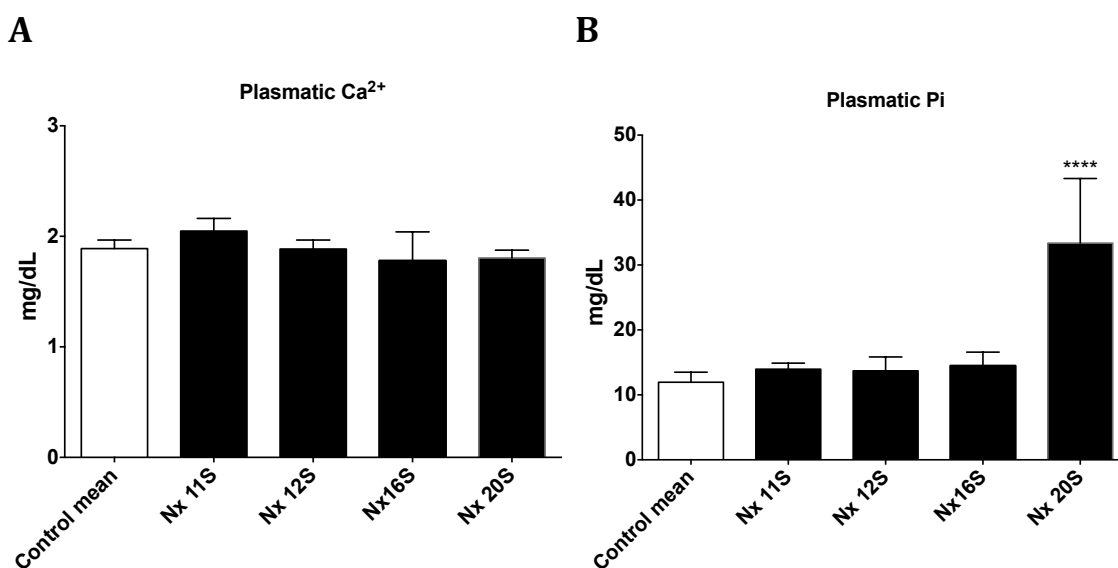


Figura 32: (A) Concentración de calcio iónico en plasma sanguíneo. No se observan cambios significativos en un test Kruskal-Wallis. (B) Concentración de Pi en plasma sanguíneo, Kruskal-Wallis $p < 0.05$. En el grupo de Nx tras 20 semanas de la nefrectomía se observa un aumento significativo de los niveles de Pi plasmático con un test de Dunn ($p < 0.05$).

pudiendo existir un aumento del FGF23 como consecuencia de esto, el hecho de que éste fuera aumentando con el tiempo, no hace más que indicar que a medida que avanza la enfermedad, los niveles de FGF23 también lo hacen, posiblemente forzando a las nefronas funcionales a hiperfiltrar el Pi acumulado como

consecuencia de la pérdida de funcionalidad renal. Por otro lado, los resultados de ELISA de PTH plasmática no reveló cambios en los primeros puntos temporales, apareciendo un aumento de la concentración de esta hormona sólo tras 20 semanas tras la nefrectomía (Figura 33 B). Este aumento coincide con la detección del aumento de Pi en sangre, estando ambos resultados probablemente relacionados.

Finalmente, la detección por ELISA de los niveles circulantes de la citoquina TNF- α no mostró ningún cambio en ninguno de los puntos temporales (Figura 34 A) ni en ninguna de las condiciones, por lo que aparentemente ésta no tiene un papel desencadenante en la CVM, dado que ni su producción en la aorta (Figura 24 D) ni los niveles circulantes, se encontraron aumentados antes o al mismo tiempo que los primeros cambios procalcificantes. Tampoco se observaron cambios del potente inhibidor de la formación de hidroxiapatita PPI, en el plasma sanguíneo (Figura 34 B), lo cual es comprensible, dado las drásticas consecuencias que implicarían un aumento o disminución de los mismos.

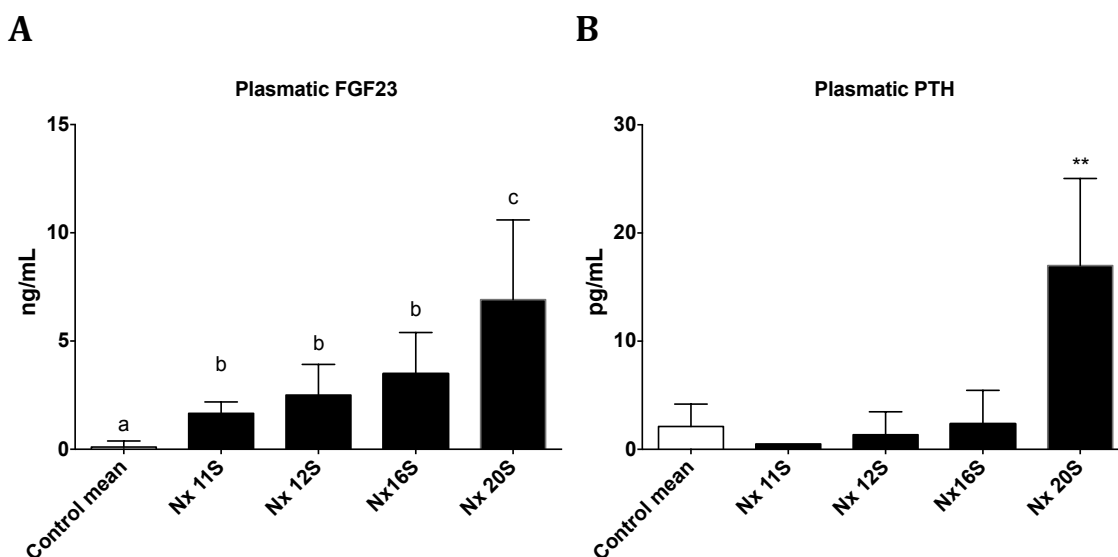
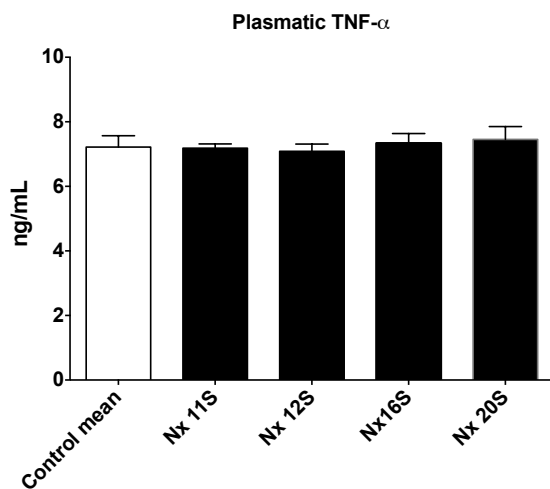


Figura 33: (A) Concentración de FGF23 en plasma sanguíneo, Kruskal-Wallis $p < 0.0001$. Los niveles de FGF23 circulante presentan un aumento significativo en todos los casos en los animales nefrectomizados respecto al control con un test de Dunn ($p < 0.05$), además, este aumento progresa ascendentemente en el tiempo. (B) PTH circulante, Kruskal-Wallis $p < 0.01$. En el grupo de Nx tras 20 semanas desde la nefrectomía se observa un aumento significativo con un test de Dunn ($p < 0.05$).

A



B

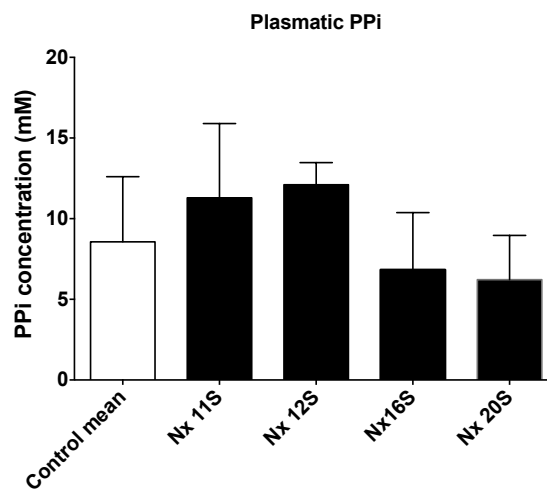


Figura 34: TNF- α y PPI plasmáticos. No se observaron diferencias significativas con un test ANOVA.

A continuación se añade un cuadro con los resultados obtenidos en los diferentes puntos temporales analizados.

| | Tinciones aórticas | PCR Real Time | IHC | Plasma | SEM/ FSEM | Ca ²⁺ aórtico |
|-------------|---|---|---|--------------------------------------|-----------|--------------------------|
| 11 semanas | -Azul rápido RR -NBT/ BCIP | -Dkk1 -TNAP | -TNAP | -Urea, crea -FGF23 | - | - |
| 12 semanas | -Azul rápido RR -NBT/ BCIP | -Dkk1 -TNAP -BMP2 -PHOSPHO1↓ -ANKH -KLOTHO (K12) | -TNAP -BMP2 -PHOSPHO1↓ -KLOTHO | -Urea, crea -FGF23 | + | + |
| 16 semanas | -Azul rápido RR -NBT/ BCIP | -Dkk1 -TNAP5 -BMP2 -PHOSPHO1↑ -ANKH -KLOTHO (K12) -Runx2 -Pi1 -Pit2 -TNF-α | -TNAP -BMP2 -KLOTHO | -Urea, crea -FGF23 | + | + |
| 20 semanas | -Azul rápido RR -NBT/ BCIP -Rojo de alizarina -von Kossa | -Dkk1 -TNAP -BMP2 -PHOSPHO1 -ANKH -KLOTHO (K12) -Runx2 -Pi1 -Pit2 -TNF-α -OPN -ENPP1 -CAII -HOXA10 | -TNAP -BMP2 -KLOTHO | -Urea, crea -FGF23 -Pi -PTH | + | + |
| Sin cambios | | -CD39 -PTHR1 -ACIIR -Anexina 2 y 5 -OPG -MGP -Msx2 -CA III, IV, Vb, VIII, IX, XI, XIII | | -TNF-α -Ca ²⁺ -PPi | | -PPi aórtico |

3. SOBRE LOS ESTUDIOS DE TRANSPORTE DE ^{32}P EN VSMC.

La existencia de un componente Na-independiente en el transporte de Pi de las VSMC fue descrito hace unos años¹⁵⁶, si bien poco se ha avanzado en la caracterización del mismo, faltando aún por identificar él o los transportadores responsables de dicho componente. Por ello, decidimos llevar a cabo una caracterización exhaustiva del transporte Na-independiente, referenciándolo siempre al transporte total, y calculando la parte Na-dependiente por la resta del Na-independiente respecto al total.

3.1. CINÉTICA DEL TRANSPORTE Na-DEPENDIENTE y Na-INDEPENDIENTE de Pi EN VSMC.

En primer lugar como control, se llevaron a cabo cinéticas de saturación de transporte para confirmar los resultados de la literatura¹⁵⁶. Para ello, medimos el transporte de fosfato de las VSMC en presencia de 8 concentraciones diferentes de fosfato en el medio de transporte (0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 y 5 mM). Estas cinéticas se llevaron a cabo en presencia de sodio (Na-dependiente) y de colina (Na-independiente). Los resultados obtenidos de V_{\max} y K_m fueron similares a los previamente publicados, con una K_m de 0.15 mM en el Na-dependiente y de 0.16 para el Na-independiente. Así mismo la V_{\max} fue 440 pmol/mg prot min en el Na-dependiente y V_{\max} : 85 pmol/mg prot min en el Na-independiente (Figura 35), confirmándose así las características cinéticas del transporte Na-independiente de las VSMC.

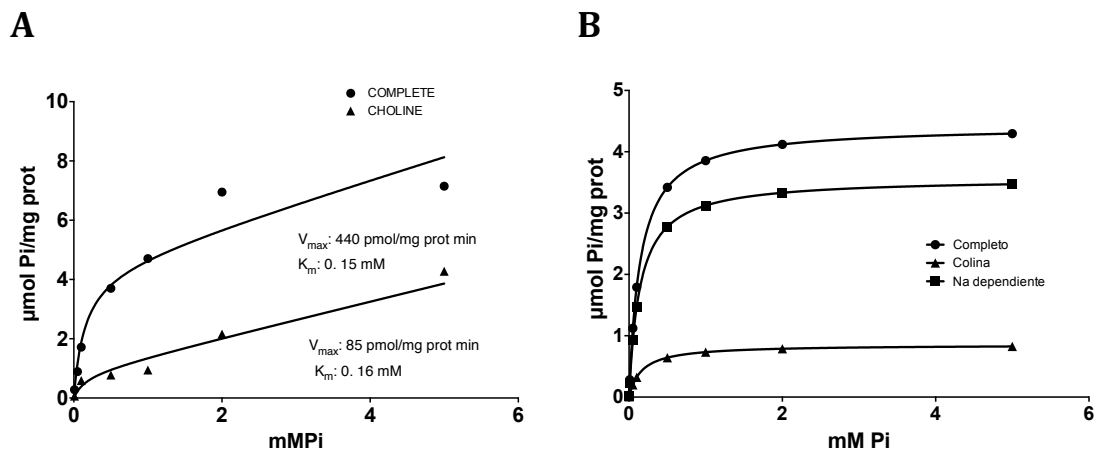


Figura 35: (A) Cinética de Michaelis-Menten para el transporte de Pi en presencia de sodio (complete, V_{max} : 440 pmol/mg prot min; K_m de 0.15 mM) y en ausencia del mismo (colina, V_{max} : 85 pmol/mg prot min; K_m de 0.16 mM). (B) Cinéticas teóricas calculadas a partir de la ecuación $V = [V_{max} * S / (K_m + S)] + (K_d + S)$ con la V_{max} y K_m obtenidas previamente y para cada concentración. Para el cálculo del componente Na-dependiente se restó el Na-independiente (transporte con colina) al transporte total en presencia de sodio.

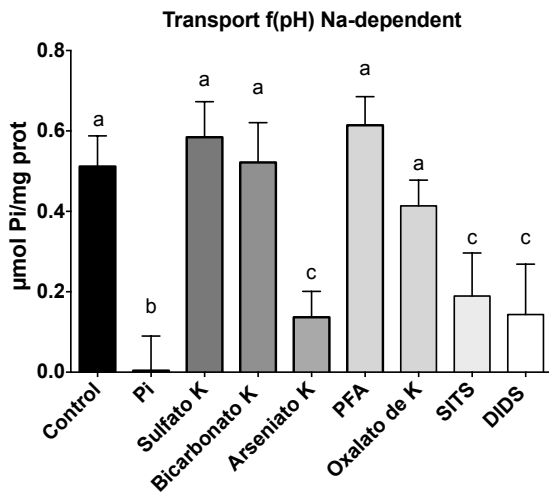
3.2. ESTUDIOS DE INHIBICIÓN DEL TRANSPORTE DE Pi en VSMC

Con el fin de determinar si el transportador/es responsable/s del componente Na-independiente del transporte de Pi en las VSMC, se inhibía con alguna moléculas similar al fosfato, se cuantifico el transporte en presencia y ausencia de Na, con varios posibles inhibidores, sobre el transporte de 50 μ M de Pi, utilizando además 5mM de Pi como inhibidor que muestre el nivel máximo de inhibición. Las concentraciones utilizadas fueron de 10 mM para el bicarbonato, sulfato, oxalato y arseniato, todos de potasio para no introducir moléculas de sodio en el transporte Na-independiente, así como PFA (inhibidor de los transportadores NaPiII), si bien en este caso se tuvo que utilizar el PFA de sodio, dado que no se comercializa como ningún otro catión como sal ni como ácido. Así mismo, se probaron los inhibidores del cotransporte de cloro/bicarbonato SITS y DIDS con una concentración de 100 μ M. En el caso del transporte Na-dependiente, se confirmó la escasa capacidad inhibidora del PFA sobre los transportadores NaPi tipo III (teniendo mayor capacidad de inhibición en NaPi II), que son los principales encargados del transporte de Pi en presencia de sodio, al no mostrar en este caso inhibición significativa. Por otro lado, sí que se detectó una inhibición drástica del componente Na-dependiente en presencia de arseniato de potasio. Como hallazgo novedoso referente al transporte Na-dependiente (y por lo tanto de Pit1 y/o Pit2), se observó que al utilizar tanto SIDS como DITS, este componente se inhibió de forma significativa. Hasta la fecha nadie había probado estas moléculas como inhibidores de la familia SLC20, por lo que este dato se suma a la caracterización ya realizada hasta la fecha del transporte de Pi llevado a cabo por Pit1 y Pit2 (Figura 36 A).

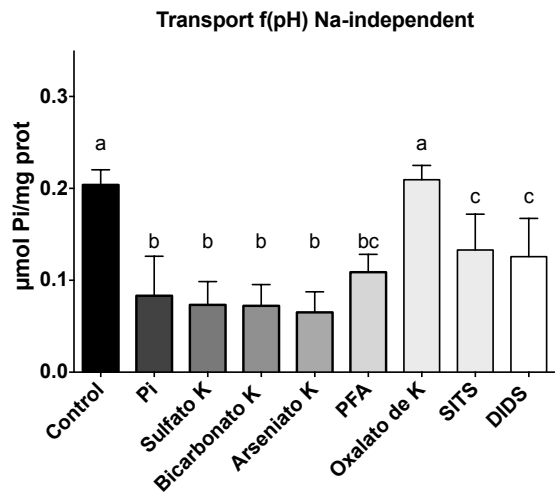
Por otro lado, en el caso del transporte de Pi independiente a la presencia de sodio, se encontraron inhibiciones significativas con todas las moléculas

estudiadas excepto con oxalato, existiendo una fuerte inhibición con sulfato, bicarbonato, arseniato y PFA, y una inhibición leve por parte de SITS y DIDS (Figura 36 B). Los datos de la concentración inhibidora media (IC_{50}) y las constantes de inhibición (K_i), obtenidas a partir de las curvas de inhibición generadas por regresión no lineal, se encuentran en la figura 36.

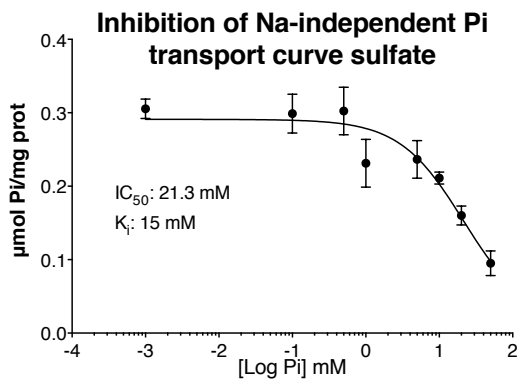
A



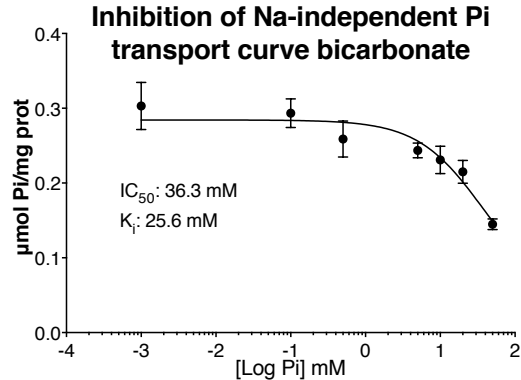
B



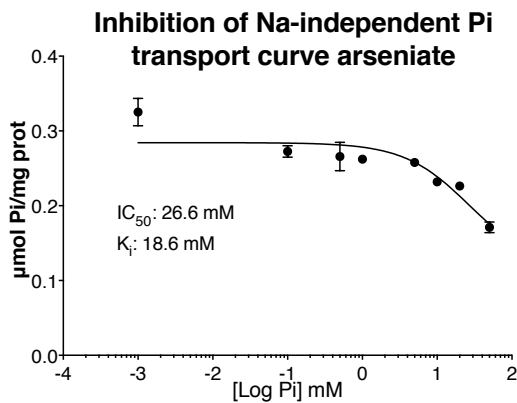
C



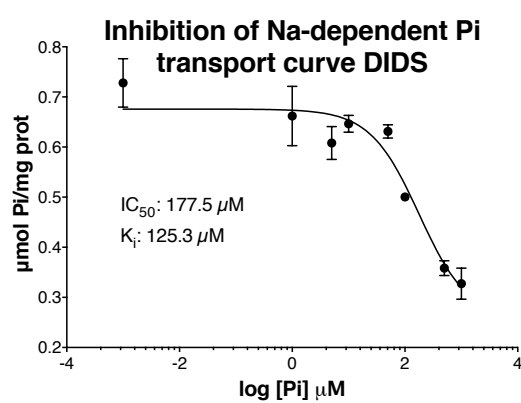
D



E



F



G

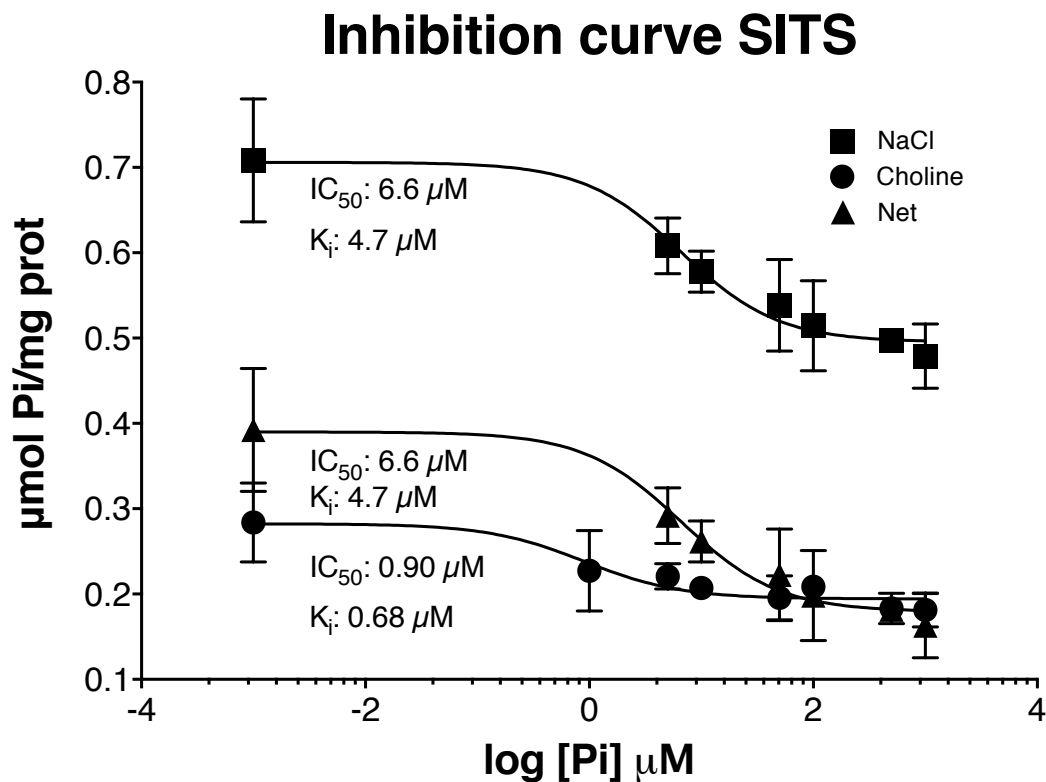


Figura 36: Transporte de Pi con sodio (A) y con colina (B) en presencia de moléculas de características similares, ANOVA $p < 0.0001$. Las diferentes letras implican diferencias significativas $p < 0.05$. Curvas de inhibición realizadas por regresión no lineal de tipo sigmoideo.

3.3. EFECTO DEL pH SOBRE EL TRANSPORTE DE Pi EN VSMC

Para evaluar un posible co-transporte de protones y/o un posible transporte específico de alguna especie de fosfato en el componente Na-independiente del transporte de Pi en las VSMC, se evaluó el efecto del pH en dicho transporte, utilizándose los siguientes pHs: 6, 6.5, 7, 7.5, 8 y 8.5. Como se esperaba, el componente Na-dependiente se observó fuertemente inhibido a medida que el pH fue aumentado, debido a la desaparición de fosfato monovalente para dar lugar a fosfato divalente (tanto Pit1 como Pit2 transportan fosfato monovalente) (Figura 37 A). En cuanto al transporte Na-independiente de Pi, fue también independiente de Pi, ya que no se modificó en ninguno en el rango de pH utilizado (Figura 37 B).

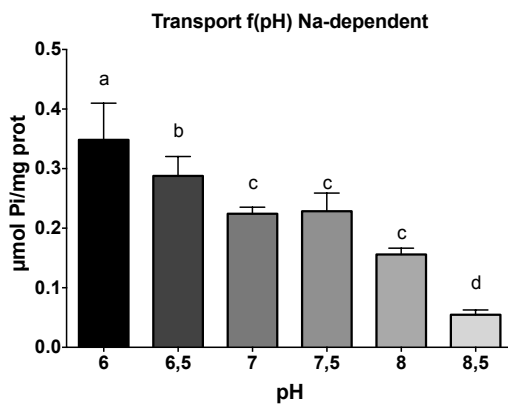
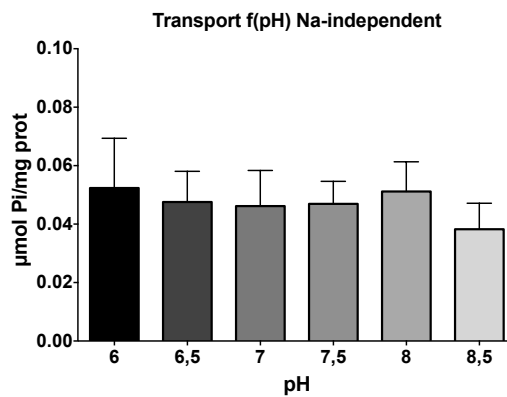
A**B**

Figura 37: Influencia del pH (de 6 a 8.5) en el transporte de Pi en VSMC. (A) Transporte Na-dependiente., ANOVA $p < 0.0001$. El transporte desciende a medida que aumenta el pH. Diferentes letras implican diferencias significativas, $p < 0.05$ con un test de Tukey. (B) Transporte Na-independiente. No se observan diferencias en el transporte con los diferentes pH estudiados.

3.4. EXPRESIÓN DE DIFERENTES TRANSPORTADORES Na-INDEPENDIENTES EN VSMC

Además de caracterizar el componente Na-independiente, nuestro objetivo en un primer momento fue la identificación del transportador responsable de dicho transporte, por lo que se creó una lista de proteínas transportadoras que intercambiaran cloro, bicarbonato y/o sulfato en ausencia de sodio. Para ello, primeramente diseñamos *primers* para amplificar el ARN mediante PCR tradicional de cada uno de ellos, y descartar de este modo los que no estuviesen expresados en las VSMC. La lista de las proteínas de transporte cuya expresión fue estudiada (todas de las familias SLC4 y SLC26), está en la sección 10.3. de material y métodos (página 47). Los miembros de esas familias que se amplificaron fueron el SLC26A2, 6, 8, 10 y 11 (variantes I, II y IV) así como de la familia SLC4 el A2, A3 y A4 (Figura 38).

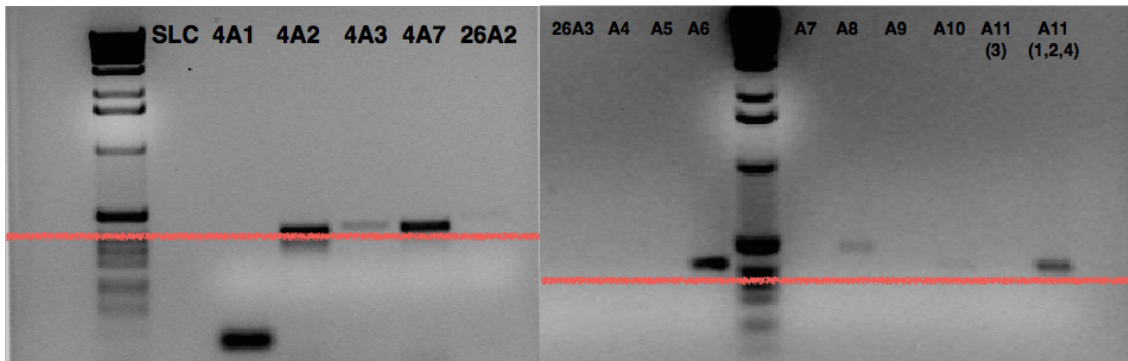


Figura 38: Electroforesis en gel de agarosa al 1% para comprobar la presencia de los genes de interés. Se observan bandas del tamaño del amplicon deseado en el caso de SLC4A2, A3, A7 y de SLC26A2, A6, A8, A10 y A11 (variantes 1,2 y 4). La línea roja indica el peso molecular donde aproximadamente deberían aparecer las bandas de cada gen.

Tras esto, se llevó a cabo una comparativa de expresión de los transportadores que habían sido detectados en las VSMC, pero esta vez con un 50 y un 100% de confluencia de las VSMC. Este experimento, se planteó a raíz de la observación de un menor transporte Na-dependiente antes de alcanzar la confluencia (hecho profundizado en el punto 3.6. de esta subsección de resultados), por lo que se consideró que quizá, si el transportador Na-independiente era alguno de los estudiados, se encontraría sobreexpresado, o como mínimo, no menos expresado antes de llegar a la confluencia, que una vez se hubiera alcanzado el 100% de la misma. Como se observa en la figura 39, los únicos transportadores que no vieron disminuida su expresión antes de llegar a la confluencia fueron SLC26A10 y 11 (variantes I, II y IV) y SLC4A2, y A7. Los SLC4 son transportadores que cotransportan cloro y bicarbonato sin gradiente electroquímico¹⁷², mientras que del SLC26A10 se considera un pseudogen¹⁷³, pero SLC26A11 transporta sulfato, y en menor manera carbonato y cloro, siendo también electroneutro.

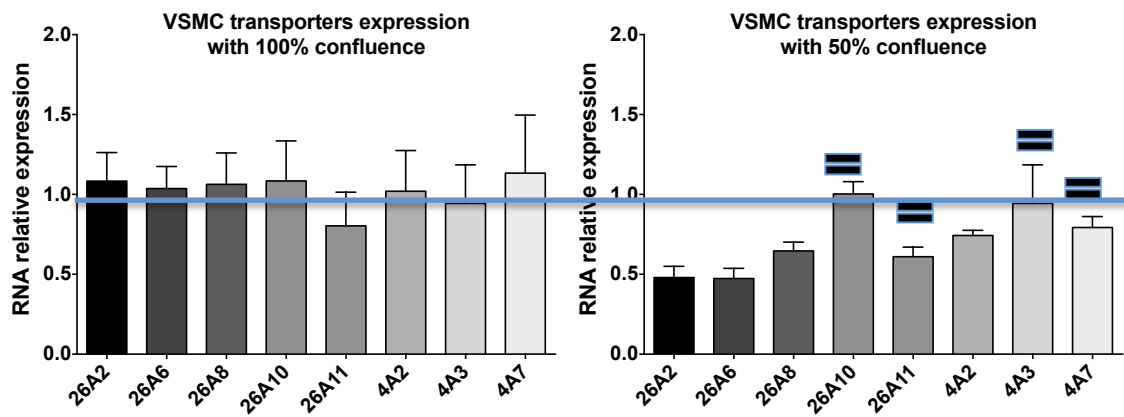


Figura 39: Expresión de RNA los miembros de la familia SLC26 expresados en VSMC, así como de SLC4A2, A3 y A7, antes (histograma de la derecha) y después de la confluencia (histograma de la izquierda) en cultivo celular. Antes de llegar a la confluencia se aprecia una expresión significativamente menor de SLC26A2, A6, A8 y de SLC4A2, por un test t de student ($p < 0.05$) entre la expresión del mismo gen en las dos condiciones.

3.5. TRANSPORTE DE Pi EN AUSENCIA DE CLORO EN VSMC

Así como para el estudio Na-independiente de Pi habíamos sustituido el Na⁺ por colina, gracias al uso de cloruro de colina en lugar de cloruro de sodio, para estudiar el efecto del ion Cl⁻ tuvimos que usar una sal diferente, ya que no se comercializan colinas con aniones diferentes. Por ello utilizamos la sal usada muchas veces como alternativa a la colina, la N-metil-D-glucamina como catión, pero neutralizada con ácido glucónico en lugar del habitual ácido clorhídrico. Sin embargo, también estudiamos el efecto de la N-metil-D-glucamina neutralizada con HCl para aislar el posible efecto de la N-metil-D-glucamina (Figura 40 A). Los resultados obtenidos fueron totalmente inesperados, produciéndose un aumento del ³²P detectado al usarse el gluconato de N-metil-D-glucamina en lugar del cloruro de colina, pero no con cloruro de N-metil-D-glucamina. Por lo tanto, en ausencia de Cl⁻ ocurre una acumulación celular de Pi. Ante este hallazgo, se procedió al estudio del transporte Na-dependiente en ausencia de cloro, eliminándose el cloruro sódico, y añadiéndose al sistema NaOH neutralizado con ácido glucónico. Los resultados obtenidos fueron en la misma línea de lo observado en el componente Na-independiente, aumentando la acumulación de Pi en ausencia de cloro (Figura 40 B). De estos hallazgos surgió la hipótesis de la existencia de un sistema cloro-dependiente de salida de Pi, de tal modo que al

eliminar experimentalmente el cloro extracelular, las VSMC acumularían el Pi transportado normalmente al interior celular sin poder expulsarlo.

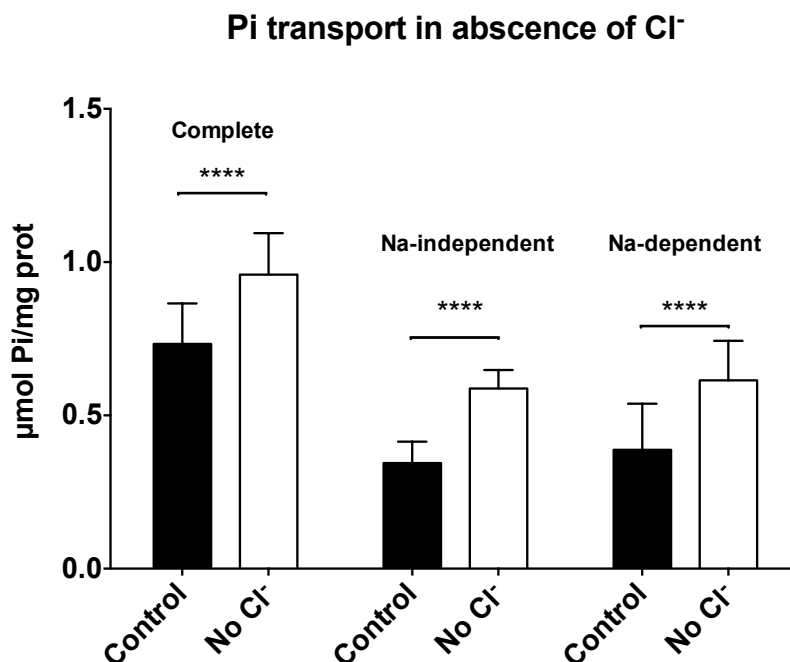


Figura 40: Transporte en ausencia de cloro, ANOVA $p < 0.0001$. Se observa un aumento de la detección de ^{32}P tanto en el transporte total, como en el desglose de sus componentes por medio de un test de Tukey ($p < 0.0001$).

3.6. VARIACIÓN DEL TRANSPORTE DE Pi EN VSMC ASOCIADA AL PORCENTAJE DE CONFLUENCIA

Como consecuencia de la plasticidad fenotípica que presentan las VSMC (comentada ya a lo largo de esta tesis), se consideró de interés estudiar el transporte de Pi en diferentes porcentajes de confluencia de las células (estando estos porcentajes asociados a un fenotipo contráctil en el caso del cultivo 100% confluyente y a un fenotipo de tipo proliferativo antes de llegar a la confluencia total), intentando establecer posibles cambios del componente Na-dependiente e independiente. Para esto se midió el transporte en presencia de sodio o de colina en VSMC con 50% o 100% de confluencia. En ausencia de sodio no se apreció cambio alguno, pero al calcular el componente Na-dependiente, se observó como ambos componentes transportaban ^{32}P a partes iguales antes de llegar a la confluencia, pasando a ser un aproximadamente un 70% asociado al componente Na-dependiente y un 30% el Na-independiente, una vez alcanzado el 100% de

confluencia y a una concentración de sustrato de 50 μM (Figura 41).

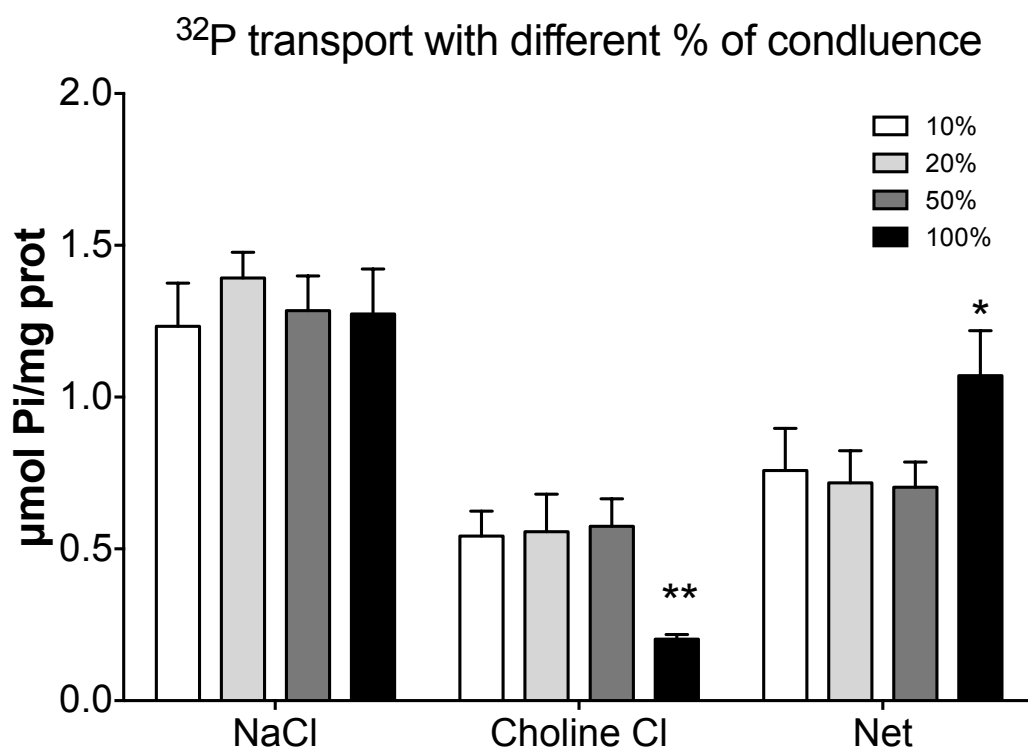


Figura 41: Variación del transporte de Pi con la confluencia, ANOVA doble $p < 0.0001$. En el análisis intragrupal del componente Na-dependiente (colina) y el Na-independiente (neto), se observa una disminución del transporte asociado al componente Na-independiente, creciendo el asociado al Na-dependiente, cuando se alcanza el 100% de confluencia, por un test de Tukey ($p < 0.05$).

3.7. EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES Na-DEPENDIENTES DE Pi SEGÚN LA EL PORCENTAJE DE CONFLUENCIA DE VSMC

Debido a las diferencias observadas en el transporte Na-dependiente en función del grado de confluencia celular, decidimos estudiar la expresión de ARN y de proteína de los principales transportadores de Pi en presencia de Na en VSMC. Como se ha comentado a lo largo de este trabajo, las VSMC presentan una gran plasticidad fenotípica como consecuencia de múltiples factores externos, entre ellos el grado de confluencia. Durante su división estas células presentan menor cantidad de proteínas contráctiles como calponina, SM22 α , α -actina, ... Es decir, presentan el denominado fenotipo proliferativo, en el que se ha encontrado sobreexpresada por ejemplo la MGP. Por ello, estudiamos también la expresión de estas proteínas a fin de confirmar que los hallazgos encontrados estaban

relacionados con los tipos fenotípicos previamente descritos^{7,14}.

Para estudiar los cambios de expresión del ARN, llevamos a cabo una retrotranscripción del ARN total purificado a partir de cultivos de VSMC en 100% y 50% de confluencia. Con el ADNc obtenido llevamos a cabo PCR en tiempo real de Pit1, Pit2, calponina, SM22 α , α -actina y MGP. Los resultados muestran un aumento significativo de las proteínas contráctiles (calponina, SM22 α , α -actina) y de los transportadores de Pi (Pit1 y Pit2), en los lisados de 100% de confluencia en comparación a los de 50% de confluencia. Por el contrario MGP se encuentra aumentada significativamente en los cultivos de VSMC con un 50% de confluencia (Figura 42 A).

Por otro lado, los WB obtenidos de cultivos con condiciones iguales a las que se habían utilizado para obtener el ARN y para estudiar el transporte según la confluencia, mostraron cambios similares a los obtenidos en la expresión de ARN(Figura 42 A), con la excepción de la calponina, que no mostró cambios de expresión (Figura 42 B). Todo esto demostró que para el estudio del transporte de Pi en VSMC, hay que poner especial atención en la confluencia utilizada, puesto que ésta afecta directamente al transporte de Pi, de Pit1 y Pit2.

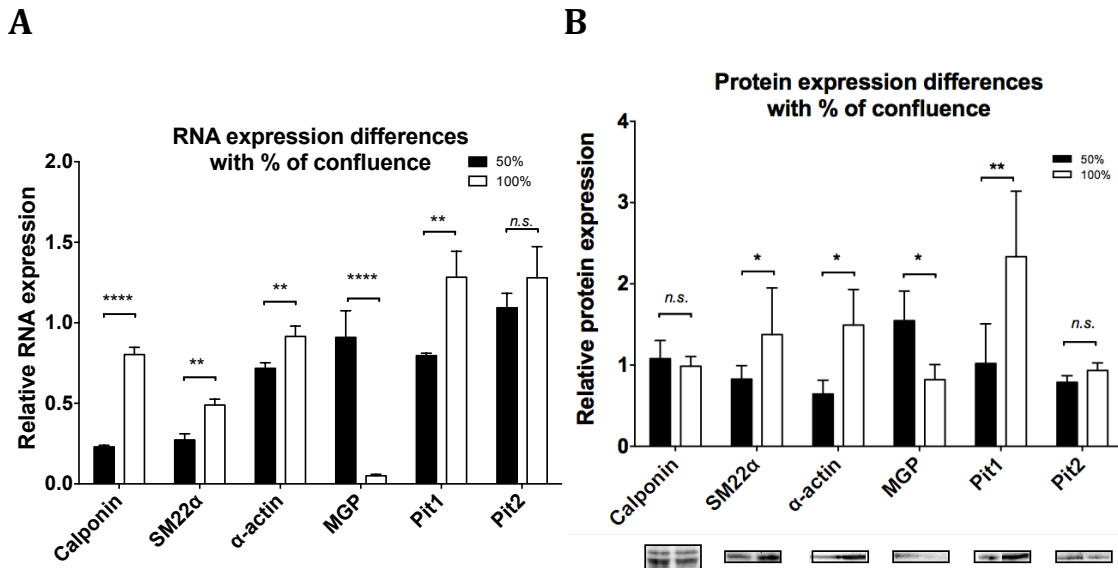


Figura 42: (A) Diferencias en la expresión de ARN. En 100% de confluencia se observa una mayor expresión de todos los casos, excepto en el de Pit2, que no varía, y en el de MGP, que se encuentra menos expresada, por medio de un test t de student para cada gen. (B) Diferencias en la expresión de proteína estudiada por WB. En 100% de confluencia se observa una mayor expresión de todos los casos, excepto en el de Pit2y calponina, que no varían, y en el de MGP, que se encuentra menos expresada, por medio de un test t de student para cada gen.

V. DISCUSIÓN

PARTE 1. SOBRE EL ANÁLISIS DEL MÉTODO DE CALCIFICACIÓN VASCULAR IN VITRO

En esta primera parte de la tesis, se estudiaron los sucesos que tienen lugar durante la calcificación de VSMC *in vitro* con altas concentraciones de Pi (es decir, el modelo de CV *in vitro* propuesto por la doctora Giachelli¹⁴⁰ y cuyo uso se encuentra tan extendido en el estudio de esta enfermedad), para intentar aunar los resultados obtenidos por medio de este método y compararlos con los datos que se conocen de los sucesos *in vivo*. Los resultados de estos estudios mostraron una gran correlación entre la concentración de Pi y la precipitación de Ca/P, la formación de depósitos de calcio y la muerte celular (Figura 3); que el aumento significativo de la muerte celular empieza tras la nucleación del calcio y la formación de depósitos (Figura 7 y 14), que la muerte celular es proporcional a la cantidad de estos depósitos (Figura 5A), y que la muerte celular se evita mediante el inhibidor de la calcificación PPI (bajo cualquier concentración de fosfato de las utilizadas en este estudio) (Figura 15 A). Del conjunto de estos hallazgos, se desprende que la muerte celular observada en cultivo no está causada por la citotoxicidad del Pi, sino por la precipitación de Ca/P. Para confirmar esta idea, otras posibles causas de la muerte celular durante la calcificación, como podrían ser un déficit de Pi o de Ca²⁺ (por secuestro durante la precipitación y formación de cristales, por ejemplo), fueron descartadas (Figura 17), puesto que, aunque se observó una bajada importante del calcio del medio (no así del Pi), y esta generó un aumento de la muerte celular, dicho aumento fue muy inferior al que detectado en el método de calcificación de VSMC con alto Pi.

Así mismo, para que se produjera el aumento de expresión de osteogénesis (en las células supervivientes) previamente descrito en este método *in vitro*^{140,174}, fue necesaria la formación de precipitados en el medio (Figura 2 y 14), puesto que la aparición de éstos es muy anterior al comienzo de los cambios de expresión. Los mecanismos por los que esta transdiferenciación tiene lugar pueden ser, o bien por endocitosis de los nanoprecipitados, o bien por daño mecánico de los depósitos, o por ambos. A pesar de que es posible que los cambios sean provocados por los precipitados depositados, parece más probable que los causantes (al menos inicialmente) sean los nanoprecipitados en suspensión, dado que éstos comienzan

a producirse antes de las 48 horas en todos los casos (incluida la condición de 2 mM de Pi en MEM), mientras que los depósitos aparecen en MEM tras 10 días de incubación (Figura 3B). Si bien la expresión de ARN de los osteogenes Runx2 y Msx2 aparece aumentada también a los 10 días, el aumento de esta expresión en el caso de TNAP se produce a los 8 días de incubación (aunque su actividad se ve aumentada ya a los 4 días como se observa en la figura 15 B). Debido a la diversidad de parámetros envueltos en esta calcificación *in vitro*, para mayor claridad se comentará el papel de cada uno por separado, para acabar citando las conclusiones globales extraídas de este estudio.

PAPEL DE LA SOBRESATURACIÓN

La nucleación de partículas de Ca/P como partículas en suspensión (Figura 14) parece ser un suceso clave durante la calcificación de VSMC *in vitro*. En nuestros estudios, hemos observado que la formación de depósitos de Ca/P es una consecuencia de la precipitación homogénea de estas nanopartículas de Ca/P (dado que cuando las condiciones termodinámicas no son propicias para la precipitación, no se observa formación de depósitos en ningún caso, véase la figura 9), quedando pendiente el estudio de la participación, y en su caso, importancia de posibles precipitados heterogéneos en los que estén envueltos restos celulares. Por lo tanto, y dada la importancia de estos precipitados, consideramos conveniente un análisis de los eventos desde un punto de vista termodinámico, para esclarecer las especies moleculares implicadas, y si existe alguna similitud con lo sucedido *in vivo*.

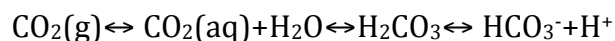
Un parámetro importante para la precipitación es la sobresaturación. Esta consiste en la concentración de especies precipitantes que se encuentran por encima del punto de saturación en una solución (o en nuestro caso, en un medio de cultivo), como se ha definido en la tabla 1. La sobresaturación se calcula normalmente respecto a ciertas especies cristalinas¹⁷⁵, en el caso del Ca y el Pi, ésta es normalmente fosfato dicálcico dihidratado (DCPD; $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Sin embargo, los resultados previos de microscopía electrónica de transmisión en otros estudios¹⁴⁸, dejan claro que la primera fase en precipitar es el fosfato cálcico amorfo (ACP). Por lo tanto, el valor más relevante de sobresaturación en nuestro

caso debería ser el de ACP, no el de la hidroxiapatita (HAP) como se ha comentado en los estudios *in vivo*¹⁷⁶. Mientras el HPO_4^{2-} es la única especie de fosfato en el DCPD, varias técnicas de caracterización como Resonancia Magnética Nuclear de ^{31}P ¹⁷⁷ y difracción de rayos X, han mostrado que ACP está compuesto mayormente, si no únicamente, por PO_4^{3-} , resultado que concuerda con una publicación reciente basada en el método de CV *in vitro* estudiado, en la que se utilizaron condiciones muy exageradas de calcificación¹⁷⁸. Este dato es crucial para predecir la precipitación con diferentes condiciones de pH, puesto que la concentración de HPO_4^{2-} apenas varía en las condiciones de pH de interés en nuestro estudio (7.4-8.7), por lo que la sobresaturación de DCPD no se encuentra modificada; pero por otro lado, la concentración de las especies de PO_4^{3-} se ve 10 veces incrementada, y por lo tanto la sobresaturación y por ello la precipitación de ACP se verá así mismo incrementada de forma dramática en estas condiciones no fisiológicas de pH. El producto de solubilidad de ACP no ha sido establecido claramente, pero si que podemos utilizar para calcularlo el producto de actividad iónica, así como un producto de solubilidad (K_{sp}), como ha sido propuesto¹⁷⁹ para $T^{\text{a}} = 37^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH} = 7.4$. Los valores de sobresaturación en los medios utilizados en este trabajo (MEM, DMEM y DMEM-F12), han sido estimados para ACP y otras especies precipitantes de Ca/P (Tabla 1) con respecto a los valores de pH que se midieron en la campana y en la estufa de CO_2 de cultivos. Estos medios fueron utilizados con diferentes concentraciones de Pi (1-3 mM) así como de bicarbonato (MEM, 26.19 mM; DMEM, 44.05 mM; DMEM-F12, 14.29 mM). Tanto en MEM como DMEM, no se observa sobresaturación respecto a ACP en el pH de equilibrio (pH_{∞}), en la estufa de CO_2 con el bicarbonato correspondiente a cada medio (Tabla 1). Sin embargo, durante el tiempo que transcurre hasta que se alcanza este pH de equilibrio, el pH alcalino previo induce valores de sobresaturación elevados a 2 y 3 mM de Pi con respecto a ACP. En DMEM, los valores de sobresaturación son considerablemente mayores que para MEM. Es importante remarcar que los valores de sobresaturación para DCPD tanto en MEM como en DMEM son similares y mayores que 1 (es decir que está supersaturado) en presencia de 2 mM de Pi, incluso con en el pH de equilibrio. Además de esto, se ha observado con TEM que los precipitados amorfos están continuamente transformándose por reacciones en fase sólida (es decir, cristalizando). Estos cristales van haciéndose cada vez más

densos y más ricos en Ca^{2+} hasta que, con el paso del tiempo se convierten en HAP cristalina. De forma paralela a este proceso de densificación, la solubilidad de los precipitados va disminuyendo, y consecuentemente la sobresaturación se incrementa hasta que alcanza los valores correspondientes a HAP. En la tabla 1 se observa que todos los medios se encuentran altamente supersaturados con respecto a HAP. Por lo tanto, a medida que la estructura del precipitado se aproxima a la de la HAP, la precipitación será difícilmente revertida por cambios moderados de pH (como los que observamos en nuestro caso), y continuará hasta que los valores de Ca^{2+} y P_i del medio alcancen valores muy bajos. En resumen, la precipitación espontánea de Ca/P encontrada en los depósitos de los experimentos de calcificación, generados en MEM, y especialmente en DMEM, pueden ser debidos a un aumento en el pH, incluso si este aumento es transitorio, dado que la sobresaturación de ACP se incrementa rápidamente cuando el pH se encuentra alrededor de 8.0. Por lo tanto, el uso de medios (MEM y sobre todo DMEM) con altas concentraciones de bicarbonato no es adecuado para los estudios de calcificación. Por otro lado, medios con bajas concentraciones de bicarbonato, pero que utilizan HEPES como tampón, como es el caso del DMEM F12, no presentan estos problemas.

PAPEL DEL pH

Durante la preparación de los medios de cultivo celular altos en P_i , a partir de medios comerciales en la campana de flujo laminar, estos experimentan un aumento drástico del pH. Esto es debido a que el pH de las soluciones que contienen bicarbonato, es muy dependiente de la presión de CO_2 , como puede ser deducido del siguiente equilibrio:



El H_2CO_3 se descompone en H_2O y CO_2 (aq), y la concentración de CO_2 (aq) depende de la presión de CO_2 gas. Cuando la presión de CO_2 es baja (por ejemplo en el ambiente, donde es de 0.04% aproximadamente), el CO_2 soluble se libera gradualmente en la atmósfera, y el equilibrio se ve desplazado hacia la izquierda,

con el consecuente consumo de H^+ y la basificación del medio. Por lo tanto, en los medios tamponados con bicarbonato, como son el MEM y el DMEM, el pH final dependerá del contenido de bicarbonato inicial y la presión parcial de CO_2 , adicionalmente a otros agentes como la humedad ambiental (del 100% en la estufa de CO_2), la temperatura, la presencia de otros tampones y/o de suero y la actividad metabólica de las células. Esto demuestra que MEM y DMEM no pueden alcanzar el mismo equilibrio, puesto que DMEM prácticamente dobla la concentración de bicarbonato a MEM. Esta es la razón por la que se recomienda utilizar MEM con una presión parcial de CO_2 de un 5% y DMEM con un 10%. A pesar de todo, incluso usando MEM con 5% de CO_2 , hemos observado ligera alcalinidad durante los cambios de medio (Figuras 11 y 12).

Debido a los resultados comentados hasta ahora, se decidió medir la evolución del pH en el medio durante las maniobras habituales en el laboratorio, por ejemplo, la preparación de los medios (MEM, DMEM y DMEM F-12) a $37^\circ C$ en la campana de flujo laminar, tras lo que se introdujeron en el incubador de CO_2 (5% CO_2 , $37^\circ C$), donde se midió de forma continua el pH anotándose los resultados de forma periódica, y se obtuvieron los resultados de la figura 11. Fuera del incubador, el pH de DMEM-F12 fue de 7.56m cercano al 7,4 esperado, mientras que el de MEM fue de 8.41 y el de DMEM 8.67. En el incubador de CO_2 , el pH bajo lentamente, alcanzándose el deseado (7.4) tras 1 hora, sólo en el caso de DMEM F-12. Sin embargo, el pH de MEM tras una hora fue todavía de 8.41 y el de DMEM 8.67. Los cálculos de sobresaturación indicaron que DMEM F-12 estaba infra-saturado desde el comienzo con cualquiera de las concentraciones de P_i utilizadas. Las soluciones de MEM, por otro lado, estaban infra-saturadas inicialmente sólo en el caso de 1 mM de P_i , descendiendo por debajo de la sobresaturación tras 21 minutos con 2mM de P_i o tras 40 minutos con 3mM. En el caso de DMEM, se llegó a un punto de no saturación con 1 mM de P_i tras 12 minutos, mientras que esta cifra ascendió a 52 minutos con 2 mM, prácticamente no llegando a estar en ningún momento por debajo de la sobresaturación con 3 mM de P_i (puesto que el pH en equilibrio es de 7.95, coincidiendo con el de la saturación).

En conclusión, la variación de la presión de CO_2 en medios con bicarbonato podría ser la causa de los incrementos del pH observados durante los estudios de calcificación, y que además pueden llevar a la precipitación espontánea de Ca/P

tanto en MEM, como en DMEM. Por otro lado, las variaciones de pH en DMEM F-12 son más pequeñas, y el pH se mantiene cercano al deseado (7.4).

PRECIPITACIÓN HOMOGÉNEA

En primer lugar, queremos enfatizar que la existencia de sobresaturación no implica en todos los casos la precipitación, porque hay siempre un periodo de inducción y una barrera de nucleación, los cuales pueden verse disminuidos en la nucleación heterogénea, así como en presencia de promotores de dicha nucleación, como células muertas, proteínas estructurales, etc. Del mismo modo, la sobresaturación necesaria para el crecimiento de las partículas es bastante baja, por lo que la precipitación continuará en presencia de precipitados iniciales incluso con supersaturaciones muy bajas. Si bien nosotros no hemos estudiado esta posibilidad, el carbonato de calcio podría tener este papel, puesto que la disociación del ión HCO_3^- produce iones CO_3^{2-} que en presencia de Ca^{2+} , podrían causar la precipitación de CaCO_3 . Por lo tanto, utilizamos datos termodinámicos previamente publicados¹⁷⁹ y calculamos la concentración de CO_3^{2-} y la sobresaturación de CaCO_3 en los 3 medios estudiados. Los resultados mostraron que la concentración del ion carbonato aumenta exponencialmente con el pH, que la sobresaturación de CaCO_3 también se ve aumentada sustancialmente con el pH y que la sobresaturación es más alta para DMEM que para MEM. En el caso de MEM, por ejemplo, la sobresaturación de CaCO_3 es 2.86 a pH 8, y de 1.44 (1.89 en DMEM) a pH 7.4. Por lo tanto, en MEM, y en mayor grado DMEM, están ya supersaturados para CaCO_3 con un contenido de Ca^{2+} de 1.8 mM, y tal como sucede con el Pi, la sobresaturación se incrementa rápidamente con el pH. A pesar de esto, el CaCO_3 sólo precipitará cuando la superaturación traspase la barrera de la nucleación, y cuando esto suceda, servirá como nido para la precipitación heterogénea de Ca/P. Los bajos índices de Ca/P encontrados en los precipitados iniciales son una muestra indirecta de que la concentración de CaCO_3 es baja, pero aun así esto no elimina la posibilidad del carbonato cálcico como base para la precipitación de CaCO_3 . De todos modos, el riesgo de precipitación del CaCO_3 no hace más que contraindicar de nuevo el uso de medios con altas concentraciones de bicarbonato.

Los resultados experimentales de nucleación y precipitación *in vitro* (Figura 14) coinciden cualitativamente con nuestros análisis termodinámicos. La precipitación está claramente aumentada en DMEM con respecto a MEM, y como se predijo, los medios con 1 mM de Pi no precipitaron durante los tiempos en los que se desarrolló el experimento. En presencia de 2 mM de Pi en MEM, los cálculos indicaron que ACP no se encuentra saturado en el pH de equilibrio en la incubadora de CO₂, pero a pesar de esto, desde su preparación en la campana de flujo laminar, pasan 21 minutos hasta que se alcanza este equilibrio, y durante este tiempo, existe sobresaturación para ACP. Además, se observaron nucleaciones detectables tras un “largo” período de incubación (tras 24 horas o más sin células, o de las 48 horas en adelante en presencia de células), permaneciendo estables en suspensión tras 6 días en MEM sin células. En MEM con 3 mM de Pi, los valores de sobresaturación eran mayores y al menos durante 40 minutos desde su producción en la campana de flujo laminar, comenzando a detectarse las nucleaciones a las 6 horas en la incubadora y visibles al ojo humano en el fondo del pocillo a las 48 horas. El caso de DMEM con 2 mM de Pi es similar al de 3 mM de Pi en MEM, pero la sobresaturación de CaCO₃ es mayor, lo que se ve reflejado en los experimentos por medio de una reducción del tiempo de inducción, apareciendo precipitados tras 24 horas (en lugar de las 48 de MEM). El efecto del tipo de medio, como se ha mostrado y la concentración de Pi en él, también se ve reflejada en la cristalinidad de los depósitos, como muestra el patrón de difracción de electrones (Figura 18 B). El análisis detallado de la ultraestructura reveló el típico proceso de precipitación de Ca/P, comenzando con la formación de un precipitado laminar de baja densidad y con bajo ratio Ca/P, continuando con la formación de nanopartículas de Ca/P, que no son aún cristalinas (sino amorfas), y acabando (tras pasar cierto tiempo y con el elevado pH) en partículas poco desarrolladas en forma de varilla, que se organizan radialmente en forma de “esferolitos” con un ratio de Ca/P de 1.7 (similar al de la hidroxiapatita). Estas varillas parecen estar formadas por acumulación de nanopartículas redondeadas, en un proceso que requiere tiempo y condiciones propicias para la precipitación. De hecho, las partículas de hidroxiapatita se forman sólo tras pasar cierto tiempo, por densificación y reorganización de las partículas en planos cristalinos.

PARTICIPACIÓN CELULAR

Dado que la aparente nucleación espontánea en el medio de cultivo (insistimos, precipitación homogénea) es iniciada por ligeros cambios en el pH y depende de la disponibilidad de iones Pi (con la posible colaboración de la sobresaturación de CaCO_3), el papel de las células en este modelo experimental debe ser aclarado. Tradicionalmente se ha aceptado la necesidad de una matriz extracelular que actúe como promotora de la calcificación, pero ésta no es la causa de la nucleación de Ca/P *in vitro* siendo esta un proceso independiente a la presencia de células. El modelo de calcificación *in vitro* crea un ambiente muy hostil para las células, las cuales no consiguen manejar el pH y la precipitación de forma efectiva, como se observa al comparar los resultados obtenidos en medios con y sin VSMC (o con células muertas). La mayor formación de precipitados fue inicialmente interpretada como la consecuencia de la pérdida de capacidad de síntesis de inhibidores de la calcificación por parte de las VSMC¹⁶¹, pero los resultados que hemos obtenido en este trabajo demuestran que un incremento en el pH del medio en presencia de células muertas juega un papel principal (figura 10 B). El pH del medio crece también con la calcificación, probablemente asociado a una mayor muerte celular (figura 13 A) y la consecuente pérdida progresiva del control del pH. Los resultados de este trabajo muestran que presumiblemente las primeras etapas de la calcificación *in vitro* son eventos espontáneos de nucleación y crecimiento cristalino debido a periodos de alcalinización del medio en el que se induce sobresaturación. Estas precipitaciones inducen transdiferenciación y/o muerte celular, dependiendo de la cantidad de los mismos. Los cambios fenotípicos podrían participar en la calcificación heterogénea, y por lo tanto, explicar la formación de precipitados de Ca/P tras 12 días en medio MEM, en presencia de VSMC. La nucleación del calcio en estas condiciones es escasa, y en este estudio fue detectada únicamente justo cuando se suele cambiar el medio (a las 48 horas). Sin embargo, es posible que las recién formadas nucleaciones de 100 nm sean internalizadas por las células y que tras cierto tiempo, induzcan transdiferenciación y expresión de proteínas relacionados con la osificación. Por ejemplo, la actividad de TNAP está aumentada a los 4 días, pudiendo esto favorecer la nucleación y formación de depósitos de Ca/P induciendo la hidrólisis del

inhibidor de la calcificación, PPI. De hecho, la inhibición por medio de fármacos de TNAP, previene parcialmente la calcificación de VSMC *in vitro* provocada por 3 mM de Pi en MEM¹⁸⁰.

A pesar de la participación celular en las etapas finales de la calcificación *in vitro*, la formación de nucleaciones en medios alcalinos es necesaria en esta “calcificación”, como se extrae de que la calcificación jamás tiene lugar en medios con bajo bicarbonato como DMEM F12. Este medio mantiene como hemos comentado el pH en un rango fisiológico, manteniendo el ACP por debajo de la saturación incluso en presencia de 3 mM de Pi, y, consecuentemente evita la calcificación *in vitro* tras 3 semanas de incubación con 2 y 3 mM de Pi.

RELEVANCIA RESPECTO A LOS SUCESOS IN VIVO

La nucleación espontánea, y por lo tanto la precipitación homogénea no es posible en la sangre, incluso en condiciones hiperfosfatémicas. Para empezar, el calcio libre total (Ca^{2+}) que contiene la sangre se encuentra enormemente controlado y apenas pasa de 1.25 mM, mientras que MEM y DMEM contienen 1.8 mM. En segundo lugar, el pH está así mismo controlado y jamás alcanza las condiciones de alcalinidad presentes en los medios al ser preparados. También, el contenido de Pi en las hiperfosfatemias más graves rara vez alcanza la concentración de 2.5 mM e incluso bajo esas condiciones extremas, la sangre no se encuentra supersaturada con respecto al ACP ($S_{(\text{ACP})} = 0.53$). Entonces ¿cuál es la relación entre la CV y la formación de precipitados de forma espontánea *in vitro*? Existen diferentes tipos y causas de calcificaciones ectópicas, y cuando está relacionada con la ERC, la calcificación va en muchas ocasiones relacionada con la hiperfosfatemia. Sin embargo, la patogénesis de la ERC es muy compleja y adicionalmente al Pi, existe una acumulación de productos de desecho (las conocidas como “toxinas urémicas”), las cuales pueden inducir la transdiferenciación y calcificación de VSMC *in vitro*¹⁸¹. La composición del plasma sanguíneo es mucho más compleja que la de los medios de cultivo, presentando otras proteínas, solutos e inhibidores de la calcificación, los cuales participan en el proceso de calcificación, además de cómo decíamos, un pH mucho más controlado, siendo todo suficiente para prevenir la precipitación. Finalmente, la presencia de

otros tipos celulares (además de las VSMC), otras estructuras críticas para la nucleación (véase las fibras de elastina), y los mayores períodos de exposición a las alteraciones (el desarrollo de la enfermedad en humanos dura muchos años), todo ello constituye un conjunto de condiciones en las que se produce la CV *in vivo* muy diferentes a las que se existen en este modelo *in vitro*.

En consecuencia, si la precipitación homogénea no tiene lugar *in vivo*, la calcificación que tiene lugar en las arterias tiene que producirse como precipitación heterogénea mediada por células, por lo que la utilidad y relevancia de este modelo debe ser aclarada y definida y la utilización de las condiciones (como la concentración de bicarbonato o Pi), adecuadas a los sucedido *in vivo*. Por ejemplo, las condiciones de pH deben ser similares a las que se encuentran en los pacientes urémicos, es decir condiciones similares a la acidosis metabólica. Como hemos indicado previamente, el ACP no está saturado a pH 7.4, por lo que a menos que se produzca un cambio masivo del pH local en la media de las arterias, sería imposible la precipitación de esa especie en condiciones aún más ácidas. Con respecto a las concentraciones de calcio y al fosfato, el calcio ionizado (el 50% del calcio total) en humanos sanos, presenta una concentración de 1.05 a 1.25 mM en la sangre (mientras que MEM y DMEM contienen 1.8 mM de CaCl₂), y esta no se ve aumentada (sino que en ocasiones desciende) en la ERC. El rango normal de Pi en la sangre va de 0.9 a 1.45 mM pero en los pacientes con ERC, 1.13 mM se encuentra ya asociado con un incremento del riesgo de muerte¹⁸²; así mismo, 2 mM es común en pacientes en grado 4 y 5 de ERC y 3mM (9.29 mg/dL) es bastante excepcional. Además, la fuerza iónica de calcio y fosfato así como la formación de CaHPO₄ soluble, se ve drásticamente reducida, disminuyendo aún más las probabilidades de precipitación¹⁷⁶. Sin embargo, podemos asumir que las fuerzas iónicas (y los coeficientes de actividad) en los medios de cultivo y en la sangre son similares, basados en la concentración de NaCl y KCl. Como conclusión, para intentar imitar las condiciones *in vivo*, las VSMC deben ser incubadas en medios calcificantes que contengan una fuerza iónica de I=0.15 M, aproximadamente 1.25 mM de calcio y aproximadamente 2 mM de Pi, condiciones de quiescencia (SFB<0.5%), además de un pH a 37 °C que se mantenga de forma apropiada a 7.4, y agentes inductores de la transdiferenciación celular y la calcificación específicos como el suero urémico.

En resumen, hay que admitir que a pesar de una intensa investigación en el campo de la CV en los últimos 15 años, no se ha avanzado todo lo que se esperaría y actualmente no existen terapias eficaces para prevenir o tratar esta enfermedad. Creemos que el uso inadecuado del modelo de calcificación *in vitro*, ha podido poner freno a estos avances, creando incongruencias y artefactos que no se corresponden con lo sucedido *in vivo*. De los resultados de este trabajo, podemos concluir que la hiperfosfatemia acelera considerablemente la calcificación pero no la genera, y por lo tanto creemos que la investigación se debería enfocar hacia la búsqueda del verdadero causante de la patología.

PARTE 2. SOBRE LOS SUCESOS TEMPRANOS EN LA CALCIFICACIÓN VASCULAR EN RATAS CON NEFRECTOMÍA 5/6.

Además de los problemas del método de calcificación *in vitro* comentados en la parte 1 de la discusión, otro de los factores que ha ralentizado los avances en la comprensión y búsqueda de un tratamiento efectivo para la CVM, es el hecho de que gran parte de los trabajos publicados *in vivo* se han centrado en el estudio de la enfermedad en un punto muy avanzado de la misma, cuando ya se observan grandes formaciones cristalinas de Ca/P en la túnica media de las aortas (es decir, cuando las tinciones de rojo de alizarina y von Kossa son positivas). Estos estudios han propuesto una gran cantidad de sucesos y cambios patológicos en las aortas durante la CVM (cambios osteogénicos, formación y calcificación de vesículas de membrana,...), proponiendo así mismo diferentes rutas patogénicas y moléculas de interés, tanto en modelos animales (knok-out, inducción química de ERC, nefrectomía parcial...), como en pacientes humanos. Pero a pesar de esto, aún no se ha identificado dianas farmacológicas útiles de tratamiento y mucho menos para revertir la calcificación (con la excepción quizá de los prometedores hallazgos realizados por dos equipos diferentes en el que, utilizando modelos alternativos se revirtió la CV por medio del diurético e inhibidor de la anhidrasa carbónica, acetazolamida, por medio de la inducción de acidosis^{183,184}). Todo esto, sumado a los hallazgos del profesor Hruska, el cual demostró que en los primeros estadios de la ERC la concentración de calcio comienza a aumentar en las arterias mucho antes de que la calcificación sea detectable por medio de tinciones tradicionales¹⁸⁵, hizo que nos planteáramos un estudio descriptivo de los cambios más tempranos que tienen lugar en la CVM de la aorta.

Para este estudio elegimos el modelo animal que a nuestro juicio, sin ser una réplica exacta de los sucesos en la ERC, es más realista. Este modelo animal, se basa en ratas a las que se les practica una nefrectomía 5/6 (simulando la pérdida del 83% de las unidades funcionales renales) y que además son alimentadas con pienso que contiene un 1.2% de Pi (más alto de la ingesta diaria recomendada, como el de la dieta occidental humana). Si bien en este modelo el animal se pierde de forma radical un 83 % de las nefronas, las que quedan disponibles son unidades

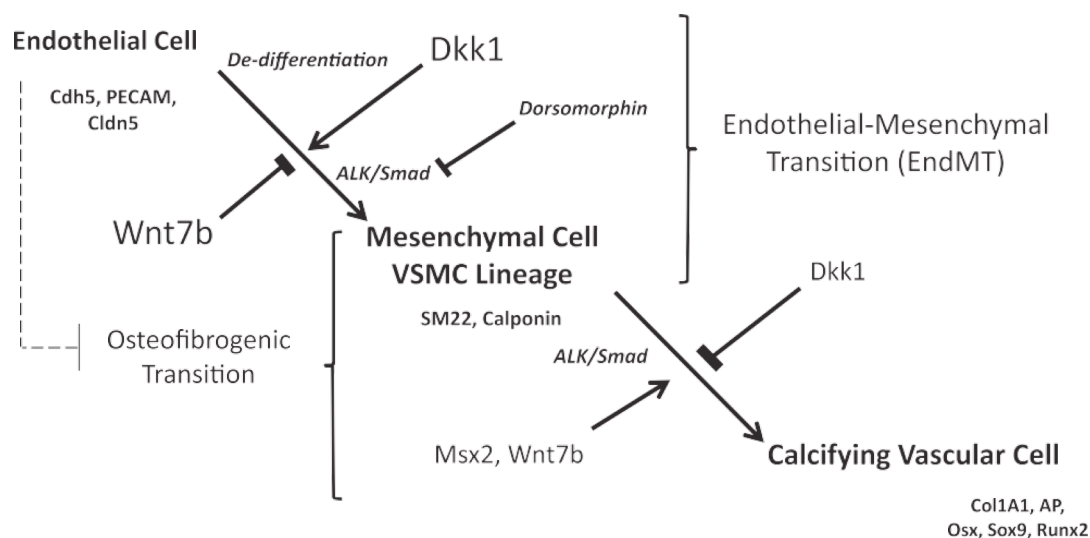
funcionales sanas que se van degradando progresivamente con el paso del tiempo y simulan el avance de la ERC, como se ha comprobado con el aumento progresivo de la creatinina y la urea en la Figura 31.

Uno de los propósitos de este estudio fue aclarar el orden de los eventos en el comienzo de la CVM, es decir ¿Se produce antes la transdiferenciación de las VSMC, o la formación de depósitos de Ca/P en la aorta³⁵? Ya en el estudio centinela realizado para establecer los puntos temporales de interés detectamos un aumento de la TNAP previo al aumento del calcio cuantificado en las aortas. Estos resultados quedaron confirmados en el experimento principal, cuando en el primer punto temporal (11 semanas tras la nefrectomía), a pesar de no detectarse un aumento en la concentración de calcio (Figura 21A), ni localizarse ningún depósito de Ca/P por FSEM, en las aortas de los animales nefrectomizados, se observó un aumento en la expresión de TNAP, tanto por PCR en tiempo real (Figura 22 A) como por IHC (Figura 28 A). Además, se realizaron dos tinciones (Azul rápido RR y NBT/BCIP) para la detección de la actividad de TNAP con propósito confirmativo, observándose un aumento de la actividad que coincide con el aumento observado en la expresión (Figura 29). Todo ello corroboró la idea de que los cambios en la expresión génica y proteica preceden a la formación de depósitos de Ca/P en las arterias.

Además de la TNAP, a las 11 semanas se observó un aumento de la expresión de ARN de Dkk1 (decimos aumento pero bien se podría considerar aparición, dado que los controles presentan una expresión mínima). El Dkk1 es un inhibidor de la ruta de señalización Wnt- β -cateninas, cuya expresión se había descrito en válvulas cardiacas calcificadas y en VSMC calcificadas *in vitro*, pero no en arterias^{186,187}. Los estudios sobre el papel de Dkk1 en la CV son confusos y presentan algunas contradicciones. Por ejemplo, la señalización positiva de Wnt- β -cateninas aumenta la densidad ósea (activando la osteoblastogénesis, aumentando la proliferación osteoblástica...) y su inhibición por parte de Dkk1, esclerostina, etc, disminuye dicha masa ósea^{188,189}, por lo que en parte Dkk1 es considerado un inhibidor de la osificación e inductor de osteodistrofia¹⁸⁹. Volviendo a la CV, también existen estudios de calcificación *in vitro*¹⁹⁰ con VSMC en los que la incorporación de Dkk1 frena el avance de la “calcificación”, así como algunos *in*

vivo, basados en el modelo murino de diabetes *LDLR*^{-/-} en los que al administrarle *Dkk1* exógeno se inhibían los cambios osteogénicos en la aorta¹⁶⁷. Si bien este papel inhibitorio de la CV es probablemente cierto, los métodos de estudio, utilizados con cantidades excesivas de Pi en el medio *in vitro* (generando artefactos experimentales como se ha comentado en el primer punto de la discusión) y con un modelo knock-out de T2D *in vivo* (el cual se encuentra en un contexto diferente a la ERC), hacen que otros estudios pongan estos hallazgos en duda.

Entre ellos se encuentra también un estudio del profesor Hruska⁹¹, en el que se utilizó el mismo modelo de ratón diabético *LDLR*^{-/-} pero con nefrectomía 5/6 para inducir ERC. En este modelo, al administrar un anticuerpo específico anti-*Dkk1* a estos animales, se previno la ERC-MBD. En otro artículo publicado por Su-Li et al.¹²⁵, *Dkk1* inducía (por medio del bloqueo de *Wnt7*) la activación de la transición endotelio-mesenquimal, la cual desdiferencia las células aórticas, para que éstas posteriormente se diferenciaron hacia un fenotipo osteoblástico. Si bien el estudio de Su-Li presenta posibles problemas en relación a lo comentado en el punto 1 de la discusión, al usar 5mM de β -glicerofosfato para inducir la calcificación celular *in vitro*, este autor aporta una idea muy interesante en la que aparecerían dos etapas en la aparición de la diferenciación osteoblástica: en un primer momento *Wnt* estaría bloqueando la transición endotelio-mesenquimal, mientras que al aumentar *Dkk1*, y por lo tanto verse inhibida la ruta *Wnt*- β -cateninas, esta transición se vería favorecida, produciéndose una desdiferenciación celular en las aortas. A continuación, y a medida que las células se van desdiferenciando, se activaría la ruta BMP2-Runx2 comenzando los cambios osteogénicos, y por lo tanto *Wnt* cambiaría su efecto pasando a ser un factor favorecedor de la osificación, mientras que *Dkk1* pasaría a ser inhibitorio de la calcificación (como se muestra en la siguiente imagen):



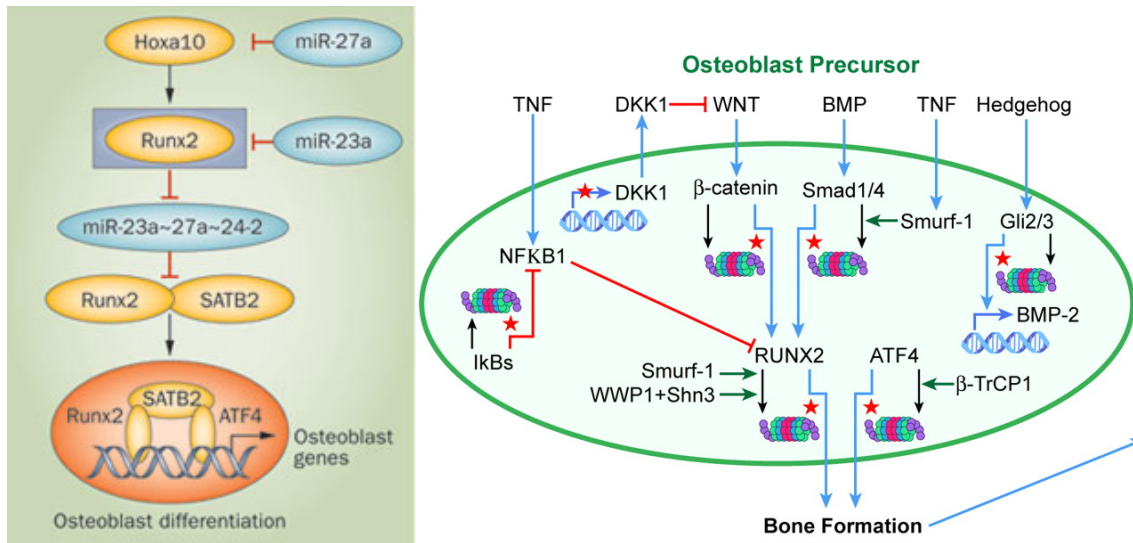
Si bien esta hipótesis requiere todavía ser confirmada con más estudios, según nuestras observaciones se produce un aumento muy importante en la expresión de ARN de Dkk1 en los animales nefrectomizados, durante las primeras etapas de la CVM, para posteriormente descender (aunque esta expresión siga aumentada con respecto a los controles), existiendo una gran correlación de estos cambios con los observados en TNAP (Figura 23 A). Una interpretación de estos resultados podría ser que, o bien Dkk1 se ve aumentado como mecanismo defensivo frente a una mayor expresión de TNAP, para bloquear la diferenciación hacia un tipo osteoblástico; o bien un agente desconocido induce un aumento de Dkk1 que desdiferencia las VSMC arteriales y como consecuencia estas comienzan a sobreexpresar la TNAP (las células mesenquimales producen gran cantidad de fosfatasa alcalina¹⁹¹), activándose a continuación los cambios hacia una osteodiferenciación (por la ruta BMP2-Runx2), tras lo que a medida que se diferencian de nuevo, vuelven a descender su expresión de TNAP y Dkk1 (recuperándose parte de la actividad Wnt, esta vez proosificante). Independientemente del mecanismo por el que TNAP y Dkk1 participen en la CVM, los cambios de expresión observados en las primeras etapas podrían indicar una función muy relevante CVM. Antes de continuar con la discusión, es importante comentar que el único de los receptores de Dkk1 cuya expresión fue estudiada durante esta tesis, el LPR6, no mostró expresión en las arterias, a pesar de que se ha descrito su presencia en ellas. Este hecho lo achacamos a una muy baja expresión del receptor en los vasos sanguíneos y en general en el organismo (siendo su forma circulante la más expresada), puesto que lo determinamos en

varios tejidos de rata y sólo se logró detectar, con grandes cantidades de ADNc y a ciclos muy avanzados de PCR en tiempo real en hígado y duodeno (sin expresión en otros tejidos como yeyuno, testículo, pulmón y riñón). Así pues se asumió su presencia en los vasos sanguíneos a pesar de que no hayamos sido capaces de amplificarlo. Por otro lado, el receptor de Activina tipo II (ActRII) sí que fue, como se esperaba, amplificado (Figura 27). Este receptor forma parte de la familia de receptores para el TGF- β ¹⁹², los cuales participan en la activación de los factores de transcripción Smad, los cuales se encargan de la señalización en la ruta de transformación endotelio-mesenquimal.

Tras estos primeros cambios de expresión, se produjeron nuevos hallazgos, como el aumento del calcio aórtico (Figura 19 A) confirmado por la localización por SEM y FSEM de los primeros depósitos de Ca/P en las arterias (Figura 20). Este hallazgo confirmó los resultados obtenidos por el profesor Hruska¹⁸⁵, demostrando que el comienzo de la calcificación sucede previamente a la detección de la misma con las tinciones de rojo de alizarina y von Kossa. Las nanopartículas de Ca/P se encontraron en la zona celular de la media (correspondiente a las VSMC), pero para su localización exacta en las células o fuera de ellas, se requiere un análisis más exhaustivo por TEM.

Así mismo, los cambios celulares continuaron, con la sobreexpresión de BMP2 (detectada tanto por PCR en tiempo real (Figura 24 A) como por IHC (Figura 28 B)) en las ratas nefrectomizadas, tras 12 semanas desde la nefrectomía, y por lo tanto con la activación de la ruta BMP2-Runx2 (este último se encontraría sobreexpresado a las 16 semanas, como se muestra en la figura 25 A), lo que confirmaba lo observado por otros grupos¹⁹³, aunque continúa sin estar claro el activador de esta ruta. HOXA10 ha sido descrito como un factor inducido por BMP2, y que activa la expresión de Runx2¹⁹⁴. En nuestro caso, si embargo, HOXA10 apareció expresado tanto en los controles como en la mayoría de los grupos de nefrectomizadas pero su expresión fue mínima y posterior a la Runx2 (Figura 26 D), Esto podría deberse a la existencia de otro factor inductor de la expresión de Runx2, como por ejemplo ciertos factores de transcripción Smad, o las β -catenina¹⁹⁵ (pudiendo ser inducida por Wnt con actividad ligeramente rescatada a las 16 semanas tras la nefrectomía por la disminución de la producción de Dkk1 respecto a las 12 semanas), quedando HOXA10 en un lugar secundario en

los primeros momentos de la transdiferenciación en la CVM y adquiriendo un papel activador adicional de esta diferenciación.



Diferentes rutas de activación de Runx2 propuestas^{184,185}.

Así mismo, tras la sobreexpresión de Dkk1 y TNAP, en el siguiente punto temporal (12 semanas tras la nefrectomía), observamos un aumento de la expresión de ARN que codifica la proteína reguladora del transporte de PPI, ANKH (Figura 24 C). La proteína y su implicación en la artritis fueron descritas por primera vez en el año 2000¹⁹⁶, y desde entonces su implicación en diversas enfermedades generadas tanto por exceso como por defecto de PPI ha sido ampliamente estudiada. A día de hoy está establecido que ANKH participa en la salida de PPI intracelular, si bien otras funciones con relación al PPI están bajo estudio. A pesar de que la forma en la que la producción de ANKH es señalizada no está en todos los casos clara (de hecho un artículo defiende que la expresión de ANKH está disminuida en la CV, si bien de nuevo se trata de un artículo *in vitro* con condiciones excesivas de Pi¹⁹⁷), un detalle muy interesante es su posible activación por TGF- β ¹⁹⁸, siendo éste un activador así mismo de la ruta endotelio-mesenquimal (como se ha comentado previamente). De nuevo, en este caso se pueden proponer diferentes hipótesis sobre la ruta de activación de ANKH, pero el origen de esta señal creemos que puede estar relacionado con el aumento de TNAP en las arterias, de forma que las células que conservan el fenotipo contráctil fisiológico, aumentan la salida de PPI al exterior como mecanismo defensivo frente

a este aumento de TNAP y el desencadenamiento de la calcificación que este podría generar. De hecho, tras el primer pico de expresión de ANKH, 12 semanas tras la nefrectomía, éste va disminuyendo de forma significativa, lo que podría estar asociado con una pérdida progresiva del fenotipo contráctil.

Otro gen relacionado con el metabolismo del P_{Pi}, es ENPP1 (Figura 26B), el cual codifica la proteína ectonucleotido pirofosfatasa/fosfodiesterasa (eNPP1), que genera P_{Pi} a partir de ATP. En nuestro caso, sólo observamos aumento de la expresión de ARN de ENPP1 a las 20 semanas, posiblemente asociado a que las cada vez menos VSMC que van quedando con el fenotipo original, intentan frenar la calcificación produciendo mayor cantidad de P_{Pi}, dado que en ese momento sólo con la translocación del mismo no es suficiente. Tanto los resultados de ANKH como los de ENPP1 parecen corroborar la ausencia de cambios detectados en el P_{Pi} detectado en las aortas (Figura 21B), puesto que se intenta mantener la concentración de P_{Pi} en el ambiente celular, para frenar la formación de hidroxapatita. La importancia del control de las concentraciones de P_{Pi}, podría extrapolarse al P_{Pi} circulante (Figura 34B), en el que tampoco se observaron cambios, puesto que dichos cambios podría tener consecuencias drásticas tanto de calcificación ectópica masiva por defecto de P_{Pi}, como de osteodistrofia por exceso del mismo.

Existe otra teoría, propuesta por el Dr. Millan¹⁹⁹, en la que tanto TNAP, como ENPP1 y PHOSPHO1 (la tercera fosfatasa cuyo posible papel en la CV ha sido estudiado), son los encargados principales de desencadenar las calcificaciones ectópicas por un sistema en el que las tres proteínas participan de forma organizada. En el sistema propuesto, el P_{Pi} generado por ENPP1, no sería más que “más leña al fuego” para TNAP, que lo degradaría, aumentando la cantidad de Pi disponible en el ambiente para ser incorporado a las vesículas de matriz, donde en teoría se estarían generando los primeros cristales. Esta teoría tiene lógica pero presenta varios detalles a comentar. En primer lugar, la concentración de P_{Pi} ya hemos observado que se mantiene invariable en el tiempo, pero aunque para mantener esta concentración se generara más P_{Pi} en la célula como consecuencia de una destrucción masiva por parte de la TNAP, las concentraciones de P_{Pi} se sitúan en el rango de micromolar, generándose un aumento despreciable de la concentración de Pi al ser destruido. Además, al menos en nuestro caso la

distribución temporal de los cambios no sigue el patrón propuesto por el Dr. Millan, puesto que, si bien la TNAP se sobreexpresa en gran medida al principio, el aumento de ENPP1 es más tardío (a las 20 semanas tras la nefrectomía), y además, a pesar de que en su artículo se considera que PHOSPHO1 y TNAP no tienen un rol redundante, sí que es cierto que según lo observado en nuestro laboratorio, PHOSPHO1 parece que podría correlación negativa respecto a TNAP (Figura 23B), casi desapareciendo en el momento de máxima expresión de la misma, y sobreexpresándose al final (20 semanas tras la nefrectomía) cuando el aumento de TNAP en el grupo de las nefrectomizadas es mínimo respecto al grupo control (Figura 24B). Por otro lado, PHOSPHO1 es considerada como una fosfatasa colaboradora en la calcificación fisiológica (aunque no imprescindible, puesto que su ausencia no implica desaparición de la calcificación), por lo que puede que las VSMC transdiferenciadas a fenotipo osteoblástico comiencen a producir las como los osteoblastos verdaderos¹⁶⁸ aumentando la detección de PHOSPHO1 a medida que se diferencian mayor número de VSMC.

Por otro lado, las células más diferenciadas hacia un fenotipo osteoblástico, también fueron expresando otros genes propios de su linaje²⁰⁰, como puede ser la osteopontina (OPN), la cual se encontró a las 20 semanas (Figura 26), posiblemente asociado al aumento de la población celular con fenotipo tipo osteoblástico.

Otra pareja de genes sobreexpresados en los animales nefrectomizados, en este caso 16 semanas tras la nefrectomía, fueron los transportadores Na-dependientes de Pi Pit1 y Pit2 (Figura 25B y C). Mucho se ha hablado del papel estos transportadores en los experimentos de calcificación vascular *in vitro*, considerándose durante un largo tiempo los responsables de la calcificación vascular por aumento de la incorporación de Pi a las VSMC, lo que en teoría acababa desencadenando estrés oxidativo y apoptosis^{140,201}. Como actualmente ya sabemos, y se ha comentado previamente, estos experimentos *in vitro* han de ser tomados con cautela, dados los graves errores experimentales analizados al principio de esta discusión.. Además, como nuestro propio equipo publicó hace años, tanto Pit1 como Pit2 se encuentran saturados en condiciones fisiológicas¹⁵⁶, y tras exponer a VSMC a varios factores considerados como procalcificantes, la expresión de los mismos en la membrana celular *in vitro*, no cambiaba¹⁵⁹, y

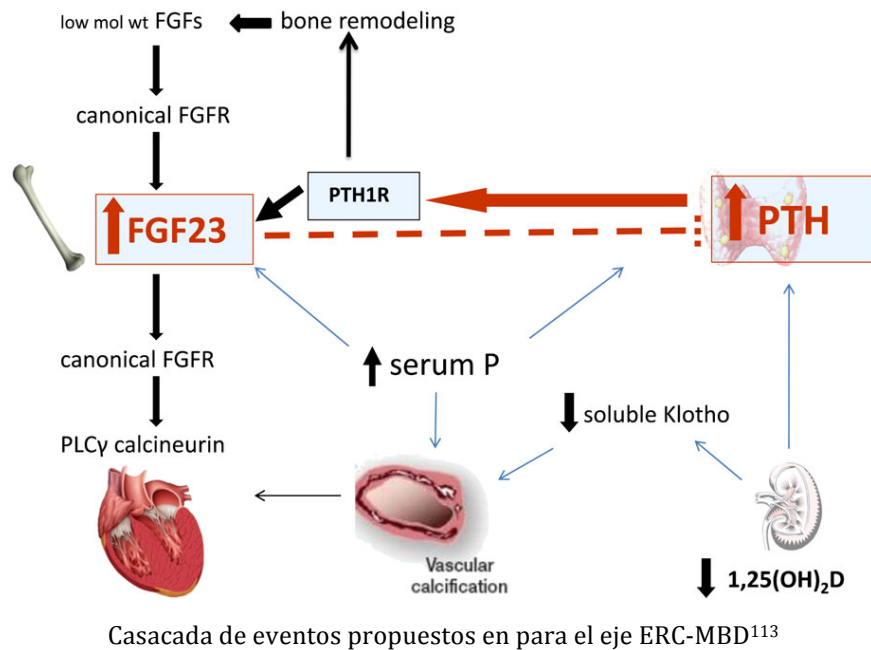
tampoco lo hacía la incorporación de Pi a las VSMC (dado que para que existiera un aumento de la incorporación de Pi a la células haría falta una mayor número de transportadores). En este caso, hemos detectado un aumento de la expresión de ARN de ambos transportadores (no se pudo realizar el análisis por IHC debido a que los anticuerpos no funcionaron bien para esta técnica, y tampoco para la de inmunofluorescencia) en las aortas de animales urémicos, en los que se esta produciendo una transición hacia un fenotipo osteoblástico. Al ser un estudio descriptivo, no se puede inferir ningún papel concreto para estas proteínas, si bien con los datos conocidos hasta la fecha sobre ambos transportadores, podemos especular varias posibles funciones. Por ejemplo, estos podrían estar aumentando la incorporación de Pi en las células de tipo osteoblástico para la formación de vesículas calcificantes por mayor incorporación de Pi, o bien podrían estar frenando la cascada apoptótica inducida por $\text{TNF}\alpha^{157}$ (de hecho la sobreexpresión de $\text{TNF}\alpha$ autocrino se detectó tras 16 semanas, como la de Pit 1 y 2 (Figura 25D), aunque el $\text{TNF}\alpha$ circulante no se encontró alterado en los estadios de la ERC estudiados (Figura 34A)), o bien podrían tener un papel señalizador desconocido. Para confirmar cualquiera de estos papeles de Pit1 y 2, estudios se requieren estudios futuros funcionales, si bien es cierto que su sobreexpresión aparece cuando la CV ya esta en marcha, por lo que su papel presumiblemente colaborador pero no desencadenante de la misma, como podría desprenderse también del aumento del Pi plasmático tan solo en estadios avanzados de la ERC (Figura 32B).

Otra incógnita que debería resolverse en el futuro es el papel de citoquina $\text{TNF}\alpha$ durante la CVM. Si bien es posible que esté induciendo ciertas rutas apoptóticas, en el hueso se considera que junto con $\text{NF-}\kappa\beta$, presenta un efecto anticalcificante, aunque insistimos que no esta claro su efecto en arterias (si bien su importancia se ha estudiado más en la CV de la íntima), e incluso se ha observado que en diferentes tipos celulares su presencia genera cambios diferentes²⁰².

Finalmente, de todos los resultados obtenidos, quedan por comentar los cambios específicos de la ERC-MBD, es decir Klotho, FGF23, PTH, Ca y Pi. Recientemente (hace unos pocos meses) se ha incluido a Dkk1, esclerostina, ActRII,..., dentro de la ERC-MBD^{91,98,122}, pero hemos preferido separarlo por el momento dentro de su propia sección, debido a la descripción tan novel de su

papel en la CVM asociada a ERC¹²³. De todos modos, para futuras investigaciones son factores que han de tenerse muy presentes en el estudio de la ERC-MBD (y de la CVM), dado que además de haberse demostrado su rol en la parte de patología vascular, su trabajo en la regeneración renal y su efecto en hueso^{119,122,189} están descritos y han sido implicados también en la CV de origen diabético^{203,204}. Volviendo a los factores tradicionalmente implicados en la ERC-MBD (y por lo tanto en la CVM), en nuestro caso observamos un aumento significativo del FGF23 circulante en el plasma de ratas nefrectomizadas, en todos los tiempos experimentales, con respecto al grupo control (Figura 33 A), así como un aumento del PTH (Figura 33 B) y Pi (Figura 32 B) plasmáticos a las 20 semanas en el grupo de las ratas nefrectomizadas. En el Ca²⁺ circulante no se observó, sin embargo, ningún cambio (Figura 32A). La interpretación de estos resultados ha de ser cuidadosa, dado que nuestro grupo de animales nefrectomizados, fue alimentado con el doble de Pi que el grupo control, y dado el papel fosfatúrico de FGF23, la diferencia entre ambos grupos experimentales podría ser (al menos en parte) sobreestimada debido a ese artefacto experimental, aunque si bien existen artículos que describen los cambios de FGF23 en plasma con cambios de Pi en la dieta, también existen artículos que niegan el efecto de la ingesta de Pi sobre el FGF23 circulante¹¹⁷. Aún en el caso de que FGF23 se vea afectado por la ingesta de Pi (que es lo más aceptado), también hay que tener en cuenta que la subida de los niveles de FGF23 en el plasma es creciente, por lo que estos cambios tienen carácter progresivo, y por lo tanto no pueden ser únicamente asociados a una diferente concentración de Pi en la dieta. La explicación a este aumento de la FGF23 viene asociada, como comentábamos en la introducción, a una disminución de la eliminación de Pi en los túbulos renales, debido a una creciente falta de unidades funcionales, que genera una acumulación de Pi en la sangre, y una mayor liberación de FGF23 desde el hueso, que fuerza a las nefronas sanas a hiperfiltrar el Pi del plasma, manteniendo su eliminación, y por lo tanto su homeostasis. Así mismo, se puede interpretar, que FGF23 se encarga de mantener en un principio los niveles circulantes de Pi, pero llega un momento de la ERC en el que no es suficiente, y la concentración de PTH aumentan para forzar aún más esta eliminación²⁰⁵, alcanzando un punto en el que nada es suficiente y se produce la hiperfosfatemia.

A cascade of factors contributing to CKD-MBD

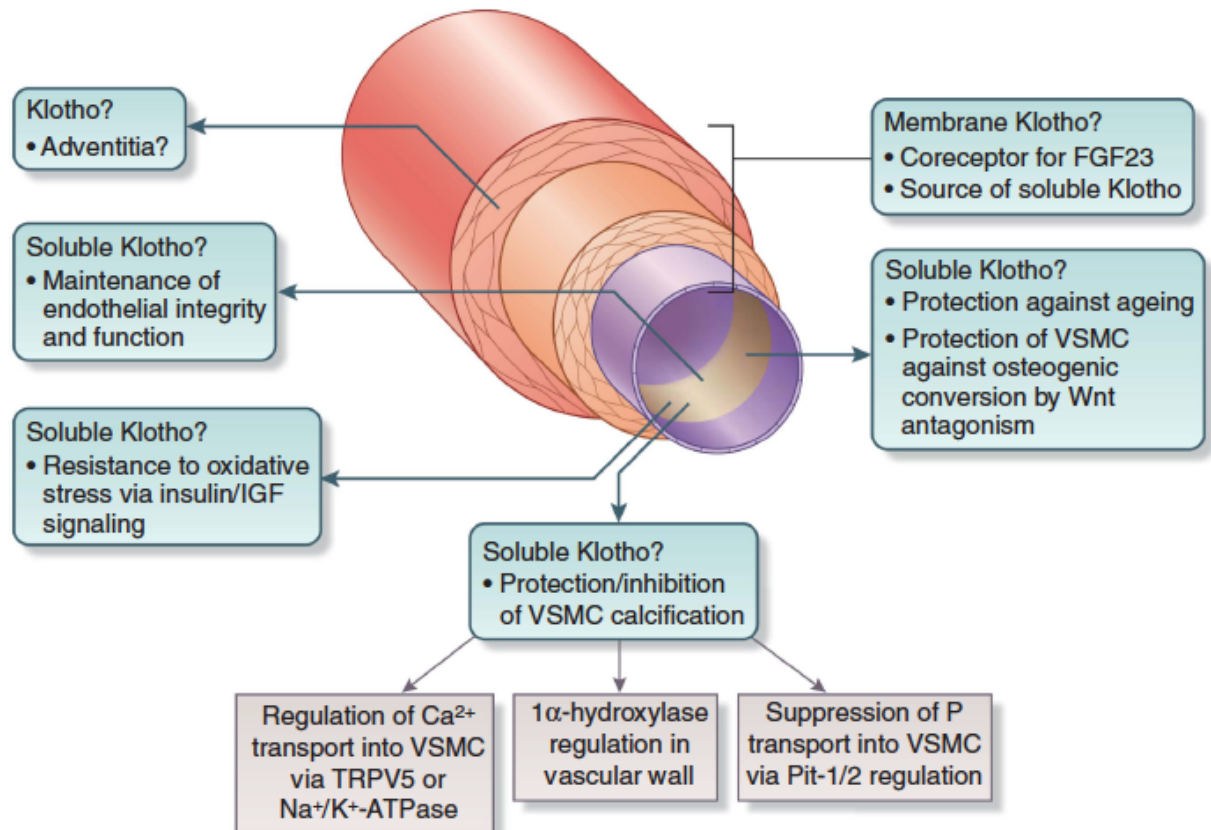


A pesar de que en un principio se consideró como condición necesaria la subida de PTH para generar un aumento de la liberación de FGF23²⁰⁶, en nuestro caso hemos visto lo contrario, habiéndose descrito este aumento de FGF23 previo al de PTH en varios artículos, como por ejemplo, el estudio poblacional humano en enfermos de ERC en grado 2 a 4 llevado a cabo por Isakova y cols⁹⁹. Si bien el papel de FGF23 en el desarrollo de hipertrofia cardiaca ha sido previamente descrito¹⁰³, su influencia en el desarrollo de CV parece incierta, existiendo varios estudios en los que el FGF23 parece no tener ninguna implicación^{94,96} en el desarrollo de la CV. Por un lado puede que FGF23 no tenga un efecto directo sobre la calcificación vascular, si bien es cierto que por otro lado la hiperfosfatemia lo tiene, acelerando el desarrollo de la misma, por lo que, en cierto modo, papel fosfático de FGF23 como mínimo debería ser considerado como protector frente al avance de la CV e incluso utilizarse como biomarcador de ERC y CV.

Existe una gran controversia con otra molécula relacionada con el FGF23, el factor antienvjecimiento Klotho, puesto que esta proteína activa al receptor de FGF23, favoreciendo su señalización específica en los tejidos²⁰⁷, y durante la ERC su expresión renal está disminuida. Hasta tal punto llega el desconocimiento del verdadero papel de Klotho, que aún no existe un acuerdo sobre su presencia o no en los vasos sanguíneos. Existen artículos que la niegan por diversos métodos de

detección^{94,96}, si bien muchos otros lo han localizado en diferentes modelos animales y en humanos^{93,97,208}. En nuestro caso, como se observa en la figura 24 D, las arterias de los animales sanos (control), presentan expresión de ARN de klotho, la cual incluso se observa aumentada significativamente en todos los grupos de animales nefrectomizados después de 12 semanas de la nefrectomía. Para corroborar que este ARN se tradujera a proteína, también llevamos a cabo IHC con diferentes anticuerpos anti-klotho para diferentes epítomos del mismo. Como se observa en la figura 28 C1 y C2, los resultados obtenidos para ARN fueron confirmados también para proteína por medio de esta técnica. Es necesario comentar que los cebadores diseñados para klotho, fueron localizados zona del RNA codificante de la parte Kl2 de la proteína, correspondiente con el Klotho completo, así mismo el anticuerpo K2119, mostrado en la figura C2, corresponde a este mismo epítomo, (no se conoce la localización de destino del anticuerpo C1, puesto que la casa comercial, Santa Cruz, no lo indica). Por otro lado, al utilizar el anticuerpo K2076, el cual se supone que se une a la parte Kl1 de la proteína (la circulante), no obtuvimos tinción positiva ni en las control ni en las nefrectomizadas. Debido a que el lugar Kl1 parece estar presente en todas las formas de Klotho, y tanto en la forma circulante de klotho como en el completo, podríamos deducir que estos experimentos no funcionaron debido a la gran variabilidad de eficacia de los anticuerpos²⁰⁹. Dado que en nuestro caso se confirmó la presencia de Klotho tanto por cuantificación de ADNc como por IHC, y que esa presencia se observó alterada en la ERC, podríamos sumar estos resultados a la evidencia de que Klotho sí que participa en la ERC-MBD. Determinar cuál es el papel de Klotho en la CVM no fue el propósito de nuestro estudio, pero cabe decir, que todavía queda mucho por investigar sobre el tema, con una gran variedad de teorías patogénicas existentes en este momento, incluyendo la intervención en la señalización de Wnt y TGF- β , Pit1 y Pit2⁹⁵, lo cual tras todo lo comentado en esta discusión, resulta más que interesante y prometedor.

THE VASCULAR SECRETS OF KLOTHO



Posibles funciones de Klotho en las arterias⁹⁵.

En resumen, en esta descripción de los primeros eventos que tienen lugar en la CVM asociada a ERC, hemos detectado numerosos en la aorta y plasma sanguíneo. Los cambios de expresión de proteínas implicadas en el cambio fenotípico de las VSMC previos a la aparición de los primeros depósitos de calcio, están acompañados además de una mayor concentración de urea, creatinina y FGF23 en el plasma. Tras estos primeros cambios moleculares, los primeros acúmulos de calcio fueron localizados por SEM y FSEM, así como un aumento en la concentración total de Ca^{2+} aórtico, sin aparecer todavía tinciones positivas de rojo de alizarina y von Kossa. En este estudio también se aclara el orden en el que se van produciendo ciertos cambios celulares hacia un fenotipo osteoblástico (posiblemente previo paso por uno menos diferenciado como es el de las células mesenquimales debido a una desdiferenciación). Estos cambios no son absolutos y lo que observamos como aumentos significativos está probablemente asociado a un incremento progresivo del número células que presentan las proteínas estudiadas y que desarrollan vesículas de membrana calcificantes, si bien éstas siguen conviviendo con VSMC sanas, con fenotipo contráctil hasta que finalmente

la calcificación afecta a la la túnica media en toda su extensión de las zonas calcificadas, en los casos terminales de la enfermedad. Así mismo todos estos cambios se producen antes o al mismo tiempo que Pi y PTH aumentan en el plasma, por lo que el papel de ambos parece ser más tardío, contribuyendo a una más rápida calcificación en el caso de la hiperfosfatemia, e intentando aumentar la eliminación de Pi en el caso de la PTH. Finalmente, en nuestro caso hemos detectado la presencia de Kl2 tanto en aortas sanas como en aortas de animales enfermos, encontrándose esta expresión aumentada en los animales urémicos.

PARTE 3. SOBRE LOS ESTUDIOS DE TRANSPORTE DE ³²P EN VSMC.

Una de los interrogantes sobre los que se ha especulado mucho una vez que se instauró el método de calcificación de VSMC *in vitro* mediante elevadas concentraciones de Pi, y que ha sido revisado en esta tesis, fue el de la incorporación celular de fosfato por medio de Pit1 y Pit2 (transportadores NaPiIII), así como su relación con la calcificación vascular. Inicialmente se propuso que las células vasculares transportarían más Pi cuando la concentración de éste aumentase, como ocurre en la hiperfosfatemia¹⁴⁰. Esa propuesta, basada en modelos *in vitro*, fue posteriormente fue desmentida por nuestro laboratorio¹⁵⁶, demostrando que el transporte de Pi se encuentra ya saturado en las VSMC en condiciones fisiológicas de Pi (es decir, cercanas al 1 mM). También se ha repetido muy frecuentemente la afirmación de que en las VSMC el transporte de Pi aumenta durante la calcificación (en casi cualquier revisión de la calcificación vascular lo ha citado desde el año 2000 hasta hoy en día se puede encontrar esta referencia), incluso afirmando que este hecho es el desencadenante de la patología. Para que esta afirmación fuera cierta, sería necesario un aumento de la V_{max} del sistema (implicando una mayor cantidad de transportadores activos en la membrana celular), o bien una menor salida del Pi transportado a la célula. En nuestro laboratorio se probó el efecto de varios agentes supuestamente calcificantes¹⁵⁹, sin obtener ningún cambio en el transporte o en la expresión de Pit 1 y Pit2 en la membrana celular (sí que se observó aumentada, por otro lado, la expresión total de los mismos). Esto parece indicar, que el papel de Pit1 y Pit2 pudiera ser mas de señalización intracelular como se ha descrito en otros artículos¹⁵⁷, que como transportadores de Pi.

Si bien ya se estableció en los artículos de nuestro laboratorio comentados previamente la existencia de dos componentes en el transporte de Pi en VSMC (uno sodio dependiente y otro sodio independiente) y se llevaron a cabo sus curvas de inhibición, no se ha seguido investigando mucho más al respecto, y si bien Pit1 y Pit2 (los responsables del transporte Na-dependiente en este tipo celular) están ampliamente descritos, poco se sabe de los transportadores de Pi Na-independientes²¹⁰ y en concreto del o de los transportadores responsables en VSMC. En esta última parte de la tesis doctoral, nos hemos centrado en una

caracterización más profunda del transporte Na-independiente de Pi en VSMC, un análisis de expresión de posibles transportadores encargados de ese componente, determinando finalmente nuevos datos novedales sobre el cotransporte de Pit1 y Pit2, así como cambios de su expresión durante los cambios de fenotipo en las VSMC *in vitro*. Finalmente, durante estos estudios revelamos la existencia de un sistema de salida de Pi Cl⁻ dependiente en las VSMC. Debido a la variedad de resultados obtenidos, de nuevo segmentaremos la discusión en varios apartados para llevar a cabo una conclusión global al final.

CARACTERIZACIÓN DEL TRANSPORTE Na-INDEPENDIENTE EN VSMC

Para confirmar los resultados previamente obtenidos, y a partir de ahí, continuar la caracterización en profundidad del componente Na-independiente de Pi en VSMC, en primer lugar repetimos las cinéticas de inhibición con Pi que tiempo atrás se habían realizado en el laboratorio, tanto en presencia como en ausencia de sodio. Los resultados obtenidos, y que se muestran en la figura 35, son similares a los obtenidos previamente¹⁵⁶, por lo que procedimos con la caracterización del componente del transporte Na-independiente, utilizando como control el Na-dependiente. En primer lugar, estudiamos la influencia del pH sobre este transporte, observando que el componente Na-dependiente se comportaba como se esperaba (Figura 37 A), es decir, disminuyendo a medida que subía el pH (esto es debido a que tanto Pit1 como Pit2 transportan fosfato monovalente, y a medida que el pH asciende el fosfato pierde un segundo protón, pasando a ser divalente). Sin embargo, el transporte Na-independiente no varió de forma significativa en ningún caso desde pH 6 hasta pH 8.5 (Figura 37 B), asumiéndose que el transporte de Pi es independiente de la especie, y que además no parece existir un cotransporte de H⁺, a diferencia del transporte Na-independiente en células CaCo2 (modelo *in vitro* de transporte de Pi en intestino)²¹⁰.

Por otro lado, hemos llevado a cabo estudios de inhibición con aniones que podrían compartir rutas de transporte con el fosfato. En el caso del transporte Na-dependiente, simplemente se confirmaron los resultados ya conocidos (Figura 36 A), no viéndose inhibido por sulfato, bicarbonato u oxalato de potasio, y en este caso tampoco por ácido fosfonofórmico (ya que, como es conocido, sólo inhiben

competitivamente los transportadores de tipo II, no expresados en las VSMC). Sí que se observó una potente inhibición con el arseniato de potasio, siendo ésta casi de la magnitud de la obtenida como control positivo, consistente en Pi como inhibidor (5 mM). Un hallazgo novel fue la observación de SITS y DIDS como inhibidores moderados (50% de inhibición aproximadamente) del componente Na-dependiente del transporte de Pi en VSMC, y por ende, inhibidor de los transportadores de Pi de tipo III. Si bien estos transportadores han sido ampliamente caracterizados, ésta es la primera vez que se ha observado este tipo de inhibición. Aunque no lo hemos incorporado a esta tesis, en la actualidad estamos caracterizando esa inhibición, y se va a continuar con la expresión de PiT1 y PiT2 en ovocitos de *Xenopus laevis*.

En cuanto a las pruebas de inhibición realizadas en el componente Na-independiente, se determinaron como inhibidores significativos el sulfato, bicarbonato y arseniato, que inhibieron hasta el mismo nivel que el propio Pi, así como el ácido fosfonofórmico, con una inhibición parcial, similar a la de SITS o DITS. El oxalato, por otra parte, no actuó como inhibidor, según muestra la figura 42. Con estos resultados, el paso siguiente consistiría en definir el tipo de inhibición que cada molécula está llevando a cabo sobre el o los transportadores Na-independientes, a fin de definir definitivamente si se trata de un cotransportador de otros compuestos como paso previo a su identificación molecular.

ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES Na-INDEPENDIENTES

Dada la potente capacidad inhibidora del sulfato y el bicarbonato, decidimos comprobar la expresión en las VSMC de proteínas que transportaran uno, dos o ambos, en ausencia de sodio. Por PCR amplificamos los SLC4A2, A3 y A4, así como los SLC26A2, 6, 8, 10 y 11 (variantes I, II y IV). Tras su detección, se llevaron a cabo estudios por PCR en tiempo real de los cambios que se generaban con la confluencia (puesto que llegados a este punto ya habíamos localizado dichos cambios en los diferentes componentes del transporte de Pi en las VSMC). Los resultados mostraron que todos excepto SLC4A2 y A4 y SLC26A10 y A11 (variantes I, II y IV), veían disminuida su expresión antes de llegar a la confluencia,

mientras que los 4 transportadores citados la mantenían. Dado que se observa un mayor porcentaje del transporte de Pi asociado al componente Na-independiente antes de llegar a la confluencia, la expresión de estos transportadores se supuso que debía ser igual o mayor (si bien esto no es del todo cierto puesto que no se tiene noción de si su supuesto transporte de Pi se encuentra saturado en las condiciones utilizadas en estos experimentos, es decir 1 mM Pi) durante este período que al alcanzar la confluencia. Otra opción posible en este caso sería un menor transporte por parte del componente Na-dependiente, para lo que sería necesaria una menor expresión de Pit1, Pit2 o ambos (como veremos más adelante en esta discusión, este fue el caso). Con toda esta información, realmente no se puede asegurar nada, por lo que si bien existe una ligera posibilidad de que el o los transportadores responsables del transporte Na-independiente fueran SLC4A2, A4 o SLC26A11 (SLC26A10 es un pseudogen), ninguno de los anteriormente citados puede ser descartado. Para salir de dudas a este respecto, sería necesarios estudios posteriores, comenzando por la inhibición de la expresión de estos transportadores, y observando las consecuencias en el componente Na-independiente del transporte de Pi en VSMC. Igualmente, estos transportadores potenciales pueden ser expresados en sistemas heterólogos, como ovocitos de *Xenopus laevis*, o en otras células eucariotas. Si bien tanto SLC4A2 como el A7 cotransportan HCO_3^- y Cl_2^- , es interesante el hecho de que el A7 no se vea afectado demasiado por DIDS¹⁷², aunque por otro lado se ha descrito su presencia sobre todo en la membrana basolateral. De la familia SLC26, el transportador A11 está caracterizado por transportador SO_4^- , pero también HCO_3^- y Cl_2^- , aunque de forma mucho menos efectiva, así mismo, presenta cierta resistencia a la inhibición DIDS, y su transporte es electroneutro²¹¹. Dadas todas estas características, posiblemente el SLC26A11 sería un buen candidato por el que empezar los estudios de inhibición de la expresión y su correlación con el transporte Na-independiente en VSMC. Los experimentos de siRNA o expresión heteróloga no se han llevado a cabo todavía debido a la falta de presupuesto para ello.

TRANSPORTE DE FOSFATO EN AUSENCIA DE CLORO

Dada la posibilidad de que el sistema de transporte de Pi Na-independiente, estuviera mediado por alguno de los transportadores citados en el punto anterior, y dado que todos cotransportan cloro, decidimos estudiar los cambios en el transporte en privación de este ión. Para ello, se sustituyó equimolarmente el cloruro de colina por gluconato de N-metil-D-glucamina, utilizándose como control la base N-metil-D-glucamina neutralizada con ácido clorhídrico para aislar el efecto del gluconato. En el caso del transporte Na-dependiente se utilizó NaOH neutralizado con gluconato. Para nuestra sorpresa, la ausencia de cloro no inhibió el transporte de Pi Na-independiente, sino que lo aumentó (Figura 40 A). La explicación más lógica fue que el ^{32}P se estaba acumulando en las células debido a que su incorporación estaba siendo correcta, pero su salida se encontraba disminuida, o ambas posibilidades. Esto supondría la existencia de un sistema de salida de Pi dependiente de ion cloruro, y para corroborarlo, se realizó el mismo experimento pero en presencia de sodio. Como se observa en la figura 40 B, los resultados obtenidos siguieron la misma línea que los del componente Na-independiente, dando más peso a nuestra teoría sobre la existencia de una salida Cl-dependiente de Pi de las VSMC. Queda pendiente para futuros trabajos la identificación de la proteína o proteínas responsables de este fenómeno, si bien por el momento, en la literatura sólo se ha propuesto un transportador de Pi de salida, el XPR1²¹² pero que en las VSMC no se encuentra expresado (información obtenida en www.GenCards.org, y corroborada con experimentos de expresión por PCR real time en nuestro laboratorio).

PLASTICIDAD FENOTÍPICA DE LAS VSMC Y SU RELACIÓN CON EL TRANSPORTE DE FOSFATO

Debido a la variabilidad fenotípica previamente descrita en las VSMC¹⁴, se decidió estudiar un posible cambio de expresión en los transportadores de Pi conocidos en VSMC, Pit1 y Pit2, según las condiciones de cultivo. En efecto, se detectó una disminución de la expresión (tanto de RNA, como de proteína por WB) de Pit1 antes de alcanzar la confluencia respecto a las células que ya la habían

alcanzado (Figura). Estudiamos así mismo las expresiones de proteínas características del fenotipo contráctil (SM22 α , calponina y α -actina), encontrándose éstas aumentadas (Figura 42 A) en las VSMC en confluencia (aunque en el caso de la calponina no se observó dicha diferencia en la proteína cuantificada por WB cómo se muestra en la figura 42 B), por lo que estas proteínas coinciden con el patrón de expresión de los transportadores de Pi. En cuanto a MGP, como proteína sobreexpresada en el fenotipo proliferativo, obtuvimos los resultados tal y como se habían descrito previamente, aumentados en las células no confluentes¹⁴. A raíz de este novel hallazgo, llevamos a cabo experimentos de transporte de Pi en presencia de sodio en células antes de la confluencia y en células confluentes, obteniendo un menor porcentaje de dicho transporte asociado al componente Na-dependiente en las células antes de llegar a la confluencia (Figura 41), y confirmándose que en el estudio de las VSMC hay que controlar de forma muy precisa el fenotipo que presentan para no generar resultados no relacionados con el fenotipo estudiado.

Todos estos hallazgos nos indican que aunque cada día se sabe más de la regulación y funcionamiento de la homeostasis del Pi, todavía queda mucho por aclarar. Sobre el hallazgo de la inhibición de Pit1 y/o Pit2 por SITS y DIDS, inhibidores del transporte de cloro²¹³⁻²¹⁵, a pesar de que han sido descritos efectos secundarios en otros tipos de transporte, por el momento no se puede especular nada más, siendo necesario establecer, como mínimo, el tipo de inhibición que llevan a cabo. Así mismo, de nuevo la plasticidad fenotípica de las VSMC aparece en escena, pudiendo inducir a errores experimentales en el estudio del transporte de Pi, si no se tienen en cuenta las variaciones de expresión que hemos encontrado en este trabajo, y que se suman a los cambios previamente descritos. Así mismo, se ha estudiado los cambios de expresión de las proteínas de las familias SLC26 y 4 encontradas en las VSMC de rata, asociados a los cambios fenotípicos que experimentan estas células en cultivo. Esto aporta también un poco más de información sobre posibles candidatos a cotransportar Pi de forma Na-independiente, presentándose el SCL26A11 como principal candidato para ser estudiado debido a su transporte electroneutro de HCO₃⁻ y SO₄⁻ y su resistencia a SITS y DIDS. Finalmente, para apuntar hacia estas familias de transportadores y al

SLC26A11 en concreto, se ha caracterizado de forma mas extensa el transporte Na-independiente en VSMC, obteniéndose inhibiciones con ácido fosfonofórmico, arseniato, HCO_3^- y SO_4^- , así como resistencia a alteraciones del transporte en función del pH, de lo cual se puede intuir que es un transporte indiferente a la especie de fosfato y no H^+ -dependiente. Si bien no se ha localizado todavía el o los transportadores responsables de este transporte de Pi en ausencia de sodio, creemos que con la información aportada prono esto será posible.

VI. CONCLUSIONES

1. SOBRE LA CALFICIACIÓN VASCULAR *IN VITRO*

- Los cambios de pH y la concentración de bicarbonato inducen la precipitación homogénea de ACP en MEM y DMEM con concentraciones de 2 y 3 mM de Pi.
- Las nanopartículas de ACP acaban formando depósitos en los cultivos de VSMC, que con el paso del tiempo incorporan más calcio y crecen, termodinámicamente mas fácilmente y se organizan en forma de cristales de HAP.
- Los nanoprecipitados generados en los medios con alto fosfato inducen muerte celular u osteodiferenciación en las células supervivientes.
- No se puede descartar que una precipitación heterogénea (orgánica o inorgánica), colabore en el desarrollo de los eventos que tienen lugar *in vitro*, si bien no es necesaria para que estos tengan lugar.
- En DMEM con 2 y 3 mM de Pi, y en MEM con 3 mM de Pi, la precipitación homogénea tiene lugar incluso dentro de la estufa de 5% CO₂ a 37°C y con una humedad relativa del 100%.
- Para evitar la aparición de este artefacto experimental, un hipotético modelo *in vitro* debería basarse en condiciones fisiológicas (o fisiopatofisiológicas), es decir: Fuerza iónica (I)=0.15 M, aproximadamente 1.25 mM de calcio y aproximadamente 2 mM de Pi, condiciones de quiescencia (SFB<0.5%), además de un pH a 37 °C que se mantenga de forma apropiada a 7.4, y agentes inductores de la transdiferenciación celular y la calcificación específicos como el suero urémico.

2. SOBRE LAS PRIMERAS ETAPAS DE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR EN RATAS CON NEFRECTOMÍA 5/6

- La transdiferenciación en las aortas de ratas nefrectomizadas comienza con el aumento de la expresión de TNAP y Dkk1 y tiene lugar antes que la formación de los primeros depósitos de la media.
- La concentración de FGF23 en el plasma sanguíneo de las ratas urémicas es creciente en el tiempo y aparece aumentada desde el primer momento temporal estudiado.
- El aumento de la cantidad de calcio aórtico y la visualización de los primeros depósitos de Ca/P detectados por FSEM/SEM se producen de forma temprana y antes de poder ser detectados por las tinciones tradicionales de calcio y fosfato (por lo que estas técnicas no son adecuadas para detectar fases iniciales de la CV).
- Tras los primeros cambios de expresión localizados en aortas, muchos otros son detectados por PCR e IHC, indicando un proceso activo de transformación progresiva de las VSMC hacia un fenotipo osteoblástico, posiblemente previa desdiferenciación hacia células “madre” mesenquimales, si bien faltan estudios que confirmen la relación entre los cambios observados.
- Tanto la concentración de Pi como la de PTH se ven aumentadas cuando los cambios celulares de la CV ya se han establecido, por lo que contribuyen al desarrollo de la calcificación, pero no la desencadenarían.
- Klotho se encuentra expresado en las aortas de las ratas, y su expresión en las mismas aumenta de forma bastante temprana durante la ERC, quedando pendiente establecer el papel que desempeña en la CV.

3. SOBRE EL TRANSPORTE DE Pi EN VSMC

- El transporte Na-independiente de Pi en VSMC no varía con cambios de pH entre 6 y 8.5, por lo que parece transportar indistintamente las dos especies de más comunes de Pi, de forma independiente de protones.
- En ausencia de sodio, el transporte en las VSMC se ve fuertemente inhibido por sulfato, bicarbonato y arseniato, intuyéndose que la proteína o proteínas responsables de este transporte puedan cotransportar estas moléculas. No se inhibe sin embargo por oxalato, y de forma parcial por SITS, DIDS y ácido fosfonofórmico.
- Los miembros de las familias de transportadores SLC26 y SLC4 expresados en VSMC de rata son: SLC4A2,3 y 7 y SLC26A2, 6, 8, 10 y 11. La expresión de SLC4A3 y SLC26A2, 6 y 8 se ve disminuida en las VSMC en estadio proliferativo respecto a la observada con el fenotipo contráctil. Por sus características, SLC26A11 podría ser un buen candidato a estudio como responsable del transporte Na-independiente de Pi en VSMC.
- Pit1 y/o Pit2 se ven inhibidos (hasta un 50%) por los inhibidores del transporte de cloro, SITS y DIDS,.
- Las VSMC, en ausencia de cloro, acumulan más ^{32}P que en presencia de él, tanto en sodio dependencia como en sodio independencia. Esto hace pensar que existe un sistema de salida de ^{32}P en estas células que trabajaría incorporando cloro, y que por lo tanto, en ausencia de este ión, no funciona el intercambio, acumulándose más ^{32}P en el interior de las células.
- Tanto el transporte Na-dependiente, como la expresión de Pit1 se encuentran disminuidos en las VSMC en estado proliferativo cuando se comparan con las VSMC expresando el fenotipo contráctil.

VII. REFERENCIAS

1. Wissler RW. The Arterial Medial Cell, Smooth Muscle, or Multifunctional Mesenchyme? *Circ Res.* 1968;XXXVI(1):1-5.
2. Cinnamon VanPutte JR and AR. Seely's Anatomy and Physiology 6th Ed. 2004:472.
3. Lacolley P, Regnault V, Nicoletti A, Li Z, Michel JB. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: A cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res.* 2012;95(2):194-204. doi:10.1093/cvr/cvs135.
4. Campbell GR, Chamley JH, Burnstock G. Development of smooth muscle cells in tissue culture. *J Anat.* 1974;117:295-312.
5. Karrer HE. THE STRIATED MUSCULATURE OF BLOOD VESSELS: II. Cell Interconnections and Cell Surface. *J Cell Biol.* 1960;8(1):135-150. doi:10.1083/jcb.8.1.135.
6. Rzczidlo EM, Martin KA, Powell RJ. Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *J Vasc Surg.* 2007;45(6 SUPPL.):25-32. doi:10.1016/j.jvs.2007.03.001.
7. Shanahan CM, Weissberg PL. Smooth Muscle Cell Heterogeneity Patterns of Gene Expression in Vascular Smooth Muscle Cells In Vitro and In Vivo VSMC Heterogeneity : Controversies. 1998.
8. Gabbiani G, Schmid E, Winter S, et al. Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78(1):298-302. doi:10.1073/pnas.78.1.298.
9. Hungerford JE, Owens GK, Argraves WS, Little CD. Development of the aortic vessel wall as defined by vascular smooth muscle and extracellular matrix markers. *Dev Biol.* 1996;178(2):375-392. doi:10.1006/dbio.1996.0225.
10. Miano JM, Carlson MJ, Spencer JA, Misra RP. Serum response factor-dependent regulation of the smooth muscle calponin gene. *J Biol Chem.* 2000;275(13):9814-9822. doi:10.1074/jbc.275.13.9814.
11. Kim S, Ip HS, Lu MM, Clendenin C, Parmacek MS. A serum response factor-dependent transcriptional regulatory program identifies distinct smooth muscle cell sublineages. *Mol Cell Biol.* 1997;17(4):2266-2278. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=232076&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

12. Layne MD, Yet SF, Maemura K, et al. Characterization of the mouse aortic carboxypeptidase-like protein promoter reveals activity in differentiated and dedifferentiated vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2002;90(6):728-736. doi:10.1161/01.RES.0000013289.97650.C8.
13. Owens GK, Owens GK, Kumar MS, Kumar MS, Wamhoff BR, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* 2004. doi:10.1152/physrev.00041.2003.
14. C M Shanahan PLW and JCM. Isolation of gene markers of differentiated and proliferating vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1993;73:193-204. <http://circres.ahajournals.org/content/73/1/193>.
15. Camino-López S, Llorente-Cortés V, Sendra J, Badimon L. Tissue factor induction by aggregated LDL depends on LDL receptor-related protein expression (LRP1) and Rho A translocation in human vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 2007;73(1):208-216. doi:10.1016/j.cardiores.2006.10.017.
16. Hoffman BD, Grashoff C, Schwartz M a. Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. *Nature.* 2011;475(7356):316-323. doi:10.1038/nature10316.
17. Schiffrin EL. Circulatory therapeutics: Use of antihypertensive agents and their effects on the vasculature. *J Cell Mol Med.* 2010;14(5):1018-1029. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01056.x.
18. Bézie Y, Lamazière JM, Laurent S, et al. Fibronectin expression and aortic wall elastic modulus in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18(7):1027-1034. doi:10.1161/01.ATV.18.7.1027.
19. Louis H, Kakou A, Regnault V, et al. Role of alpha1beta1-integrin in arterial stiffness and angiotensin-induced arterial wall hypertrophy in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293(4):H2597-H2604. doi:10.1152/ajpheart.00299.2007.
20. Welser J V., Lange N, Singer CA, et al. Loss of the α 7 integrin promotes extracellular signal-regulated kinase activation and altered vascular remodeling. *Circ Res.* 2007;101(7):672-681. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.151415.

21. Virmani R, Avolio AP, Mergner WJ, et al. Effect of aging on aortic morphology in populations with high and low prevalence of hypertension and atherosclerosis. Comparison between occidental and Chinese communities. *Am J Pathol.* 1991;139(5):1119-1129.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1886332&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
22. Fu Z, Wang M, Gucek M, et al. Milk fat globule protein epidermal growth factor-8: A pivotal relay element within the angiotensin II and monocyte chemoattractant protein-1 signaling cascade mediating vascular smooth muscle cells invasion. *Circ Res.* 2009;104(12):1337-1346.
doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.187088.
23. Olofsson SO, Boren J. Apolipoprotein B: A clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis. *J Intern Med.* 2005;258(5):395-410. doi:10.1111/j.1365-2796.2005.01556.x.
24. Khalil MF, Wagner WD, Goldberg IJ. Molecular interactions leading to lipoprotein retention and the initiation of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(12):2211-2218.
doi:10.1161/01.ATV.0000147163.54024.70.
25. Rivière C, Boudghène FP, Gazeau F, et al. Iron Oxide Nanoparticle-labeled Rat Smooth Muscle Cells: Cardiac MR Imaging for Cell Graft Monitoring and Quantitation1. *Radiology.* 2005;235(3):959-967.
doi:10.1148/radiol.2353032057.
26. Bennett MR, Gibson DF, Schwartz SM, Tait JF. Binding and Phagocytosis of Apoptotic Vascular Smooth Muscle Cells Is Mediated in Part by Exposure of Phosphatidylserine. *Circ Res.* 1995;77(6):1136-1142.
doi:10.1161/01.RES.77.6.1136.
27. Visual YJ. Authors ' reply CD68 is not a macrophage- specific antigen Authors ' reply. 1995:342-344.
28. Ho-Tin-No?? B, Le Dall J, Gomez D, et al. Early atheroma-derived agonists of peroxisome proliferator-activated receptor-?? trigger intramedial angiogenesis in a smooth muscle cell-dependent manner. *Circ Res.* 2011;109(9):1003-1014. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.235390.

29. Niskanen L, Siitonen O, Suhonen M, Uusitupa MI. Medial artery calcification predicts cardiovascular mortality in patients with NIDDM. *Diabetes Care*. 1994;17(11):1252-1256. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7821163>.
30. London GM, Guérin AP, Marchais SJ, Métivier F, Pannier B, Adda H. Arterial media calcification in end-stage renal disease: Impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18(9):1731-1740. doi:10.1093/ndt/gfg414.
31. Virchow R. *Cellular Pathology. As Based upon Physiological and Pathological Histology*.; 1863. doi:10.5962/bhl.title.32770.
32. Boström K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1993. doi:10.1172/JCI116391.
33. Shanahan CM, Cary NR, Metcalfe JC, Weissberg PL. High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 1994;93(6):2393-2402. doi:10.1172/JCI117246.
34. Mönckeberg. JG. Über die reine Mediaverkalkung tier Extremitätenarterien und ihr Verhalten zur Arteriosklerose. 1889:141-167.
35. Lanzer P, Boehm M, Sorribas V, et al. Medial vascular calcification revisited: Review and perspectives. *Eur Heart J*. 2014. doi:10.1093/eurheartj/ehu163.
36. Anderson HC. Calcific diseases. A concept. *Arch Pathol Lab Med*. 1983;107(7):341-348.
37. Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM. Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(3):489-494. doi:10.1161/01.ATV.0000059406.92165.31.
38. Shroff RC, McNair R, Figg N, et al. Dialysis accelerates medial vascular calcification in part by triggering smooth muscle cell apoptosis. *Circulation*. 2008;118(17):1748-1757. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.783738.
39. Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, et al. Evidence for Initiation of Vascular Calcification by Apoptotic Bodies. 2006.
40. Clarke M, Bennett M. The emerging role of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis and plaque stability. *Am J Nephrol*.

- 2006;26(6):531-535. doi:10.1159/000097815.
41. Gmbh S. Epidemiologie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit in Deutschland. *Hamostaseologie*. 2006:193-196.
 42. Lehto S, Niskanen L, Suhonen M, Ronnema T, Laakso M. Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16(8):978-983. doi:10.1161/01.ATV.16.8.978.
 43. Aitken E, Ramjug S, Buist L, Kingsmore D. The prognostic significance of iliac vessel calcification in renal transplantation. *Transplant Proc*. 2012;44(10):2925-2931. doi:10.1016/j.transproceed.2012.06.058.
 44. Nguyen AT, Gomez D, Bell RD, et al. Smooth muscle cell plasticity: fact or fiction? *Circ Res*. 2013. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.281048.
 45. Sage AP, Lu J, Tintut Y, Demer LL. Hyperphosphatemia-induced nanocrystals upregulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteopontin genes in mouse smooth muscle cells in vitro. *Kidney Int*. 2011;79(4):414-422. doi:10.1038/ki.2010.390.
 46. Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circ Res*. 2011;109(6):697-711. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.234914.
 47. Schoppet M, Kavurma MM, Hofbauer LC, Shanahan CM. Crystallizing nanoparticles derived from vascular smooth muscle cells contain the calcification inhibitor osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;407(1):103-107. doi:10.1016/j.bbrc.2011.02.117.
 48. Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, Weissberg PL. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res*. 2000;87(11):1055-1062. doi:10.1161/01.RES.87.11.1055.
 49. Shroff RC, McNair R, Skepper JN, et al. Chronic mineral dysregulation promotes vascular smooth muscle cell adaptation and extracellular matrix calcification. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(1):103-112. doi:10.1681/ASN.2009060640.
 50. Kim KM. Calcification of matrix vesicles in human aortic valve and aortic media. *Fed Proc*. 1976;35(2):156-162.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1248649>.
51. Ewence a E, Bootman M, Roderick HL, et al. Calcium Phosphate Crystals Induce Cell Death in Human Vascular Smooth Muscle Cells. A Potential Mechanism in Atherosclerotic Plaque Destabilization. *Circ Res*. 2008;103(5):e28-e34. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.181305.
 52. Hosaka N, Mizobuchi M, Ogata H, et al. Elastin degradation accelerates phosphate-induced mineralization of vascular smooth muscle cells. *Calcif Tissue Int*. 2009;85(6):523-529. doi:10.1007/s00223-009-9297-8.
 53. Kalra SS, Shanahan CM. Vascular calcification and hypertension: Cause and effect. *Ann Med*. 2012. doi:10.3109/07853890.2012.660498.
 54. Meyer JL. Can biological calcification occur in the presence of pyrophosphate? *Arch Biochem Biophys*. 1984;231(1):1-8. doi:10.1016/0003-9861(84)90356-4.
 55. Luo G, Ducey P, McKee MD, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*. 1997;386(6620):78-81. doi:10.1038/386078a0.
 56. Schäfer C, Heiss A, Schwarz A, et al. 2003 - Journal of Clinical Investigation - Schäfer et al. - The serum protein $\alpha 2$ - Heremans-Schmid glycoprotein fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcificati.pdf. *J Clin Invest*. 2003;112(3):357-366. doi:10.1172/JCI200317202.Introduction.
 57. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*. 1998;12(9):1260-1268. doi:10.1101/gad.12.9.1260.
 58. Chen NX, Kiattisunthorn K, O'Neill KD, et al. Decreased microRNA is involved in the vascular remodeling abnormalities in chronic kidney disease (CKD). *PLoS One*. 2013;8(5):e64558. doi:10.1371/journal.pone.0064558.
 59. Duan X, Zhou Y, Teng X, Tang C, Qi Y. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis is activated in vascular calcification. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;387(4):694-699. doi:10.1016/j.bbrc.2009.07.085.
 60. Wen C, Yang X, Yan Z, et al. Nalp3 inflammasome is activated and required for vascular smooth muscle cell calcification. *Int J Cardiol*. 2013;168(3):2242-2247. doi:10.1016/j.ijcard.2013.01.211.
 61. London GM. Cardiovascular Disease in Chronic Renal Failure:

- Pathophysiologic Aspects. *Semin Dial.* 2003;16(2):85-94.
doi:10.1046/j.1525-139X.2003.16023.x.
62. Soldatos G, Jandeleit-Dahm K, Thomson H, et al. Large artery biomechanics and diastolic dysfunction in patients with Type 2 diabetes. *Diabet Med.* 2011;28(1):54-60. doi:10.1111/j.1464-5491.2010.03146.x.
 63. Aboyans V, Criqui MH, Abraham P, et al. Measurement and interpretation of the Ankle-Brachial Index: A scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2012;126(24):2890-2909.
doi:10.1161/CIR.0b013e318276fbc.
 64. Lee C Te, Chua S, Hsu CY, et al. Biomarkers associated with vascular and valvular calcification in chronic hemodialysis patients. *Dis Markers.* 2013;34(4):229-235. doi:10.3233/DMA-130965.
 65. Liabeuf S, Okazaki H, Desjardins L, et al. Vascular calcification in chronic kidney disease: Are biomarkers useful for probing the pathobiology and the health risks of this process in the clinical scenario? *Nephrol Dial Transplant.* 2014;29(7):1275-1284. doi:10.1093/ndt/gft368.
 66. O'Neill WC, Lomashvili KA. Recent progress in the treatment of vascular calcification. *Kidney Int.* 2010;78(12):1232-1239. doi:10.1038/ki.2010.334.
 67. Disthabanchong S. Lowering vascular calcification burden in chronic kidney disease: Is it possible? *World J Nephrol.* 2013;2(3):49-55.
doi:10.5527/wjn.v2.i3.49.
 68. Riccardi D, Kemp PJ. The calcium-sensing receptor beyond extracellular calcium homeostasis: conception, development, adult physiology, and disease. *Annu Rev Physiol.* 2012;74:271-297. doi:10.1146/annurev-physiol-020911-153318.
 69. Ph D, Danziger J. NIH Public Access. 2011;56(6):1158-1162.
doi:10.1053/j.ajkd.2010.06.017.Rapidly.
 70. Shea MK, Holden RM. Vitamin K status and vascular calcification: evidence from observational and clinical studies. *Adv Nutr.* 2012;3(2):158-165.
doi:10.3945/an.111.001644.
 71. Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, et al. Definition and classification of chronic kidney disease: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2005;67(6):2089-2100.

- doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00365.x.
72. National Kidney Foundation. *K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification*. Vol 39.; 2002. doi:10.1634/theoncologist.2011-S2-45.
 73. Levey AS, Stevens LA, Coresh J. Conceptual Model of CKD: Applications and Implications. *Am J Kidney Dis*. 2009;53(3 SUPPL. 3):S4-S16. doi:10.1053/j.ajkd.2008.07.048.
 74. Haynes RJ, G Winearls C. Chronic kidney disease. *Surgery*. 2010;28(11):1822-1872. doi:10.1016/S0140-6736(11)60178-5.
 75. National Institutes of Health, National Institutes of Diabetes & Digestive & Kidney Disease D of KU& HD. USRDS 2011 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States. *Natl Institutes Heal Natl Inst Diabetes Dig Kidney Dis*. 2011:1-26.
 76. Coresh J, Selvin E, Stevens L a, et al. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA*. 2007;298(17):2038-2047. doi:10.1001/jama.298.17.2038.
 77. Zhang Q-L, Rothenbacher D. Prevalence of chronic kidney disease in population-based studies: systematic review. *BMC Public Health*. 2008;8:117. doi:10.1186/1471-2458-8-117.
 78. Earley A, Miskulin D, Lamb EJ, Levey AS, Uhlig K. Estimating Equations for Glomerular Filtration Rate in the Era of. *Ann Intern Med*. 2014;2012(156):785-795.
 79. Jain AK, McLeod I, Huo C, et al. When laboratories report estimated glomerular filtration rates in addition to serum creatinines, nephrology consults increase. *Kidney Int*. 2009;76(3):318-323. doi:10.1038/ki.2009.158.
 80. Levey AS, de Jong PE, Coresh J, et al. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int*. 2011;80(1):17-28. doi:10.1038/ki.2010.483.
 81. Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. *Lancet*. 2012;379(9811):165-180. doi:10.1016/S0140-6736(11)60178-5.
 82. Abboud H, Henrich W. Stage IV chronic kidney disease. *N Engl J Med*. 2010;N ENGLJ ME:56-65. <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmcp0906797>.
 83. Moe S, Drüeke T, Cunningham J, et al. Definition, evaluation, and

- classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2006;69:1945-1953. doi:10.1038/sj.ki.5000414.
84. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med.* 2004;351(13):1296-1305. doi:10.1056/NEJMoa041031.
 85. Culeton BF, Larson MG, Wilson PWF, Evans JC, Parfrey PS, Levy D. Cardiovascular disease and mortality in a community-based cohort with mild renal insufficiency. *Kidney Int.* 1999;56(6):2214-2219. doi:10.1046/j.1523-1755.1999.00773.x.
 86. Foley RN, Murray AM, Li S, et al. Chronic kidney disease and the risk for cardiovascular disease, renal replacement, and death in the United States Medicare population, 1998 to 1999. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(1046-6673 (Print)):489-495.
 87. Baber U, Gutierrez OM, Levitan EB, et al. Risk for recurrent coronary heart disease and all-cause mortality among individuals with chronic kidney disease compared with diabetes mellitus, metabolic syndrome, and cigarette smokers. *Am Hear J.* 2013;166(2):373-380 e2. doi:10.1016/j.ahj.2013.05.008.
 88. Seifert ME, De Las Fuentes L, Rothstein M, et al. Effects of phosphate binder therapy on vascular stiffness in early-stage chronic kidney disease. *Am J Nephrol.* 2013;38(2):158-167. doi:10.1159/000353569.
 89. Seifert ME, De Las Fuentes L, Ginsberg C, et al. Left ventricular mass progression despite stable blood pressure and kidney function in stage 3 chronic kidney disease. *Am J Nephrol.* 2014;39(5):392-399. doi:10.1159/000362251.
 90. Wolf M, Molnar MZ, Amaral AP, et al. Elevated fibroblast growth factor 23 is a risk factor for kidney transplant loss and mortality. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(5):956-966. doi:10.1681/ASN.2010080894.
 91. Fang Y, Ginsberg C, Seifert M, et al. CKD-Induced Wingless/Integration1 Inhibitors and Phosphorus Cause the CKD-Mineral and Bone Disorder. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(8):1760-1773. doi:10.1681/ASN.2013080818.
 92. Six I, Okazaki H, Gross P, et al. Direct, acute effects of Klotho and FGF23 on

- vascular smooth muscle and endothelium. *PLoS One*. 2014;9(4).
doi:10.1371/journal.pone.0093423.
93. Hu MC, Shi M, Zhang J, et al. Klotho Deficiency Causes Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(1):124-136.
doi:ASN.2009121311 [pii] 10.1681/ASN.2009121311.
 94. Scialla JJ, Lau WL, Reilly MP, et al. Fibroblast growth factor 23 is not associated with and does not induce arterial calcification. *Kidney Int*. 2013;83(6):1159-1168. doi:10.1038/ki.2013.3.
 95. Lewin E, Olgaard K. The vascular secret of Klotho. *Kidney Int*. 2015;87(6):1089-1091. doi:10.1038/ki.2015.80.
 96. Lindberg K, Olauson H, Amin R, et al. Arterial klotho expression and FGF23 effects on vascular calcification and function. *PLoS One*. 2013;8(4):e60658.
doi:10.1371/journal.pone.0060658.
 97. Ritter CS, Zhang S, Delmez J, Finch JL, Slatopolsky E. Differential expression and regulation of Klotho by paricalcitol in the kidney, parathyroid, and aorta of uremic rats. *Kidney Int*. 2015;87(6):1141-1152. doi:10.1038/ki.2015.22.
 98. Seifert ME, Hruska KA. The Kidney-Vascular-Bone Axis in the Chronic Kidney Disease-Mineral Bone Disorder. *Transplantation*. 2016;100(3):497-505.
doi:10.1097/TP.0000000000000903.
 99. Isakova T, Wahl P, Vargas GS, et al. Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2011;79(12):1370-1378. doi:10.1038/ki.2011.47.
 100. Portale AA, Wolf M, Jppner H, et al. Disordered FGF23 and mineral metabolism in children with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(2):344-353.
doi:10.2215/CJN.05840513.
 101. Stubbs JR, He N, Idiculla A, et al. Longitudinal evaluation of FGF23 changes and mineral metabolism abnormalities in a mouse model of chronic kidney disease. *J Bone Miner Res*. 2012;27(1):38-46. doi:10.1002/jbmr.516.
 102. Wan M, Smith C, Shah V, et al. Fibroblast growth factor 23 and soluble klotho in children with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28(1):153-161. doi:10.1093/ndt/gfs411.
 103. Faul C, Amaral AP, Oskouei B, et al. FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest*. 2011;121(11). doi:10.1172/JCI46122.ease.

104. Andrukhova O, Slavic S, Smorodchenko A, et al. FGF23 regulates renal sodium handling and blood pressure. *EMBO Mol Med*. 2014;6(6):744-759. doi:10.1002/emmm.201303716.
105. Sakan H, Nakatani K, Asai O, et al. Reduced renal Klotho expression in CKD patients and its effect on renal phosphate handling and vitamin D metabolism. *PLoS One*. 2014;9(1). doi:10.1371/journal.pone.0086301.
106. Hu MC, Kuro-O M, Moe OW. Klotho and kidney disease. *J Nephrol*. 2010;23(SUPPL.16):1-16. doi:10.1007/s12079-010-0030-0 [pii].
107. Chen C-D, Podvin S, Gillespie E, Leeman SE, Abraham CR. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(50):19796-19801. doi:10.1073/pnas.0709805104.
108. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature*. 2006;444(7120):770-774. doi:10.1038/nature05315.
109. Bonthuis M, Busutti M, van Stralen KJ, et al. Mineral metabolism in European children living with a renal transplant: A European society for paediatric nephrology/European renal association-European dialysis and transplant association registry study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(5):767-775. doi:10.2215/CJN.06200614.
110. Peacock M. Calcium metabolism in health and disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(SUPPL. 1):23-30. doi:10.2215/CJN.05910809.
111. Hill KM, Martin BR, Wastney ME, et al. Oral calcium carbonate affects calcium but not phosphorus balance in stage 3-4 chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2013;83(5):959-966. doi:10.1038/ki.2012.403.
112. Langman CB, Cannata-Andía JB. Calcium in chronic kidney disease: myths and realities. Introduction. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5 Suppl 1:S1-S2. doi:10.2215/CJN.06140809.
113. Silver J, Rodriguez M, Slatopolsky E. FGF23 and PTH--double agents at the heart of CKD. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(5):1715-1720. doi:10.1093/ndt/gfs050.
114. Prié D, Ureña Torres P, Friedlander G. Latest findings in phosphate

- homeostasis. *Kidney Int.* 2009;75(9):882-889.
doi:10.1097/01.mnh.0000172716.41853.1e.
115. Forster IC, Hernando N, Biber J, Murer H. Proximal tubular handling of phosphate: A molecular perspective. *Kidney Int.* 2006;70(9):1548-1559.
doi:10.1038/sj.ki.5001813.
 116. Hruska K a, Mathew S, Lund R, Qiu P, Pratt R. Hyperphosphatemia of chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2008;74(2):148-157. doi:10.1038/ki.2008.130.
 117. Larsson T, Nisbeth U, Ljunggren Ö, Jüppner H, Jonsson KB. Circulating concentration of FGF-23 increases as renal function declines in patients with chronic kidney disease, but does not change in response to variation in phosphate intake in healthy volunteers. *Kidney Int.* 2003;64(6):2272-2279.
doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00328.x.
 118. Moallem E, Kilav R, Silver J, Naveh-Many T. RNA-Protein binding and post-transcriptional regulation of parathyroid hormone gene expression by calcium and phosphate. *J Biol Chem.* 1998;273(9):5253-5259.
doi:10.1074/jbc.273.9.5253.
 119. Cejka D, Herberth J, Branscum AJ, et al. Sclerostin and dickkopf-1 in renal osteodystrophy. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011;6(4):877-882.
doi:10.2215/CJN.06550810.
 120. Diarra D, Stolina M, Polzer K, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med.* 2007;13(2):156-163. doi:10.1038/nm1538.
 121. Briolay A, Lencel P, Bessueille L, Caverzasio J, Buchet R, Magne D. Autocrine stimulation of osteoblast activity by Wnt5a in response to TNF-?? in human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;430(3):1072-1077. doi:10.1016/j.bbrc.2012.12.036.
 122. Agapova OA, Fang Y, Sugatani T, Seifert ME, Hruska KA. Ligand trap for the activin type IIA receptor protects against vascular disease and renal fibrosis in mice with chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2016:1-13.
doi:10.1016/j.kint.2016.02.002.
 123. Evenepoel P, D'Haese P, Brandenburg V. Sclerostin and DKK1: new players in renal bone and vascular disease. *Kidney Int.* 2015;88(2):235-240.
doi:10.1038/ki.2015.156.
 124. Liu Q, Hu C, Zhou C, Cui X, Yang K, Deng C. DKK1 rescues osteogenic

- differentiation of mesenchymal stem cells isolated from periodontal ligaments of patients with diabetes mellitus induced periodontitis. *Nat Publ Gr*. 2015;(August):1-11. doi:10.1038/srep13142.
125. Cheng SL, Shao JS, Behrmann A, Krchma K, Towler DA. Dkk1 and Msx2-Wnt7b signaling reciprocally regulate the endothelial-mesenchymal transition in aortic endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(7):1679-1689. doi:10.1161/ATVBAHA.113.300647.
 126. Ringer S. Concerning the influence exerted by each of the constituents of the blood on the contraction of the ventricle. *J Physiol Cambridge*. 1880;3:380-393.
 127. Julius-Maximilians B. Würzburger medizinhistorische Mittheilungen. *Würzburg Medizinhistorische Gesellschaft*. (0177-5227).
 128. White PR. Cultivation of animal tissues in vitro in nutrients of precisely known composition. *Growth*. 1946;10:283-289.
 129. Fischer A. Biology of Tissue Cells. *Cambridge Univ Press*. 1947.
 130. Earle W.R., Schiling E.L., Stark T.H. S, N.P., Brown M.F. SE. Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in living cells. *J Natl Cancer Inst*. 1943;4:165-212.
 131. Carnes WH. Characterization of an elastin-producing cell line from pig aorta. *J Cell Biol*. 1974;50:159-171.
 132. Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R. The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev*. 1979;59(1):1-61.
<http://physrev.physiology.org/content/59/1/1.full.pdf>.
 133. Adele BY, Rosenheim H, Robison R. XCVIII . THE CALCIFICATION IN VITRO OF KIDNEY , LUNG AND AORTA . 1934.
 134. Martin GR. CHEMICAL AND MORPHOLOGICAL STUDIES ON T H E I N V I T R O C A L C I F I C A T I O N O F A O R T A . 1963:243-252.
 135. Levy RJ, Howard SL, Oshry LJ. Carboxyglutamic acid (Gla) containing proteins of human calcified atherosclerotic plaque solubilized by EDTA molecular weight distribution and relationship to osteocalcin. *Atherosclerosis*. 1986;59(2):155-160. doi:10.1016/0021-9150(86)90044-4.
 136. Giachelli CM, Bae N, Almeida M, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz SM. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a

- novel component of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 1993;92(October):1686-1696. doi:10.1172/JCI116755.
137. Charles W, Neill O'. Pyrophosphate, Alkaline Phosphatase, and Vascular Calcification. *Biochem J Rheum Dis Clin North AmCirc Res*. 1967;1021499(4). doi:10.1161/01.RES.0000234909.24367.a9.
 138. Watson KE, Bostrom K, Ravindranath R, Lam T, Norton B, Demer LL. Osteoblast-like Vascular Cells to Calcify. *J Clin Invest*. 1994;93(January):2106-2113.
 139. Shioi a., Nishizawa Y, Jono S, Koyama H, Hosoi M, Morii H. - Glycerophosphate Accelerates Calcification in Cultured Bovine Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15(11):2003-2009. doi:10.1161/01.ATV.15.11.2003.
 140. Res Katsuhito Mori C, Morii H, Giachelli Shuichi Jono CM, et al. Phosphate Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Calcification. 2000. <http://circres.ahajournals.org/cgi/content/full/87/7/e10>.
 141. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, et al. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(11):2857-2867. doi:10.1097/01.ASN.0000141960.01035.28.
 142. Ciceri P, Elli F, Cappelletti L, et al. A new in vitro model to delay high phosphate-induced vascular calcification progression. *Mol Cell Biochem*. 2015;410(1-2):197-206. doi:10.1007/s11010-015-2552-6.
 143. Liu T, Lin J, Ju T, Chu L, Zhang L. Vascular smooth muscle cell differentiation to an osteogenic phenotype involves matrix metalloproteinase-2 modulation by homocysteine. *Mol Cell Biochem*. 2015;406(1-2):139-149. doi:10.1007/s11010-015-2432-0.
 144. Crouthamel MH, Lau WL, Leaf EM, et al. Sodium-dependent phosphate cotransporters and phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells: Redundant roles for PiT-1 and PiT-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(11):2625-2632. doi:10.1161/ATVBAHA.113.302249.
 145. Villa-Bellosta R, Sorribas V. Prevention of Vascular Calcification by Polyphosphates and Nucleotides. *Circ J*. 2013;77(8):2145-2151.

- doi:10.1253/circj.CJ-13-0016.
146. Morony S, Sage AP, Corbin T, Lu J, Tintut Y, Demer LL. Enhanced mineralization potential of vascular cells from SM2 α -rankltg mice. *Calcif Tissue Int.* 2012;91(6):379-386. doi:10.1007/s00223-012-9655-9.
 147. Marti-Pardillos A, Sosa C, Sorribas V. Arsenic increases Pi-mediated vascular calcification and induces premature senescence in vascular smooth muscle cells. *Toxicol Sci.* 2013;131(2):641-653. doi:10.1093/toxsci/kfs313.
 148. Martín-Pardillos A, Sosa C, Millán Á, Sorribas V. Effect of water fluoridation on the development of medial vascular calcification in uremic rats. *Toxicology.* 2014;318(1):40-50. doi:10.1016/j.tox.2014.01.012.
 149. Werner A, Biber J, Murer H. Cloning and expression of cDNA for a Na / Pi cotransport system of kidney cortex F7. *Proc Natl Acad Sci.* 1991;88(November):9608-9612.
 150. Magagnin S, Werner A, Markovich D, et al. Expression cloning of human and rat renal cortex Na / Pi cotransport. 1993;90(July):5979-5983.
 151. Kavanaugh MP, Miller DG, Zhang W, et al. Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters TL - 91. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91 VN - r(15):7071-7075. doi:10.1073/pnas.91.15.7071.
 152. Olah Z, Lehel C, Anderson WB, Eiden M V., Wilson CA. The cellular receptor for gibbon ape leukemia virus is a novel high affinity sodium-dependent phosphate transporter. *J Biol Chem.* 1994;269(41):25426-25431.
 153. Reimer RJ. Transporters. 2014;34(0):350-359. doi:10.1016/j.mam.2012.05.004.SLC17.
 154. Forster IC, Hernando N, Biber J, Murer H. Phosphate transporters of the SLC20 and SLC34 families. *Mol Aspects Med.* 2013. doi:10.1016/j.mam.2012.07.007.
 155. Bøttger P, Hede SE, Grunnet M, Høyer B, Klaerke D a, Pedersen L. Characterization of transport mechanisms and determinants critical for Na⁺-dependent Pi symport of the PiT family paralogs human PiT1 and PiT2. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;291(6):C1377-C1387. doi:10.1152/ajpcell.00015.2006.
 156. Villa-Bellosta R, Bogaert YE, Levi M, Sorribas V. Characterization of

- phosphate transport in rat vascular smooth muscle cells: implications for vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(5):1030-1036. doi:10.1161/ATVBAHA.106.132266.
157. Salaün C, Leroy C, Rousseau A, Boitez V, Beck L, Friedlander G. Identification of a novel transport-independent function of PiT1/SLC20A1 in the regulation of TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2010;285(45):34408-34418. doi:10.1074/jbc.M110.130989.
 158. Beck L, Leroy C, Salaün C, Margall-Ducos G, Desdouets C, Friedlander G. Identification of a novel function of PiT1 critical for cell proliferation and independent of its phosphate transport activity. *J Biol Chem.* 2009;284(45):31363-31374. doi:10.1074/jbc.M109.053132.
 159. Villa-Bellosta R, Levi M, Sorribas V. Vascular smooth muscle cell calcification and SLC20 inorganic phosphate transporters: effects of PDGF, TNF-alpha, and Pi. *Pflugers Arch.* 2009;458(6):1151-1161. doi:10.1007/s00424-009-0688-5.
 160. Virkki L V, Biber J, Murer H, Forster IC. Phosphate transporters: a tale of two solute carrier families. TL - 293. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;293 VN - (3):54. doi:10.1152/ajprenal.00228.2007.
 161. Villa-Bellosta R, Sorribas V. Phosphonoformic acid prevents vascular smooth muscle cell calcification by inhibiting calcium-phosphate deposition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(5):761-766. doi:10.1161/ATVBAHA.108.183384.
 162. Verberckmoes SC, Persy V, Behets GJ, et al. Uremia-related vascular calcification: more than apatite deposition. *Kidney Int.* 2007;71(4):298-303. doi:10.1038/sj.ki.5002028.
 163. Lomashvili K a, Garg P, Narisawa S, Millan JL, O'Neill WC. Upregulation of alkaline phosphatase and pyrophosphate hydrolysis: potential mechanism for uremic vascular calcification. *Kidney Int.* 2008. doi:10.1038/ki.2008.26.
 164. Shroff R. Phosphate is a vascular toxin. *Pediatr Nephrol.* 2013;28(4):583-593. doi:10.1007/s00467-012-2347-x.
 165. Razzaque MS. Phosphate toxicity and vascular mineralization. In: *Phosphate and Vitamin D in Chronic Kidney Disease.* Vol 180. ; 2013:74-85. doi:10.1159/000346784.

166. Golub EE, Boesze-Battaglia K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Curr Opin Orthop Curr Opin Orthop*. 2007;18(18).
167. Shao JS, Cheng SL, Pingsterhaus JM, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1210-1220. doi:10.1172/JCI200524140.
168. Roberts SJ, Owen HC, Farquharson C. Identification of a novel splice variant of the haloacid dehalogenase: PHOSPHO1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;371(4):872-876. doi:10.1016/j.bbrc.2008.04.163.
169. Narisawa S, Johnson KA, Terkeltaub R, Milla L. Concerted Regulation of Inorganic Pyrophosphate. 2004;164(4):1199-1209. doi:10.1016/S0002-9440(10)63208-7.
170. Triffitt JT, Gebauer U, Ashton BA, Owen ME RJ. Origin of plasma α 2HS glycoprotein and its accumulation in bone. *Nature*. 1976;15(162(5565)):226-227.
171. Kapustin AN, Chatrou MLL, Drozdov I, et al. Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circ Res*. 2015;116(8):1312-1323. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.305012.
172. Romero MF, Fulton CM, Boron WF. The SLC4 family of HCO₃⁻ transporters. *Pflugers Arch*. 2004;447(5):495-509. doi:10.1007/s00424-003-1180-2.
173. Mount DB, Romero MF. The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2004;447(5):710-721. doi:10.1007/s00424-003-1090-3.
174. Villa-Bellosta R, Millan A, Sorribas V. Role of calcium-phosphate deposition in vascular smooth muscle cell calcification. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011;300(1):C210-C220. doi:10.1152/ajpcell.00229.2010.
175. Wang L, Nancollas GH. Calcium Orthophosphates: Crystallization and Dissolution. 2009;108(11):4628-4669. doi:10.1021/cr0782574.Calcium.
176. O'Neill WC. The fallacy of the calcium-phosphorus product. *Kidney Int*. 2007;72(7):792-796. doi:10.1038/sj.ki.5002412.
177. Jaeger C, Sergey M, Andrea K. Progress of Structural Elucidation of Amorphous Calcium Phosphate(ACP)and Hydroxyapatite (HAp): Disorder and Surfaces as Seen by Solid State NMR. *Key Eng Mater*. 2006;309-311:69-72.

178. Sonou T, Ohya M, Yashiro M, et al. Mineral composition of phosphate-induced calcification in a rat aortic tissue culture model. *J Atheroscler Thromb*. 2015;22:1197-1206. doi:10.5551/jat.28647.
179. Coto B, Martos C, Peña JL, Rodríguez R, Pastor G. Effects in the solubility of CaCO₃: Experimental study and model description. *Fluid Phase Equilib*. 2012;324:1-7. doi:10.1016/j.fluid.2012.03.020.
180. Kiffer-Moreira T, Yadav MC, Zhu D, et al. Pharmacological inhibition of PHOSPHO1 suppresses vascular smooth muscle cell calcification. *J Bone Miner Res*. 2013;28(1):81-91. doi:10.1002/jbmr.1733.
181. Chen N, Duan D, Neill KO', et al. The mechanisms of uremic serum-induced expression of bone matrix proteins in bovine vascular smooth muscle cells. *Kidney Int*. 2006;70:1046-1053. doi:10.1038/sj.ki.5001663.
182. Kestenbaum B, Sampson JN, Rudser KD, et al. Serum Phosphate Levels and Mortality Risk among People with Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(2):520-528. doi:10.1681/asn.2004070602.
183. Essalihi R, Dao HH, Gilbert LA, et al. Regression of medial elastocalcinosis in rat aorta: A new vascular function for carbonic anhydrase. *Circulation*. 2005. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.528984.
184. Leibrock CB, Alesutan I, Voelkl J, et al. Acetazolamide sensitive tissue calcification and aging of klotho-hypomorphic mice. *J Mol Med*. 2016;94(1):95-106. doi:10.1007/s00109-015-1331-x.
185. Fang Y, Ginsberg C, Sugatani T, Monier-Faugere M-C, Malluche H, Hruska KA. Early chronic kidney disease–mineral bone disorder stimulates vascular calcification. *Kidney Int Adv online Publ*. 2013. doi:10.1038/ki.2013.271.
186. Zhu D, Mackenzie NCW, Millán JL, Farquharson C, MacRae VE. The appearance and modulation of osteocyte marker expression during calcification of vascular smooth muscle cells. *PLoS One*. 2011;6(5). doi:10.1371/journal.pone.0019595.
187. Koos R, Brandenburg V, Mahnken AH, et al. Sclerostin as a potential novel biomarker for aortic valve calcification: an in-vivo and ex-vivo study. *J Hear Valve Dis*. 2013;22(0966-8519 (Print)):317-325.
188. Krishnan V. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin* 2006;116(5). doi:10.1172/JCI28551.1202.

189. Niehrs C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene*. 2006;25(57):7469-7481. doi:10.1038/sj.onc.1210054.
190. Martínez-Moreno JM, Muñoz-Castañeda JR, Herencia C, et al. In vascular smooth muscle cells paricalcitol prevents phosphate-induced Wnt/ β -catenin activation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;303(8):F1136-F1144. doi:10.1152/ajprenal.00684.2011.
191. ??tefkov?? K, Proch??zkov?? J, Pachern??k J. Alkaline phosphatase in stem cells. *Stem Cells Int*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/628368.
192. Cooley BC, Nevado J, Mellad J, et al. TGF- β signaling mediates endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) during vein graft remodeling. *Sci Transl Med*. 2014;6(227):227ra34. doi:10.1126/scitranslmed.3006927.
193. Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ, et al. MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nat Rev Endocrinol*. 2012;8(4):212-227. doi:10.1038/nrendo.2011.234.
194. Hassan MQ, Tare R, Lee SH, et al. HOXA10 controls osteoblastogenesis by directly activating bone regulatory and phenotypic genes. *Mol Cell Biol*. 2007;27(9):3337-3352. doi:10.1128/MCB.01544-06.
195. Yaccoby S. The role of the proteasome in bone formation and osteoclastogenesis. *IBMS Bonekey*. 2010;7(4):147-155. doi:10.1138/20100439.
196. Ho AM. Role of the Mouse ank Gene in Control of Tissue Calcification and Arthritis. *Science (80-)*. 2000;289(5477):265-270. doi:10.1126/science.289.5477.265.
197. Zhao G, Xu M-J, Zhao M-M, et al. Activation of nuclear factor-kappa B accelerates vascular calcification by inhibiting ankylosis protein homolog expression. *Kidney Int*. 2012;82(1):34-44. doi:10.1038/ki.2012.40.
198. Sohn P, Crowley M, Slattery E, Serra R. Developmental and TGF-beta-mediated regulation of Ank mRNA expression in cartilage and bone. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10(6):482-490. doi:10.1053/joca.2002.0810.
199. Millán JL. The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization. *Calcif Tissue Int*. 2013. doi:10.1007/s00223-012-9672-8.
200. Prince CW, Butler WT. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the biosynthesis

- of osteopontin, a bone-derived cell attachment protein, in clonal osteoblast-like osteosarcoma cells. *Coll Relat Res*. 1987;7(4):305-313.
doi:10.1016/S0174-173X(87)80036-5.
201. Crouthamel MH, Lau WL, Leaf EM, et al. Sodium-dependent phosphate cotransporters and phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells: Redundant roles for PiT-1 and PiT-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013. doi:10.1161/ATVBAHA.113.302249.
 202. Lencel P, Delplace S, Pilet P, et al. Cell-specific effects of TNF-alpha and IL-1beta on alkaline phosphatase: implication for syndesmophyte formation and vascular calcification. *Lab Invest*. 2011;91(10):1434-1442.
doi:10.1038/labinvest.2011.83.
 203. Garcia-Martin A, Reyes-Garcia R, Garcia-Fontana B, et al. Relationship of Dickkopf1 (DKK1) with cardiovascular disease and bone metabolism in Caucasian type 2 diabetes mellitus. *PLoS One*. 2014;9(11):e111703.
doi:10.1371/journal.pone.0111703.
 204. Register TC, Hruska KA, Divers J, et al. Plasma Dickkopf1 (DKK1) concentrations negatively associate with atherosclerotic calcified plaque in African-Americans with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(1).
doi:10.1210/jc.2012-3038.
 205. Murer H, Hernando N, Forster I, Biber J. Regulation of Na/Pi Transporter in the Proximal Tubule. *Annu Rev Physiol*. 2003;65(1):531-542.
doi:10.1146/annurev.physiol.65.042902.092424.
 206. Lavi-Moshayoff V, Wasserman G, Meir T, Silver J, Naveh-Many T. PTH increases FGF23 gene expression and mediates the high-FGF23 levels of experimental kidney failure: a bone parathyroid feedback loop. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;299(4):F882-F889. doi:10.1152/ajprenal.00360.2010.
 207. Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, et al. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by Klotho. *J Biol Chem*. 2006;281(10):6120-6123.
doi:10.1074/jbc.C500457200.
 208. Lim K, Groen A, Molostvov G, et al. α -Klotho Expression in Human Tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(10):E1308-E1318. doi:10.1210/jc.2015-1800.
 209. Barker SL, Pastor J, Carranza D, et al. The demonstration of α Klotho

- deficiency in human chronic kidney disease with a novel synthetic antibody. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30(2):223-233. doi:10.1093/ndt/gfu291.
210. Candeal E, Caldas Y a., Guillen N, Levi M, Sorribas V. Na⁺-independent phosphate transport in Caco2BBE cells. *AJP Cell Physiol*. 2014;307(12):C1113-C1122. doi:10.1152/ajpcell.00251.2014.
211. Alper SL, Sharma AK. The SLC26 gene family of anion transporters and channels. *Mol Aspects Med*. 2013;34(2-3):494-515. doi:10.1016/j.mam.2012.07.009.
212. Giovannini D, Touhami J, Charnet P, Sitbon M, Battini J-L. Inorganic phosphate export by the retrovirus receptor XPR1 in metazoans. *Cell Rep*. 2013;3(6):1866-1873. doi:10.1016/j.celrep.2013.05.035.
213. Liu J. Effects of Stilbene Derivatives during SITS and DIDS Muscle on Development Guinea Pig of Intracellular Acidosis Ventricular Ischemia in Isolated In Vitro Papillary. *Drugs*. (21).
214. Faelli A, Tosco M, Orsenigo MN, Esposito G. Effects of the stilbene derivatives SITS and DIDS on intestinal ATPase activities. *Pharmacol Res Commun*. 1984;16(4):339-350. doi:10.1016/S0031-6989(84)80002-8.
215. Hogg RC, Wang Q, Large W a. Effects of Cl channel blockers on Ca-activated chloride and potassium currents in smooth muscle cells from rabbit portal vein. *Br J Pharmacol*. 1994;111(4):1333-1341.