



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **FACULTAD DE MEDICINA**

**Mecanismos Fisiopatológicos del Remodelado y la  
Calcificación Arterial en la Cardiopatía Isquémica**

**Eva Jover García**  
**2016**





**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Mecanismos Fisiopatológicos del Remodelado y la  
Calcificación Arterial en la Cardiopatía Isquémica**

Memoria presentada por Eva Jover García para optar del grado de  
Doctor en Biología

Murcia. Junio 2016





**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

Dr. Francisco Marín, Profesor Asociado de Universidad del Área de Medicina en el Departamento de Medicina Interna, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada: “Mecanismos Fisiopatológicos del Remodelado y la Calcificación Arterial en la Cardiopatía Isquémica”, realizada por D<sup>a</sup>. Eva Jover García, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 27 de Mayo de 2016





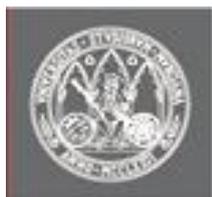
**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

Prof. Mariano Valdés Chávarri, Catedrático de Universidad del Área de Medicina en el Departamento de Medicina Interna, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada: “Mecanismos Fisiopatológicos del Remodelado y la Calcificación Arterial en la Cardiopatía Isquémica”, realizada por D<sup>a</sup>. Eva Jover García, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 27 de Mayo de 2016





**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

Dra. Diana Hernández Romero, Profesora Asociada de Universidad, del Área de Bioquímica y Biología Molecular en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada: “Mecanismos Fisiopatológicos del Remodelado y la Calcificación Arterial en la Cardiopatía Isquémica”, realizada por D<sup>a</sup>. Eva Jover García, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 27 de Mayo de 2016





## UNIVERSIDAD DE MURCIA

Prof. Vicente Vicente Ortega, Catedrático de Universidad del Área de Anatomía Patológica en el Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica y Coordinador de la Comisión Académica del Programa Oficial de Doctorado en Envejecimiento, INFORMA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada: “Mecanismos Fisiopatológicos del Remodelado y la Calcificación Arterial en la Cardiopatía Isquémica” ha sido realizada por D<sup>a</sup>. Eva Jover García para optar al grado de Doctor por la Universidad de Murcia, bajo la inmediata dirección y supervisión de Dr. Francisco Marín Ortuño, Prof. Mariano Valdés Chavarri y Dra. Diana Hernández Romero, y que el Departamento de Medicina Interna ha dado su conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

En Murcia, a 27 de Mayo de 2016



El trabajo expuesto en la presente memoria ha sido subvencionado con cargo a los proyectos y Becas:

ISCIII (RECAVA RD 06/0014-0039), Fundación Séneca (07703/GERM/07) y Beca Fundación Uriach-Sociedad Española de Cardiología 2009.

Beca 2009-2011 para “Estudios de Master Universitario Conducentes a Doctorado” por la Fundación Séneca de la Región de Murcia.

Nuevas vías moleculares en el proceso de calcificación vascular: de la célula hasta el paciente coronario. Proyecto de Investigación Daicchi-Sankyo en hipertensión y protección vascular. Sociedad Española de Cardiología 2012.

Beca PFIS 2010-2014 ‘Contratos predoctorales de Formación e Investigación en Salud’, Instituto de salud Carlos III-Ministerio de Economía y Competitividad (Gobierno de España)



En las próximas líneas me gustaría mostrar mi más sincero agradecimiento a aquellas personas que de un modo u otro han contribuido con su apoyo y dedicación a la realización de este trabajo.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis Directores de Tesis, los Drs. Francisco Marín y Diana Hernández Romero su cercanía y la oportunidad que me brindaron al recibirme en su incipiente grupo de investigación, en el Servicio de Cardiología liderado por el Profesor Dr. Mariano Valdés Chavarri. A Diana quiero especialmente agradecerle su apoyo, su amistad, y su confianza ante las miles de ocurrencias durante estos años. A Paco sobre todo agradecerle enormemente el esfuerzo que ha realizado para llevar a un buen entendimiento la investigación básica y la clínica a pesar de las notables diferencias. Vuestra paciencia, dedicación, trayectoria investigadora y perseverancia son encomiables.

Asimismo, quiero agradecer al Dr. Mariano Valdés Chavarri, todo el apoyo que nos ha ofrecido en estos 5 años, sin el cuál hubiese sido muy complicado alcanzar los objetivos previstos. Formar parte de un grupo multidisciplinar como éste, donde convergen Cardiólogos y Hemodinamistas, Cirujanos, Enfermeras, Biólogos, Farmacéuticos y Analistas, me ha permitido disfrutar de una serie de recursos intelectuales, metodológicos y materiales que no hubiesen sido posibles en otro lugar. Además debo agradecerles, la capacidad de crítica, el buen hacer, la perseverancia, la conciliación entre lo ‘clínico’ y lo ‘básico’, así como la importancia y el enriquecimiento que se desprende de las colaboraciones científicas, que me han inculcado desde mi llegada. Ha sido muy inspiradora la trayectoria científica y la gran capacidad de trabajo de cada uno de mis Directores de Tesis.

La posibilidad que se me ha ofrecido de participar activamente en la toma de decisiones durante el diseño y desarrollo de los ensayos incluidos en este trabajo, así como en colaboraciones paralelas me ha proporcionado una visión más crítica, más concisa y realista a cerca del desarrollo de un trabajo de investigación.

Este trabajo ha sido posible, además, gracias a la inestimable colaboración de multitud de personas. Quiero además dar mi más sincero agradecimiento al Dr. Pedro Martínez, la Dra.

Cristina Rodríguez y a todo su equipo por sus consejos y su cesión de cultivos primarios de célula de músculo liso vascular y endoteliales de aorta bovina, sin los que esta Tesis no hubiera sido posible. Del mismo modo quiero agradecer al personal del Centro de Hemodonación de Murcia, liderado por el Dr. Vicente Vicente, su visión crítica sobre el proyecto, sus consejos y la cesión de líneas celulares endoteliales humanas de cordón umbilical (HUVEC Eahy.926) y hepatocitos (HepG2). Concretamente, quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Vanessa Roldán y la Dra. Rocío González-Conejero así como al Dr. Constantino Martínez. Vanessa gracias por tu cercanía, disponibilidad y por recibirme en el Morales y ayudarme junto con Paco a entender mejor la investigación más clínica y su aplicabilidad. Además, me gustaría dedicarle unas palabras de agradecimiento a Pepe Rivera, quién me acogió como colaboradora ocasional en su grupo y el mundo de la plaqueta junto con nuestro Antonio Tello.

La ayuda de la Dra. Teresa Casas, el Dr. Juan Antonio Vilchez y la Dra. Carmen Puche, nos facilitó enormemente la resolución de una parte fundamental en esta Tesis (gracias por acompañarme durante horas intempestivas a cuantificar el calcio extraído). Muchas gracias a los miembros del equipo de Cirugía Cardiovascular del H.C.U. Virgen de la Arrixaca de Murcia, concretamente al Dr. Joaquín Pérez-Andreu y al Dr. y Jefe de Sección Norberto Casinello Fernández, por la colección de muestras tisulares empleadas en este trabajo; y a los Drs. José A. Hurtado Martínez, Juan García de Lara y Javier Lacunza Ruiz, todos ellos miembros de la Sección de Cardiología Hemodinámica liderado por el Dr. Eduardo Pinar Bermúdez, por su inestimable contribución en la valoración del calcio coronario por TCCM. Y al personal del *Servicio de Anatomía Patológica-Biobanco del HCUVA* por su ayuda desinteresada en el procesamiento automatizado de los tejidos empleados en este trabajo de investigación.

Gracias Ana y Miriam, por vuestra ayuda fundamental en la colección de muestras de sangre. Aniya, muchas gracias por ayudarme en el último año de esta Tesis, sabes bien que valoro muchísimo todo ese esfuerzo. Esteban, agradezco tus consejos y que me dejaras ‘incordiar’ con los protocolos de proteómica. No me quiero olvidar de Sergio Abenza por su amistad, los momentos de esparcimiento y tu ayuda en el laboratorio en los inicios de este proyecto de

investigación. Gracias a toda la gente de Cirugía Experimental por vuestra amabilidad, por vuestros consejos desinteresados y por vuestra amistad.

Thanks to everyone in the 7th floor of the BRI. All of you were so kind, friendly and helpful with me during my predoc stay there. I would like to have a special mention to Iker, Sadie, Helen, Jonathan, Elisa, Marie, Antonella, Sandro, Atsu, Graciella and Andrew, Rahele... Thanks Professor Maddedu for your support and advice. It was a pleasure to meet you and work with your excellent team.

Sin embargo, mi Tesis sólo la dedico a aquellas personas que sin entender cómo funciona 'esto de la investigación' me han apoyado incondicionalmente año tras año y han excusado mis múltiples ausencias o mis retrasos en las muchas reuniones que no he podido atender: MI FAMILIA. Gracias Carlos (me veo contigo en cualquier parte del mundo!). Gracias papá y mamá (¡esto ya está!). Gracias Laura y Julius. Gracias a todos mis demás familiares y amigos. Os quiero muchísimo.

Estos últimos años han sido personalmente muy duros, en particular estos últimos meses. Así, quiero recordar a aquellos que ya no están: la abuela Sofía, el tío Ángel y José, Olga (gracias por animarme a terminar precisamente tú...);... y también a mi Yukita (quién me acompañó durante las largas horas de estudio durante la carrera universitaria)...



*A mi família*



**Índice**

---



<b>Sección I. Abreviaturas</b>	31
<b>Sección II. Resumen/Abstract</b>	41
<b>Sección III. Introducción</b>	51
1. ENFERMEDAD ARTERIOSCLEROTICA	53
1.1.EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO DE LA ATEROSCLEROSIS	53
1.2.ESTRUCTURA DE LA PARED ARTERIAL	54
1.3.FISIOPATOLOGÍA DE LA ATEROSCLEROSIS	56
1.4.ANATOMOPATOLÓGÍA DE LA LESIÓN ARTERIOSCLERÓTICA	57
2. LA CALCIFICACIÓN VASCULAR	59
2.1.    LA CALCIFICACIÓN VASCULAR ES UNA MANIFESTACIÓN ATEROSCLERÓTICA	59
2.2.    CLASIFICACIÓN DE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR	62
2.3.    VALORACIÓN DE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR	65
2.4.    IMPACTO CLÍNICO DE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR	67
3. LA CÉLULA DE MÚSCULO LISO VASCULAR	70
3.1.    ORIGEN DE LA CÉLULA DE MÚSCULO LISO VASCULAR (CMLV)	70
3.2.    PLASTICIDAD FENOTÍPICA FISIOLÓGICA Y PATOLÓGICA DE LA CMLV	72
3.3.    PAPEL DE LA CMLV EN LA CALCIFICACIÓN VASCULAR	73
4. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS Y MOLECULARES DE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR	76
4.1.    PROCESO DE MINERALIZACIÓN	77
4.2.    EFECTO DE LA HIPERFOSFATEMIA E HIPERCALCEMIA	80
4.3.    INDUCTORES DE LA CALCIFICACIÓN ECTÓPICA	83
4.4.    INHIBIDORES FISIOLÓGICOS DE LA CALCIFICACIÓN ECTÓPICA	89
5. LA GAMMA-CARBOXILACIÓN DEPENDIENTE DE VITAMINA K	92
5.1.    PVKDs Y SU RELACIÓN CON LA CALCIFICACIÓN VASCULAR	94
5.2.    OTRAS PVDK RELEVANTES DURANTE LA CALCIFICACIÓN	

ECTÓPICA	97
5.3. MECANISMO DE ACCIÓN E INTERACCIÓN ENTRE LAS PVKD Y LA GCCX	99
5.4. REGULACIÓN DE LA GAMMA-CARBOXILACIÓN DEPENDIENTE DE VITAMINA K	100
6. REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR	104
6.1. ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y BIOSÍNTESIS DE LOS miRNA	105
6.2. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS MIRNA	108
6.3. PREDICCIÓN DE DIANAS DE MIRNA: ESTUDIOS IN SILICO	109
6.4. PARTICIPACIÓN DE MIRNAS EN LA CALCIFICACIÓN VASCULAR	110
7. PAPEL DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN LA CALCIFICACIÓN VASCULAR	111
7.1. EL COLÁGENO: COMPONENTE PRINCIPAL DE LA MEC	112
7.2. BIOSÍNTESIS Y ESTRUCTURA DEL COLÁGENO	112
7.3. MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DEL COLÁGENO	115
7.4. ENZIMAS HIDROXILASAS IMPLICADAS EN LA MADURACIÓN DEL COLÁGENO	117
<b>Sección IV. Justificación</b>	121
<b>Sección V. Objetivos</b>	125
<b>Sección VI. Materiales y Métodos</b>	129
BLOQUE I. ESTUDIO CLÍNICO	131
1. ADMISIÓN Y SELECCIÓN DE PACIENTES	131
2. EXTRACCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE Y PROCESAMIENTO	132
3. PRUEBAS RUTINARIAS DE LABORATORIO	132
3.1. HEMOGRAMA	133
3.2. PERFIL BIOQUÍMICO	133
4. VALORACIÓN SÉRICA DE TESTOSTERONA	134
5. VALORACIÓN SÉRICA DE ADIPONECTINA DE ELEVADO PESO MOLECULAR	134
6. IMAGEN DE CALCIO CORONARIO: TCCM	135
7. GENOTIPADO DEL POLIMORFISMO 3'-UTR CALU rs1043550	135

BLOQUE II. ESTUDIO HISTOLÓGICO	136
1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL HISTOLÓGICO	136
2. FIJACIÓN, DESCALCIFICACIÓN Y PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO	136
2.1.FIJACIÓN	136
2.2.DESCALCIFICACIÓN	136
2.3.PROCESAMIENTO E INCLUSIÓN EN PARAFINA	137
2.4.MICROTOMÍA	137
3. TINCIONES	137
3.1.DESPARAFINIZACIÓN, RE-HIDRATACIÓN, DESHIDRATACIÓN Y MONTAJE	137
3.2.TINCIÓN ALIZARIN RED	138
3.3.TINCIÓN IHQ	139
BLOQUE III. CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS DE LAS VARIANTES SILVESTRE Y POLIMÓRFICA DE LA REGIÓN 3'-UTR DEL GEN CALU	140
1. MANEJO DE CEPAS BACTERIANAS	140
1.1.CEPA BACTERIANA EMPLEADA	140
1.2.PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES	140
1.3.TRANSFORMACIÓN BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO	140
2. OBTENCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DEL INSERTO 3'-UTR CALU SILVESTRE	141
2.1.PREPARACIÓN DE LA REACCIÓN DE PCR	142
2.2.PROTOCOLO DE PCR	143
3. OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS DE pDNA	143
3.1.PREPARACIONES PLASMÍDICAS MINIPREP Y MIDIPREP ENDOTOXIN FREE	143
3.2.DIGESTIONES CON ENDONUCLEASAS, ELECTROFORESIS ANALÍTICA EN GELES DE AGAROSA, PURIFICACIÓN DE BANDAS Y SECUENCIACIÓN	144
4. CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS: CLONACIÓN Y SUBCLONACIÓN DE 3'-UTR CALU	146
4.1. CLONACIÓN DEL INSERTO 3'-UTR CALU SILVESTRE EN EL VECTOR pGEM®-T EASY VECTOR	146
4.2. SUBCLONACIÓN DEL INSERTO 3'-UTR CALU EN pGL-3 BASIC	148
4.3. LIGACIÓN DE DNA	149
5. OBTENCIÓN DE LA VARIEDAD POLIMÓRFICA 29809G: MUTAGÉNESIS	

DIRIGIDA DE LA VARIEDAD SILVESTRE DE 3'-UTR CALU	149
5.1.PREPARACIÓN DE LA REACCIÓN DE MUTAGÉNESIS	150
5.2.PROTOCOLO DE PCR	151
6. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO GLOBAL	151
BLOQUE IV. MODELO CELULAR DE CALCIFICACIÓN VASCULAR	152
1. SIEMBRA INICIAL DE LÍNEAS CELULARES ADHERENTES	152
2. OSTEOINDUCCIÓN DE LA CMLV	155
3. OTROS TRATAMIENTOS DE CMLV	156
4. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE LÍNEAS CELULARES VASCULARES	157
4.1. EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN	157
4.2. ENSAYO DE LUCIFERASA	157
4.3. ENSAYOS DE EXPRESIÓN CON miRNA	158
4.4. ENSAYO DE SILENCIAMIENTO DE LOX	159
4.5. ENSAYOS miRNA MIMIC	159
5. ESTUDIO DE VIABILIDAD CELULAR	159
6. INMUNOCITOQUÍMICA (ICQ) DE MONOCAPAS CELULARES	163
7. CUANTIFICACIÓN DE CALCIO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS	163
7.1.VALORACIÓN COLORIMÉTRICA DEL CONTENIDO DE CALCIO EN LA MEC	164
7.2.VALORACIÓN SEMICUANTITATIVA: TINCIÓN VON KOSSA	165
8. ESTUDIO DEL CONTENIDO PROTEICO	166
8.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL	166
8.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DEL ÁCIDO BICINCONÍNICO	166
8.3. GELES DE POLIACRILAMIDA, TRANSFERENCIA Y WESTERN BLOT	167
9. VALORACIÓN CUALITATIVA DE LA FOSFATASA ALCALINA (ALP)	170
10. VALORACIÓN DEL COLÁGENO SOLUBLE EN SOBRENADANTES CELULARES	171
11. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA	172
11.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RNA TOTAL	172
11.2. VALORACIÓN DE LA PUREZA DEL RNA TOTAL	173
11.3. TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT)	173
11.4. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (qPCR)	173

BLOQUE V. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	174
<b>Sección VII. Resultados</b>	177
1. RELEVANCIA DEL POLIMORFISMO rs1043550 AFECTANDO LA REGIÓN 3'-UTR DEL GEN <i>CALU</i> Y EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE CALUMENINA EN EL PROCESO DE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR	179
1.1.IMPACTO CLÍNICO DEL POLIMORFISMO <i>CALU</i> rs1043550	176
1.2.FUNCIONALIDAD DEL POLIMORFISMO <i>CALU</i> rs1043550 (A29809G) MEDIANTE VECTORES DE EXPRESIÓN DE LUCIFERASA	186
1.3.MODELO CELULAR DE CALCIFICACIÓN EN CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULA DE MÚSCULO LISO VASCULAR HUMANA (CMLVH)	190
2. REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA EXPRESIÓN CALUMENINA EN LA CMLV	204
2.1.IDENTIFICACIÓN IN SILICO DE miRNAS CON DIANA PREDICHA EN LA SECUENCIA 3'-UTR DEL GEN <i>CALU</i>	204
2.2. EXPRESIÓN DE LOS miRNA miR-132 Y miR-218 EN LA CMLVH EN CONDICIONES DE HPM A DIFERENTES PUNTOS TEMPORALES	209
2.3. ESTUDIO DE FUNCIONALIDAD DE LOS miRNA miR-132 Y miR-218 EN LA ESTABILIDAD DE LOS TRANSCRITOS DE <i>CALU</i>	210
2.4. LA SOBREENPRESIÓN TRANSITORIA DE LOS miR-132 Y miR-218 REDUCE LA CALCIFICACIÓN IN VITRO DE LA CMLV	212
2.5. MODELO DE ACCIÓN PROPUESTO PARA LOS miRNA miR-132-3p Y miR-218-5 p EN LA CALCIFICACIÓN IN VITRO DE LA CMLV INDUCIDA CON HPM	221
3. PAPEL DE LA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC) EN UN MODELO CELULAR DE CALCIFICACIÓN VASCULAR EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULA DE MÚSCULO LISO VASCULAR DE RATÓN (CMLVr) Y HUMANA (CMLVh)	224
3.1.REGULACIÓN DE LOX Y PLOD DURANTE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR DE LA CMLV DE RATÓN	224
3.2.MODELO DE CALCIFICACIÓN VASCULAR EN CMLV DE RATÓN TRANSGÉNICA SOBREENPRESANDO LOX	226
3.3.CONFIRMACIÓN DE LA REGULACIÓN DE LOX Y PLOD EN CÉLULA DE MÚSCULO LISO VASCULAR HUMANA SOMETIDA A HIPERFOSFATEMIA	234
4. COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS DE WARFARINA Y ACENOCUMAROL, SOBRE	

LA MINERALIZACIÓN Y ACTIVACIÓN DEL PROGRAMA DE DIFERENCIACIÓN OSTEOBLÁSTICA, EN UN MODELO DE CALCIFICACIÓN VASCULAR EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CMLVH	244
4.1. COMPARACIÓN DE LA POTENCIA PRO-CALCIFICANTE DE LOS DIFERENTES DERIVADOS CUMARÍNICOS SOBRE LA CMLV	246
4.2. EFECTO DE WARFARINA Y ACENOCUMAROL SOBRE LOS PATRONES DE ACTIVACIÓN DEL PROGRAMA DE DIFERENCIACIÓN OSTEOBLÁSTICA EN LA CMLV	248
4.3. EFECTO DE WARFARINA Y ACENOCUMAROL SOBRE LA EXPRESIÓN Y SÍNTESIS DE CALUMENINA	251
<b>Sección VIII. Discusión</b>	253
<b>Sección IX. Limitaciones</b>	291
<b>Sección X. Conclusiones/<i>Conclusions</i></b>	295
<b>Sección XI. Bibliografía</b>	305
<b>Sección XII. Anexos</b>	353
ANEXO I. PROGRAMAS DE PREDICCIÓN DE miRNA, SUS DIANAS Y CARACTERÍSTICAS DE LOS ALGORITMOS DESARROLLADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN in silico DE POTENCIALES SITIOS DE REGULACIÓN Y miRNA (p. 355)	
ANEXO II. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES, REACTIVOS DE TRABAJO, TAMPONES Y MEDIOS DE CULTIVO. LISTADOS DE ANTICUERPOS Y CEBADORES UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO (p. 362)	
ANEXO III. SECUENCIA DEL CLON MGC CLONE BC013383.2 Y ALINEAMIENTO CON DNA GENÓMICO (p. 377)	
ANEXO IV. SECUENCIA FASTA DEL mRNA CODIFICANTE DE CALUMENINA (p. 379)	
ANEXO V. DISEÑO DE CEBADORES PARA LA SECUENCIA CALU BC013383 (1069 pb) UTILIZANDO EL SISTEMA PRIMER3 OUTPUT (p. 394)	
ANEXO VI. SECUENCIACIÓN DE LOS INSERTOS EN pU3-CALUA (SILVESTRE) Y pU3-CALUG (POLIMÓRFICO) (p.396)	

ANEXO VII. LÍNEAS CELULARES ANIMALES UTILIZADAS Y CONTAJE CELULAR EN CÁMARA BÜRKER (p.398)

ANEXO VIII. TINCIÓN DE HOECHST PARA LA DETECCIÓN DE MICOPLASMAS EN CULTIVOS DE CÉLULAS ANIMALES (p.400)

ANEXO IX. EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN EN DIFERENTES TIPOS CELULARES Y FUNCIONALIDAD DE LAS CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS EN BAEC (p.401)

ANEXO X. RANGO DE SEPARACIÓN EFICIENTE DE PROTEÍNAS Y PREPARACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA (p.402)

ANEXO XI. VALORACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ALP (p.403)

ANEXO XII. PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES DEL TRABAJO ENMARCADO EN LA TESIS TITULADA “MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DEL REMODELADO Y LA CALCIFICACIÓN ARTERIAL EN LA CARDIOPATÍA ISQUÉMICA” (p.404)

ANEXO XIII. PUBLICACIONES ADICIONALES DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS TITULADA “MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DEL REMODELADO Y LA CALCIFICACIÓN ARTERIAL EN LA CARDIOPATÍA ISQUÉMICA” (p.406)



---

## **Sección I. Abreviaturas**



- ACLP/AEBP1, Proteína tipo carboxipeptidasa aórtica o '*Aortic Carboxipeptidase-Like Protein/ Adipocyte Enhancer Binding Protein-1*'
- AG, Aparato de Golgi
- AGE '*Advanced Glycation End products*'
- Ago, Argonauta
- AGPC, método del tiocianato de guanidino-fenol-cloroformo o '*Acid Guanidinium thiocyanate-Phenol-Chloroform extraction*'
- AHA, American Heart Association
- ALP, fosfatasa alcalina o '*ALkaline Phosphatase*'
- APEG-1, Proteína 1 preferencialmente expresada en aorta o '*Aortic Preferentially Expressed protein-1*'
- ATP, adenosín trifosfato o '*Adenosin TriPhosphate*'
- BAEC, CE bovina de cordón umbilical o '*Bovine Artery Endothelial Cell*'
- BAPN,  $\beta$ -aminopropionitrilo
- BCA, ácido bicinconínico o '*Bicinconinic acid*'
- BCIP, 5-bromo-4-cloro-3'-indolfosfato
- bFGF, factor de crecimiento básico de fibroblastos o '*basic Fibroblast Growth Factor*'
- BGLAP* o *Bglap*, gen de la osteocalcina o Bglap
- BGLAP*, gen humano codificante de Bone Gla protein u osteocalcina (OCN)
- Bglap*, gen murino codificante de Bone Gla protein u osteocalcina (OCN)
- BM-MSc, células mesenquimales de médula o '*Bone Marrow-MSc*'
- BMP, proteínas formadoras de hueso o '*Bone Morphogenetic Protein*'
- BMP2*, gen humano codificante de '*Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2)*'
- Bmp2*, gen murino codificante de '*Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2)*'
- BMPr, Receptor de proteínas formadoras de hueso o '*BMP receptor*'
- BSA, albúmina sérica bovina o '*Bovine Serum Albumin*'
- BSP, sialoproteína ósea o '*Bone SialProtein*'

Ca, calcio

CAC, Calcificación Arterial Coronaria

CIE, cardiopatía isquémica estable o '*Coronary Arterial Disease*'

*CALU*, gen humano codificante de Calumenina

*Calu*, gen murino codificante de Calumenina

*Catnb1*, gen murino codificante de  $\beta$ -catenina cadherin-associated protein beta 1

CaxP, producto calcio-fósforo

CDS, regiones codificantes o *Codifying Sequence*

CE, célula endotelial

cMGP, forma gamma-carboxilada de la proteína Gla de la matriz o '*carboxylated Matrix Gla protein*'

CMLV, célula de músculo liso vascular (también '*Vascular Smooth Muscle Cell*' o VSMC)

CMLVh, CMLV humanas

CMLVr, CMLV de ratón

*COL1A1*, gen humano codificante de Colágeno tipo I cadena  $\alpha$ 1 (Colla1)

*Colla1*, gen murino codificante de Colágeno tipo I cadena  $\alpha$ 1 (Colla1)

*COL1A2*, gen humano codificante de Colágeno tipo I cadena  $\alpha$ 2 (Colla2)

PICP, C-propéptido del colágeno

CRBP, proteína celular de unión a retinol o '*CellularRetinol Binding protein*'

CREB, '*cAMP-response element binding*'

CREC, Cab45, Reticulocalbina, ERC-55 y Calumenina

CRP-2, Proteína 2 rica en cisteína o '*Cistein rich protein-2*'

*CTNNB1*, gen humano codificante de  $\beta$ -catenina cadherin-associated protein beta 1

CVC, células vasculares calcificantes o '*Calcifying Vascular Cells*'

DAB, 3,3'-Diaminobenzidina

- DCC, displasia cleidocraneal
- DDIW, *5,5'-dibromo-4,4'-dicloro indigo White*
- DGCR8/Pasha, *DiGeorge síndrome critical region gene 8*
- DKK2*, gen humano codificante de *Dickkopf-related protein 2* (Dkk2)
- DM, *diabetes mellitus*
- DNMT, DNA metiltransferasas
- dNTP, desoxi nucleotidos trifosfato o '*DeoxyNucleotides TriPhosphate*'
- DPBS, '*Dubleco's Phosphate Buffered Saline*'
- dsDNA, DNA de doble cadena o '*double stranded DNA*'
- ECG, electrocardiograma o '*ElectroCardioGram*'
- ECL, electroquimioluminiscencia o '*Electrochemiluminescence*'
- ECLIA, enzimoimmunoensayo electroquimioluminiscente
- EDTA, ácido etilen-diamino-tetraacético
- ERC, enfermedad renal crónica
- FEO, Factores de transcripción Específicos Osteogénicos
- FGF-23, factor de crecimiento fibroblástico-23 o *Fibroblast Growth Factor-23*
- GAG, glicosaminoglicanos o '*Glicosaminoglycans*'
- GAPDH*, gen humano codificante de Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)
- GCCX, Gama-Glutamil CaboXilasa
- GFP, proteína verde fluorescente o '*Green Fluorescent Protein*'
- Gla, residuo ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico
- Glu, residuo glutámico no  $\gamma$ -carboxilado
- GRP/UCMA, '*Gla-rich protein* o *Unique Cartilage Matrix Associated Protein*'
- HDL, lipoproteínas de elevada densidad o '*High Density Lipoproteins*'

HMW Acrp30, adiponectina de elevado peso molecular o '*High Molecular Weight Adiponectin*'

HPM, hiperfosfatemia o '*HyperPhosphateMia*'

HTA, HiperTensión Arterial

HUVEC, CE humana de cordón umbilical o '*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*'

HVI, hipertrofia del ventrículo izquierdo

Ibsp, integrina de unión a sialoproteína o '*Integrin binding sialoprotein*'

ICAM-1, Molécula 1 intracelular de adhesión celular o '*IntraCellular Adhesion Molecule-1*'

ICQ, InmunoCitoQuímica

IDI, Índice de mejora de Discriminación Integrada

IHQ, InmunoHistoQuímica

IPTG, IsoProlil  $\beta$ -D-1-TioGalactopioranosido

IU, unidades internacionales aleatorias o '*International Units*'

KH2, vitamina K hidroquinona

LDL, lipoproteínas de baja densidad o '*Low Density Lipoprotein*'

*LOX*, gen humano codificante de Lisil oxidasa (Lox)

*Lox*, gen murino codificante de Lisil oxidasa (Lox)

LOX, lisil oxidasa

LOXL, enzimas tipo LOX o LOX-like enzyme

*Lox1l*, gen murino codificante de Lisil oxidasa-like

LOX-PP, propéptido de LOX

MAPK, *mitogen-activated protein kinase*

MEC, matriz extracelular (también '*ExtraCellular Matrix*' o ECM)

MGP, proteína Gla de la matriz o '*Matrix Gla Protein*'

miRNA, microRNA

MMP, Metaloproteinasa

- mRNA, RNA mensajero o '*messenger RNA*'
- MSC, célula mesenquimal o '*Mesenchymal Stem Cell*'
- Na, sodio
- NBT, nitroazul de tetrazolio o '*Nitro Blue tetrazolium*'
- NLS, secuencia de localización nuclear o '*Nuclear Localization Sequence*'
- NMTS, secuencia de matriz nuclear o '*Nuclear MaTrix Sequence*'
- NPP, ectonuclótido pirofosfato/fosfodiesterasa
- OD, densidad óptica o '*Optical Density*'
- OPG, OsteoProteGerina
- OPN, OsteoPontiNa
- Osx, Osterix
- P, fósforo
- P4H, Prolil 4-Hidroxilasa
- PBS, tampón fosfato salino o '*Phosphate Buffered Saline*'
- PBST, PBS-Tween 20
- PCR, reacción en cadena de la polimerasa o '*Polimerase Chain Reaction*'
- PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas or '*Platelet-derived Growth Factor*'
- Pi, fosfato inorgánico
- PINP, N-propéptido del colágeno
- PiT-1, transportador de fosfato inorgánico tipo 1
- PiT-2, transportador de fosfato inorgánico tipo 2
- PLF, factor tipo periostina o '*Periostin like factor*'
- PLOD, Prolil-Lisil OxiDasa
- PLOD1*, gen humano codificante de Prolil-Lisil OxiDasa (Plod1)
- Plod1*, gen murino codificante de Prolil-lisil oxidasa (Plod1)
- PMSF, fluoruro de fenilmetilsulfonilo

p-NP, p-nitrofenol o '*p-NitroPhenol*'

p-NPP, p-Nitrofenilfosfato o '*p-NitroPhenilPhosphate*'

PPi, pirofosfato

PRGPs, proteínas Gla ricas en Pro o '*Proline rich Gla Protein*'

PSA, persulfato de amonio

PTH, hormona paratiroidea o '*Paratiroid Hormone*'

PVDF, fluoruro de polivinilideno

PVDK, Proteínas Vitamina K-Dependientes

PXE, *Pseudoxanthoma elasticum*

qPCR, PCR cuantitativa en tiempo real o '*quantitative PCR*'

RANK, receptor activador del factor nuclear  $\kappa\beta$

RANKL, ligando del receptor activador del factor nuclear  $\kappa\beta$

RE, retículo endoplasmático

RER, RE rugoso

RIC, rango intercuartílico

RISC, '*miRNA-induced silencing complex*'

RLC, '*RISC Loading Complex*'

RLU, unidades relativas de luminescencia o '*Relative Luminescence Units*'

ROC, '*Receiver-operator characteristic curve*'

ROS, especies reactivas de oxígeno o '*Reactive Oxygen Species*'

RT, transcripción reversa o '*Reversed transcription*'

Runx, factor de transcripción relacionado con Runt

*RUNX2*, gen humano codificante de '*Runt-related transcription factor 2*' o '*Core-binding factor subunit alpha-1 (Runx2/cbfa1)*'

*Runx2*, gen murino codificante de '*Runt-related transcription factor 2*' o '*Core-binding factor subunit alpha-1*' (Runx2/cbfa1)

Runx2/Cbfa1, '*Runt-related transcription factor-2/Core-binding factor- $\beta$* '

SBF, Suero Bbovino Fetal

SCA, Síndrome Coronario Agudo

SDS-PAGE, geles de poliacrilamida con SDS o '*Sodium Dodecyl Sulphate*' *Polyacrilamide Gel Electroforesis*'

SM22- $\alpha$ , proteína de músculo liso-22 alfa o transgelina o '*Smooth Muscle-22 alpha*'

SM-calponin, calponina de músculo liso o '*Smooth Muscle Calponin*'

SMemb/MHC-B, Cadena pesada de la miosina de músculo liso o '*Smooth Muscle myosin heavy chain*'

SNP, polimorfismo o '*Single nucleotide polymorphism*'

SP7, gen humano codificante de Osterix (Osx)

SP7, gen Osterix

Spp1, Sialofosfoproteína-1 o '*Sialophosphoprotein-1*'

SRF, factor de respuesta sérica o '*Serum Response Factor*'

SXR, Receptor de esteroides y xenobióticos

TAGLN, gen humano codificante de Transgelina o SM22- $\alpha$

Tagln, gen murino codificante de Transgelina o SM22- $\alpha$

TASC, '*Trans-Atlantic Inter-Society Consensus*'

TBM, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina

Tbp, gen murino codificante de '*TATA box binding protein*'

TBS, Tampón Tris Salino

TBST, TBS-Tween20

TCC, Tomografía axial Computerizada Coronaria

TCCM, Tomografía axial Computerizada Coronaria Multicorte

TCHE, Tomografía axial Computerizada Coronaria por Haz de Electrones

TEMED, TEtraMEtiletilenoDiamina

TGFBI, '*Transforming growth factor  $\beta$ -inducible*'

TNF, Factor de Necrosis Tumoral o '*Tumour Necrosis Factor*'

TnT, Troponina T

TPA, TriproPilAmina

TRAIL, Ligando Inductor de Apoptosis Relacionado con el factor de necrosis Tumoral

TRBP, '*Trans activator RNA (TAR)-binding protein*'

ucMGP, forma descarboxilada de MGP o '*Uncarboxylated Matrix Gla Protein*'

UH, Unidades Hounsfield

UTR, Región no traducibles o '*UnTranslated Region*'

VKOR, Vitamina K epÓxido Reductasa

VKORC1, subunidad 1 de la enzima VKOR

VOP, Velocidad de Onda de Pulso arterial

$\gamma$ -SMA, gama actina de músculo liso o '*gamma-Smooth Muscle Actin*'

$\alpha$ -SMA, proteína de músculo liso alfa actina o '*alpha-Smooth Muscle Actin*'

---

## **Sección II. Resumen/Abstract**



### Resumen

**Antecedentes.** La calcificación vascular es un factor de riesgo cardiovascular independiente y se asocia frecuentemente con condiciones clínicas como la *diabetes mellitus*, la enfermedad renal crónica (ERC), el uso de fármacos anti-vitamina K, el envejecimiento y determinadas enfermedades congénitas. La calcificación es el principal elemento anatomopatológico de la lesión aterosclerótica avanzada tipo Vb según Stary. Se asocia con una elevada morbilidad y mortalidad debido a la rigidez vascular. La tomografía coronaria computarizada (TCC) y la escala Agatston han mejorado considerablemente la valoración cuantitativa del calcio coronario (CAC) y constituyen un método diagnóstico no invasivo reconocido por diferentes sociedades nacionales e internacionales.

Entre los principales mecanismos fisiopatológicos se encuentran la mineralización vascular y la diferenciación de la célula de músculo liso vascular (CMLV) hacia fenotipos osteoblásticos y/o condroblásticos. Los principales agentes detonantes son la hiperfosfatemia (HPM) y la pérdida de inhibidores naturales de la calcificación vascular como la proteína Gla de la matriz (MGP). La forma gamma-carboxilada de MGP (cMGP) inhibe la calcificación dependiente de BMP-2 y el crecimiento de los cristales de hidroxapatita. Los fármacos anti-vitamina K, inhibidores exógenos de la gamma-carboxilación dependiente de vitamina K hepática y periférica, se asocian con la calcificación vascular. De forma semejante, calumenina, un inhibidor endógeno de la gamma-carboxilación, debe participar en la calcificación vascular.

Por su parte, la matriz extracelular (MEC) actúa como sustrato para la nucleación de los cristales de hidroxapatita. Las enzimas prolil-lisil oxidasa y lisil oxidasa (PLOD y LOX) favorecen el ensamblaje y entrecruzamiento del colágeno. Por tanto, la MEC parece participar activamente en el proceso de calcificación vascular.

**Objetivos:** i) Estudiar la relevancia del polimorfismo rs1043550 afectando la región 3'-UTR del gen *CALU* y evaluar la participación de calumenina y su regulación en el proceso de la calcificación vascular, ii) Analizar el papel de la MEC en un modelo celular de calcificación vascular en cultivos primarios de CMLV humana y de ratón, y iii) Comparar los efectos de la warfarina y el acenocumarol, sobre la mineralización y activación del programa de diferenciación osteoblástica también en CMLV.

**Metodología.** Se reclutó pacientes ambulatorios y estables del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia, España) para estudiar la asociación entre el SNP *CALU* rs1043550 y la CAC valorada mediante TCC y puntuación Agatston. Se utilizó el enzimoimmunoensayo tipo sándwich para las valoraciones séricas de adiponectina y testosterona (biomarcadores de calcificación vascular). Se obtuvieron muestras tisulares de arteria femoral o poplítea embebidas en parafina para estudio histológico en asociación con el SNP *CALU* rs1043550. Se utilizó la tinción *Alizarin Red* (valoración de calcio residual) y técnicas inmunohistoquímicas convencionales para la valoración de calumenina y MGP (carboxilada y no carboxilada). Se clonó la región 3'UTR de *CALU* mediante 'TA-cloning' en vectores plasmídicos pGL3 Basic conteniendo el gen *LUC* (p3U-CALUa). Se utilizó la mutagénesis dirigida para producir la forma polimórfica (p3U-CALUg). Se realizaron ensayos luciferasa en células endoteliales HUVEC y CMLV transfectadas con p3U-CALUa y p3U-CALUg. La transfección de material genético exógeno (constructos plasmídicos o miRNAs) se realizó por lipo-transfección transitoria. La CMLV humana (CMLV) fue elegida para desarrollar un modelo de calcificación vascular *in vitro* durante 2-18 días. La HPM a base de fosfatos inorgánicos fue el agente osteoinductor de elección. Eventualmente, se utilizó CMLV de ratón (CMLVr) silvestre o transgénica para la sobreexpresión de LOX. Además se utilizaron agentes químicos específicos, descritos en la literatura, para inhibir las actividades PLOD y LOX/LOXL; así como dosis sub-terapéuticas de warfarina y acenocumarol para suplementar la HPM ocasionalmente. Por lo general, se utilizó qPCR (SYBR Green o Taqman) para el estudio de los genotipos, la expresión génica de genes osteoblásticos y miRNAs. Mediante SDS-PAGE y western blot se valoró la síntesis de proteínas aisladas de monocapas celulares descalcificadas. El calcio depositado se recogió sobre solución ácida para valoración cuantitativa por el método de la *o*-cresoftaleína. Además los depósitos de calcio se visualizaron empleando tinción von Kossa y posterior análisis de imagen. Excepcionalmente, se valoró la actividad fosfatasa alcalina por detección *in situ* mediante el método del NBT/BCIP.

**Resultados.** *El polimorfismo de la calumenina influye la calcificación vascular.* Los análisis multivariantes realizados en los 139 pacientes reclutados demostraron una relación inversamente proporcional entre los valores de CAC y adiponectina, y proporcional entre los valores de testosterona y CAC. El alelo silvestre del SNP *CALU* rs1043550 se asoció con CAC elevada y lesión coronaria severa. El

estudio histológico también evidenció un mayor grado de calcificación residual en los tejidos de pacientes homocigóticos para el alelo silvestre, menor marcaje de calumenina y MGP. Todo ello sugiere que el SNP *CALU* rs1043550 es funcional y protector frente a la calcificación vascular. La actividad luciferasa ensayada en HUVEC y CMLV fue un 30% menor en las células transfectadas con p3U-CALUg que en las transfectadas con p3U-CALUa. Ello sugiere que *CALU* rs1043550 es funcional y desestabiliza el mRNA *CALU*.

Calumenina se sobreexpresó en las etapas tempranas de la calcificación, reprimiéndose posteriormente. Se evidenció la calcificación por el incremento progresivo de la calcificación, la represión del fenotipo CMVL (SM22- $\alpha$ ) y la sobreexpresión y síntesis de marcadores de diferenciación osteoblástica (*BMP2*, *RUNX2*, *SP7/Osterix*, *CTNNB1* y *BGLAP/osteocalcina*). La reducción intracelular de calumenina se asoció con una menor expresión génica y, de forma interesante, con su acumulación extracelular. Calumenina se co-localizó con los depósitos de calcio, sugiriendo la activación de vías secretoras y su participación en la mineralización, de acuerdo con dominios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  y la presencia de calumenina en lesiones calcificadas. El descenso de calumenina se asoció con la síntesis de osteocalcina y cMGP sugestivos de restauración de la gamma-carboxilación. Solo la osteocalcina carboxilada es funcional y necesaria para la maduración de la MEC mineralizada.

***Calumenina está regulada epigenéticamente por miRNAs.*** Adicionalmente, se estudió la regulación de *CALU* dependiente de miRNA. Se estudió la regulación de la expresión de miR-132 y miR-218, ambos con potenciales sitios de unión en 3'UTR *CALU* predichos *in silico*. Además, entre las múltiples dianas de miR-132 y miR-218 destacaron *BMP2* y *DKK2/CTNNB1*, respectivamente. Ambos miRNA estuvieron reprimidos durante las etapas tempranas de la calcificación de la CMLV, coincidiendo con la sobreexpresión de *CALU*. La realización de ensayos luciferasa demostró que miR-132 y miR-218 regulan la estabilidad de mRNA *CALU*. Ensayos miRNA *mimic* sugirieron una estricta regulación de miR-218 y una regulación negativa tanto de la expresión y la síntesis de calumenina como de la expresión de *BMP2*, en asociación con una menor mineralización. La sobreexpresión de ambos miRNA protegió de la mineralización y diferenciación tempranas de la CMLV, si bien el significado biológico de miR-218 deba restringirse a fases tardías de la calcificación de la CMLV en asociación con la regulación del eje *DKK2/CTNNB1*.

***El papel de la matriz extracelular en el proceso de calcificación vascular y diferenciación celular.*** Se ha demostrado que la síntesis de MEC es fundamental durante la calcificación vascular, tanto en cantidad como en calidad. La sobreexpresión de LOX y su inhibición (BAPN) se asociaron con una inducción o inhibición de la calcificación y la diferenciación de la CMLV, respectivamente. Igualmente, la inhibición de la actividad PLOD (2,2'-dipiridil) se asoció con menores valores de calcio y diferenciación osteoblástica. La MEC debe constituir un soporte mecánico, substrato de mineralización, ser participe en procesos de comunicación y diferenciación celular.

***Comparación de fármacos anti-vitamina K en el modelo de calcificación vascular desarrollado en esta Tesis.*** Finalmente, se comparó el efecto de diferentes anti-vitamina K durante la calcificación de la CMLV. Se utilizó HPM suplementada con warfarina o acenocumarol. Warfarina y acenocumarol resultaron en una mineralización exacerbada pero mostraron diferencias en la expresión de marcadores de diferenciación en comparación con la HPM control. Los datos obtenidos sugieren una mayor potencia de acenocumarol, por lo que es un buen método para acelerar la mineralización. Como en condroblastos hipertróficos, la sobreexpresión y síntesis de calumenina se pospuso en las CMLV tratadas con acenocumarol. Los hallazgos de este trabajo plantean nuevas preguntas y aseguran una mayor profundización en los próximos años.

**Conclusiones.** El SNP CALUrs1043550 se asocia clínicamente con valores de calcio coronario bajo. La menor disponibilidad tisular de calumenina y los ensayos luciferasa, sugieren que rs1043550 es funcional, al menos, mediante la desestabilización del mRNA CALU. La expresión de calumenina es temporal-dependiente en la CMLV y se asocia con la diferenciación osteoblástica y la gamma-carboxilación. Además de calumenina, se han dilucidado nuevos factores implicados en el proceso de calcificación de la CMLV y en asociación con la síntesis *de novo* de MEC y su maduración: las enzimas PLOD1 y LOX; con la mineralización y con la diferenciación osteoblástica. Finalmente, acenocumarol y warfarina inducen calificación de la CMLV siguiendo diferentes vías, siendo el acenocumarol más potente e induciendo patrones de expresión de calumenina similares a los del condroblasto.

### Abstract

**Background.** Vascular calcification is an independent cardiovascular risk factor and frequently associates with metabolic diseases or underlying clinical conditions such as diabetes, chronic kidney disease (CKD), anti-vitamin K drugs, ageing and some congenital diseases. According to the Stary classification, vascular calcification is the main anatomopathological characteristic feature of advanced atherosclerotic lesion type Vb. It associates with high morbidity and mortality worldwide resulting from the loss of vessel elasticity. Combination of coronary computerized tomography (CCT) and Agatston score have improved the non-invasive coronary artery calcification (CAC) assessment, thus being included in national and international guidelines recommendations.

Main mechanisms involving vascular calcification are the calcium hydroxyapatite deposits into the vasculature and the vascular smooth muscle cell (VSMC) differentiation into osteoblast/chondroblast. Hyperphosphatemia (HPM) condition and the lack of natural inhibitors of vascular calcification such as matrix Gla protein (MGP) trigger vascular calcification. Gamma-carboxylate MGP (cMGP) is able to inhibit bone morphogenetic protein (BMP2)-dependent vascular calcification as well as the nucleation and elongation of calcium hydroxyapatite. Anti-vitamin K drugs exogenously inhibit hepatic and non-hepatic gamma-carboxylation, therefore is associated with vascular calcification. Furthermore, calumenin is an endogenous inhibitor of gamma-carboxylation system and may contribute to the development of vascular calcification.

Extracellular matrix (ECM) is a mineralization scaffold. Importantly, enzymatic activities including both prolyl-lysyl oxidases and lysyl oxidases (e.g.: PLOD and LOX) can hydroxylate certain Proline and Lysine residues in the collagen molecule thus contributing to their assembly and cross-linking. Therefore, ECM may contribute to the vascular calcification process.

**Aims.** We aim: *i*) to assess the role of a single nucleotide polymorphism (SNP) rs1043550 in the 3'-Untranslated region (UTR) *CALU* as well as the role of calumenin during vascular calcification, *ii*) to explore the role of MEC in a vascular calcification cell model using human and mouse VSMC, and *iii*) to compare warfarin and

acenocumarol effects on VSMC focusing on mineralization and osteoblast differentiation.

**Methods** We recruited 139 prospective steady and stable patients from the Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia, Spain) to study the relationship between SNP *CALU* rs1043550 and CAC. TCC and Agatston score were used to quantify CAC. Enzimoimmunoassays were used to quantify adiponectin and testosterone in serum samples (vascular calcification markers). Tissue samples from femoral or popliteal arteries were collected for histological assessment of SNP *CALU* rs1043550 relationship with residual calcium, calumenin and MGP content. Artery tissue samples were paraffin-embedded; stained with Alizarin Red (calcium content assessment) and assessed by conventional immunohistological techniques (calumenin and MGP assessment). TA-cloning was performed to insert 3'UTR *CALU* in a pGL3 Basic reporter plasmid vector backbone containing *LUC* gene (p3U-CALUa). On-site directed mutagenesis was performed to obtain *CALU* rs1043550 polymorphic variant (p3U-CALUg). Luciferase activity was measured in endothelial cells (HUVEC) and VSMC which were transfected with p3U-CALUa or p3U-CALUg. Transient lipofectations were performed to bring exogenous nucleic acids including plasmids or miRNAs in HUVEC or VSMC. Human VSMC were used to assess *in vitro* vascular calcification by using inorganic phosphate HPM conditioning during 2-18 days. Wild-type or transgenic mice VSMC (mVSMC) were eventually used to explore the role of LOX-overexpression on vascular calcification. Additionally, chemical inhibitors for PLOD and LOX/LOXL activities, and warfarin or acenocumarol at sub-therapeutic doses were used to occasionally supplement HPM. SYBR Green or Taqman qPCR were performed to assess osteoblast gene expression and miRNA or gene sequencing, respectively. SDS-PAGE and western blot were performed to assess the protein content from decalcified cell monolayers. Calcium amount from cell monolayers was collected using aqueous acid solutions quantified by *o*-cresophthalein method. Von Kossa staining was performed to evidence calcium deposition on cell monolayers. Alkaline phosphatase activity was eventually measured *in situ* use of the NBT/BCIP assay.

**Results. *Calumenin polymorphism affects vascular calcification.*** Multivariate analysis demonstrated a negative relationship among CAC and serum adiponectin levels but positive between CAC and testosterone even after adjusting for confounding factors. Wild-type allele carriage for SNP *CALU* rs1043550 was associated with high calcium

score and lesion severity. Histological analysis in femoral tissues again observed higher residual calcification but lower calumenin and MGP in wild-type homozygous carriers. Moreover, luciferase activity was 30% lower in p3U-CALUg transfected cells than in p3U-CALUa ones. Accordingly, SNP *CALU* rs1043550 can impair the stability of mRNA *CALU*, therefore suggesting that SNP *CALU* rs1043550 could have functional and protective effects in the vascular calcification scenario.

We assessed the calumenin expression, synthesis and regulation profile during the VSMC calcification *in vitro* in association with gamma-carboxylation. Calumenin profile showed an overexpression in early calcification stages and down-regulation thereafter. Calumenin regulation during calcification was concomitant with progressive increasing in mineralization, VSMC phenotype repression (SM22- $\alpha$ ) and osteoblast markers over-expression (*BMP2*, *RUNX2*, *SP7*, *CTNNB1* and *BGLAP/osteocalcin*). Lowered intracellular calumenin was found concordant with a modest *CALU* gene repression. Interestingly, calumenin was found co-localized with calcium deposits in the extracellular site suggesting that HPM may promote calumenin secretory pathways and its contribution to ECM mineralization. Moreover, calumenin progressive decrease was associated with a progressive increase in osteocalcin and cMGP levels. Carboxylate osteocalcin is functional and mandatory for mineralized ECM maturation.

***Calumenin is epigenetically regulated by miRNAs.*** In addition we explored the canonical miRNA effect on 3'UTR *CALU*, thus resulting in mRNA destabilization similar to SNP *CALU* rs1043550. *In silico* prediction analysis revealed different miRNAs targeting 3'UTR *CALU* but miR-132 and miR-218 were assessed since were also targeted *BMP2* and the axis *DKK2/CTNNB1*, respectively. Both miRNA were down-regulated during early VSMC calcification stages in concordance with calumenin expression and synthesis. Luciferase activity was lowered when co-transfecting p3U-CALUa together with miR-132 or miR-218 indicating an impairment in mRNA *CALU* stability. Performance of miRNA mimic assays revealed a miR-218 regulation in our biological system. Moreover miRNA mimic assays demonstrated a repression in calumenin at the protein and mRNA level, in *BMP2* expression and a lowered mineralization. However, the role of miR-218 may be associated to later stages of calcification by targeting the axis *DKK2/CTNNB1*.

***Extracellular matrix is involved in vascular calcification and cell differentiation.*** Additionally, we demonstrated that both quantity and quality of MEC

play a crucial role during VSMC calcification. LOX overexpression or its enzymatic activity inhibition (BAPN) were found to increase or decrease mineralization and VSMC differentiation into osteoblast-like cells, respectively. PLOD inhibition (2,2'-dipyridil) was also associated with lowered calcium deposition and differentiation. MEC seems to contribute to vascular calcification by regulating cell communication and differentiation processes further than being exclusively a mineralization scaffold.

***Comparison between anti-vitamin K drugs in our cell model of vascular calcification.*** Finally, we compared the effect of different Coumadin derivatives. HPM was supplemented with sub-therapeutic doses of warfarin and acenocumarol in order to mimic the lack or loss of natural inhibitors together with the Coumadin. Both warfarin and acenocumarol led to higher calcification than HPM control condition. Our results suggest that acenocumarol is more potent than warfarin, therefore suggesting it may be a good alternative to model vascular calcification in VSMC. Interestingly, acenocumarol was associated with an increased expression and synthesis of calumenin in later stages than HPM similarly to hypertrophic chondroblasts. More research is warranted since the pharmacokinetic and pharmacodynamic differences between warfarin and acenocumarol and their use to prevent ischemic stroke worldwide.

**Conclusions.** SNP CALUrs1043550 is clinically associated with low coronary calcium score. Findings on lower tissue calumenin and results from luciferase assays suggest that rs1043350 is functional, at least, by destabilizing the mRNA CALU. Calumenin expression profile is time-dependent in the VSMC and is associated with mineralization, osteoblast differentiation and gamma-carboxylation. Further than calumenin, other new players involved in vascular calcification have been found, including PLOD1 and LOX in association with the EMC *de novo* synthesis and its maturation, its mineralization and the differentiation of VSMC into osteoblast-like cells. Finally, acenocumarol and warfarin promoted VSMC calcification apparently through different pathways, thus being acenocumarol more potent and associated with a calumenin expression profile more similar to the chondroblast.

---

## **Sección III. Introducción**



## 1. ENFERMEDAD ARTERIOSCLERÓTICA

El término genérico arteriosclerosis hace alusión al endurecimiento o esclerosis de la pared arterial comprometiendo la circulación coronaria, cerebrovascular y arterial periférica. En el caso particular de la aterosclerosis, la induración vascular resulta de la formación de las placas de ateroma y es una enfermedad vascular proliferativa, severa y crónica cuya afectación se extiende a arterias de mediano y gran calibre (Fuster V y cols., 1997). Esta enfermedad que cursa largo tiempo asintomática suele debutar en edades avanzadas y, tras un determinado estímulo, presenta desestabilización y ruptura de la placa aterosclerótica, siendo una de las principales causas de isquemia e infarto y mala perfusión crónica (Stary HC y cols., 1995). Así pues, las principales manifestaciones clínicas de la patología aterosclerótica son: el Síndrome Coronario Agudo (SCA) con y sin elevación del segmento ST, la cardiopatía isquémica estable (CIE), la Enfermedad Arterial Periférica y el ictus isquémico. Es por ello, que la aterosclerosis se ha convertido en un grave problema epidemiológico asociado con una elevada morbilidad y mortalidad en todo el mundo, siendo la primera causa de muerte en los países desarrollados (Murray CJ y cols., 1997).

### 1.1. EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO DE LA ATEROSCLEROSIS

Más de 130000 personas mueren anualmente en España por enfermedades cardiovasculares, de los más de 2 millones en Europa, y se calcula que en 2030 morirán en el mundo cerca de 25 millones de personas por enfermedad cardiovascular. La enfermedad cardiovascular es la principal causa de morbilidad y mortalidad en población adulta de edad avanzada, en pacientes con ERC y en pacientes diabéticos (London GM y cols., 1997; Snell-Bergeon JK y cols., 2013). Todas estas condiciones se asocian con el desarrollo de arteriosclerosis y su complicación, incluyendo la calcificación vascular (Perk J y cols., 2012; London GM y cols., 1997; Snell-Bergeon JK y cols., 2013; London GM y cols., 2003).

Anualmente, la aterosclerosis supone un 26% de la mortalidad global en todo el mundo a pesar de los avances terapéuticos (Winkel TA y cols., 2010). El estudio “The Cardiovascular Health Study’ (Cushman M y cols., 1999) mostró una correlación significativa entre la severidad de la enfermedad vascular y el riesgo relativo de padecer

eventos aterotrombóticos, siendo entre 4 y 5 veces mayor la probabilidad de sufrir un ictus u otro tipo de evento tromboembólico.

Los resultados del Trans-Atlantic Inter-Society Consensus (TASC) II para el manejo de la enfermedad vascular periférica (Norgren L y cols., 2007) entre el 40-60% de los pacientes con un proceso arteriosclerótico acaba desarrollando, de forma paralela, otras condiciones clínicas, que incrementan considerablemente la severidad y riesgo de evento trombótico (Kuller LH y cols., 2000; Jover E y cols., 2013). En este sentido, el estudio Framingham demostró que factores de riesgo clásicos como el tabaquismo, la hiperlipidemia, la hipertensión y la diabetes mellitus son los principales determinantes de la aterosclerosis (Cupples LA y cols., 1987; Uchiyama S y cols., 2010).

Por otro lado, la localización de las placas de ateroma en la aorta descendente predice la ocurrencia de eventos cardiovasculares. La presencia de placas ateromatosas complejas es altamente prevalente en la aorta descendente de pacientes con CIE (58-93%), y algo menor en el arco aórtico (40-80%). Ello está íntimamente relacionado con los eventos cardiovasculares adversos, incluyendo muerte cardiaca, infarto agudo de miocardio e ictus mortal (Varga A y cols., 2004; Khoury Z y cols., 1997)

Así pues, los factores de riesgo asociados con el desarrollo de aterosclerosis se pueden agrupar en condiciones clínicas modificables y no modificables (**Tabla 1**).

**Tabla 1. Factores de riesgo modificables de la calcificación vascular**

Factores de riesgo modificables	Factores de riesgo no modificables
Hipertensión	Edad
Diabetes	Sexo
Dislipemia, valores bajos de HDL	
Tabaquismo	
Obesidad	
Aterosclerosis	

## 1.2. ESTRUCTURA DE LA PARED ARTERIAL

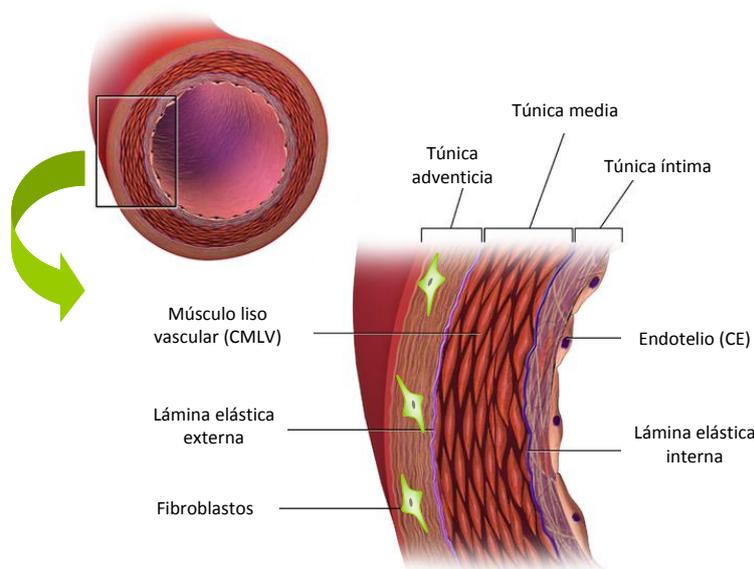
La pared arterial se organiza principalmente en tres capas dispuestas concéntricamente. Cada una de estas capas presenta una localización y estructuras características que confieren su particular función en el vaso. Diferentes tipos celulares residentes mayoritarios (célula endotelial o CE, célula de músculo liso vascular o

CMLV y fibroblastos) confieren parte de sus propiedades a la respectiva capa o túnica en la que se localizan (**Figura 1**).

La *túnica íntima*, se localiza en el lumen vascular, en contacto con el flujo sanguíneo. El componente celular mayoritario es la célula endotelial, organizada en una monocapa que separa la sangre del contacto con las capas de tejido conjuntivo subyacente, altamente protrombótico dado el alto contenido en colágenos, proteoglicanos, elastina y otras glicoproteínas. Una lámina elástica separa la íntima de la túnica media.

La CMLV es el componente celular principal de la *túnica media*. Ésta es responsable de la síntesis de diferentes elementos colagénicos y no colagénicos de la matriz extracelular (MEC), confiere al vaso su característica elasticidad y contractibilidad y participa en procesos reparativos (Wissler, 1968; Trelstad, 1974; Ross y cols. 1971; Ross R, 1971; Wight y cols. 1975; Coltoff-Schiller y cols., 1976; Chamley y cols, 1977).

Finalmente se dispone la *túnica adventicia*, cuyo componente mayoritario es el tejido conectivo y la presencia de algunos tipos celulares entre los que destacan los miofibroblastos. También pueden estar presentes algunas CMLV, células mesenquimales o progenitoras y células vasculares calcificantes o CVC.



**Figura 1. Estructura de la pared vascular.** Las diferentes capas o tunicas de la pared se distribuyen concéntricamente y se caracterizan por la presencia de diferentes tipos celulares residentes. Adaptado de la publicación Blausen.com staff. "Blausen gallery 2014". Wikiversity Journal of Medicine. DOI:10.15347/wjm/2014.010. ISSN 20018762.

### 1.3. FISIOPATOLOGÍA DE LA ATEROSCLEROSIS

La aterosclerosis es una patología de origen multifactorial, con participación multisistémica y extraordinariamente compleja que se comporta como un desorden vascular metabólico e inflamatorio crónico y todo ello conlleva manifestaciones locales y sistémicas. Diferentes condiciones clínicas, reconocidas como factores de riesgo cardiovascular, ejercen una agresión continuada sobre el endotelio vascular, generando daño y disfunción endotelial.

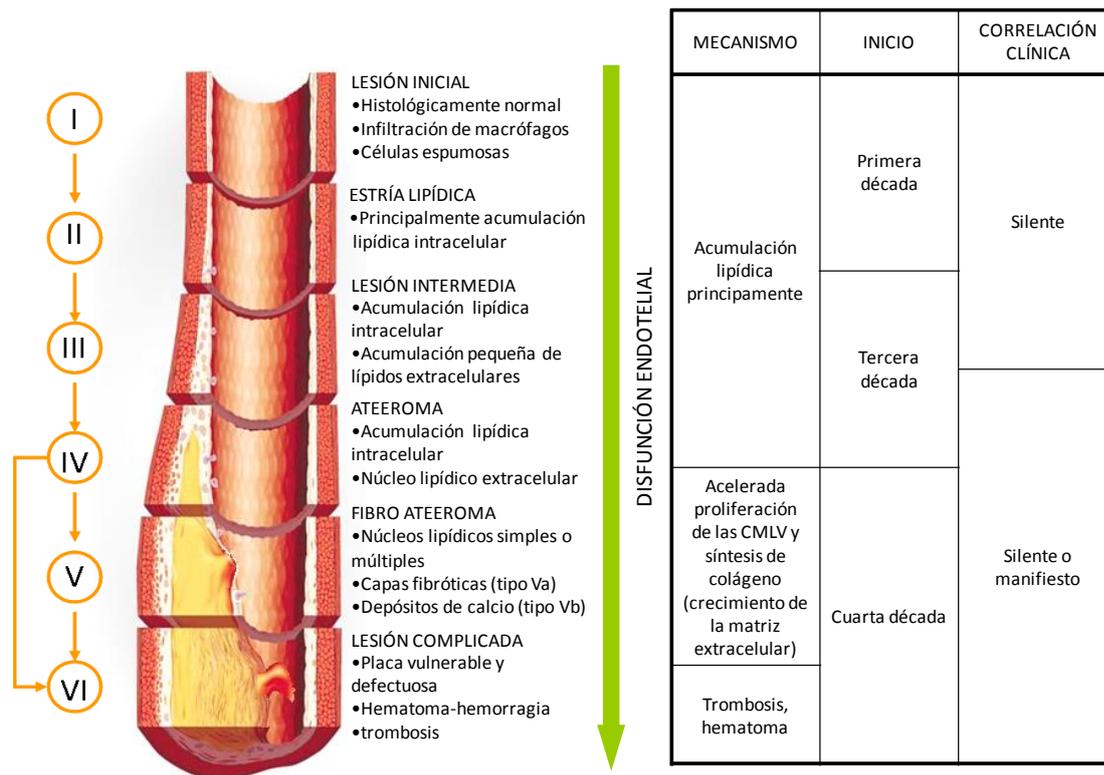
En condiciones normales, las lipoproteínas que penetran en el espacio subendotelial se devuelven al torrente sanguíneo mediante el transporte reverso del colesterol en el que participan las lipoproteínas de elevada densidad (HDL, ‘high density lipoprotein’) (Martínez-González J y cols., 2001; Stary HC y cols., 1994). Sin embargo, el daño y disfunción endotelial aumentan la permeabilidad hasta alcanzar la saturación del transporte reverso, con lo que las lipoproteínas de baja densidad (LDL, ‘low density lipoprotein’) se acumulan en el subendotelio y sufren procesos de oxidación (oxLDL). Además, otros factores como la diabetes reducen los valores de HDL y empeoran la eliminación de las LDL glicosiladas y difícilmente reconocibles por los receptores de LDL (Martínez-González J y cols., 2001). Esta deposición de lípidos formando el núcleo o *core* lipídico genera una respuesta inmune (infiltrados leuco-plaquetarios, activación de macrófagos y formación de células espumosas) así como una respuesta inflamatoria local y sistémica que se cronifica. Además, las plaquetas y macrófagos reclutados en la lesión liberan factores de crecimiento que inducen la proliferación y la migración de las CMLV de la túnica media a la íntima (Badimon L y cols., 2008; Doherty TM y cols., 2003). A partir de entonces, la inflamación cronificada y el daño vascular, así como el estrés oxidativo generado culminan con la disfunción vasomotora, estado protrombótico, disfunción fibrinolítica, modificaciones fenotípicas de los componentes celulares vasculares (ver más adelante), y vulnerabilidad de la placa (Sagel J y cols., 1975; Faxon DP y cols., 2004). La exposición al torrente sanguíneo de los componentes vasculares subendoteliales es altamente procoagulante (Hasson GK y cols., 2005). Por ello, la ocurrencia del evento trombótico queda subyugada a la conservación de la integridad de la placa de ateroma. La erosión, ruptura, desprendimiento o calcificación de la placa son procesos que condicionan y agravan el evento isquémico que conlleva una elevada morbilidad y mortalidad. Así pues, la

complicación de la placa constituye el substrato fisiológico común de los SCA (Antman E y cols., 2006).

#### 1.4. ANATOMOPATOLÓGIA DE LA LESIÓN ARTERIOSCLERÓTICA

Estudios anatomopatológicos permitieron identificar las diferentes etapas del desarrollo y progresión de la lesión aterosclerótica histológicamente. Estas etapas quedan recogidas en la clasificación de Stary (Stary HC y cols., 1995) y demuestran que en el desarrollo de la placa de ateroma ocurren fundamentalmente dos fenómenos. Por un lado se desarrolla la *aterosis* que consiste en la acumulación de lípidos a nivel intra y extracelular, dando lugar a la presencia de las células espumosas, el núcleo lipídico y una reacción inflamatoria. Por otro lado, se observa una *esclerosis* que consiste en el endurecimiento cicatricial de la pared arterial y que se asocia con procesos proliferativos, distrofia de la matriz extracelular y en estadios avanzados, presencia de calcificaciones, necrobiosis y mayor infiltración inflamatoria (**Figura 2**).

Las lesiones avanzadas agrupan las alteraciones estructurales por la acumulación de lípidos, células y componentes matriciales y son las más susceptibles de sufrir complicaciones. Estas son las placas tipo IV y V. En la lesión tipo IV aparece el ateroma como resultado de la acumulación de lípidos extracelulares (núcleo lipídico) rodeando múltiples capas de células espumosas y CMLV que han migrado desde la media a la íntima. La lesión tipo V, si bien reúne las características de la tipo IV, además presenta un incremento de la deposición de colágeno, disposición desorganizada de las CMLV en la media e infiltrados linfocitarios en las zonas perivasculares. Característicamente la lesión tipo V se subdivide en Va (múltiples núcleos lipídicos alternados con tejido conjuntivo denso dispuesto irregularmente), Vb (la presencia de depósitos de calcio es el principal elemento descriptivo) y Vc (la íntima es reemplazada por tejido fibroso formando una cicatriz).



**Figura 2. Diagrama de flujo mostrando la evolución y progresión de la lesión aterosclerótica.**  
Adaptado de Sary y cols. (Sary HC y cols., 1995).

Según la descripción de Sary, la lesión aterosclerótica es de muy lenta evolución, pues los cambios preclínicos se iniciarían desde la infancia, pero no es hasta la segunda o la tercera década que puede aparecer el ateroma y la sintomatología asociada.

## 2. LA CALCIFICACIÓN VASCULAR

La primera descripción de tejido vascular calcificado data de 1852 y 1903, siendo considerada una manifestación metaplásica (Czermack J. 1852; Mönckeberg JG. 1903). La calcificación vascular es un proceso patológico que consiste en la deposición de cristales de fosfato de calcio, en cualquier parte del territorio vascular, incluyendo los vasos sanguíneos, el tejido miocárdico y las válvulas cardíacas (Shanahan CM y cols., 2000; Shanahan CM. 2006; Shao JS y cols., 2006; Farzaneh-Far A y cols., 2005; Giachelli CM. 2004). La esclerosis vascular resultante conlleva una disminución de la elasticidad vascular y un incremento significativo de la morbilidad y mortalidad que hace que la calcificación vascular sea *per se* un factor de riesgo cardiovascular independiente (Wilson PW y cols., 2001; Margolis JR y cols., 1980; Wexler L y cols., 1996; Mazzini MJ y cols., 2006).

Durante mucho tiempo la calcificación vascular se ha entendido como un proceso pasivo y degenerativo de mineralización propio del envejecimiento y sin opciones terapéuticas (Virchow R. 1989). Sin embargo, las tres últimas décadas de investigación demuestran que se trata de un proceso estrictamente regulado y gobernado por mecanismos moleculares comunes al metabolismo óseo, con una participación activa del componente celular vascular (Shanahan CM y cols., 1993; Shanahan CM y cols., 1999; Shanahan CM y cols., 2006; Shao JS y cols., 2006; Moe S M y cols., 2004; Vattikuti R y cols., 2004; Hruska KA y cols., 2005; Demer LL y cols., 2008; Sage AP y cols., 2011; Zhu D y cols., 2011; Speer MY y cols., 2009; Demer LL. 2002; Boström K y cols., 1993).

### 2.1. LA CALCIFICACIÓN VASCULAR ES UNA MANIFESTACIÓN ATEROSCLERÓTICA

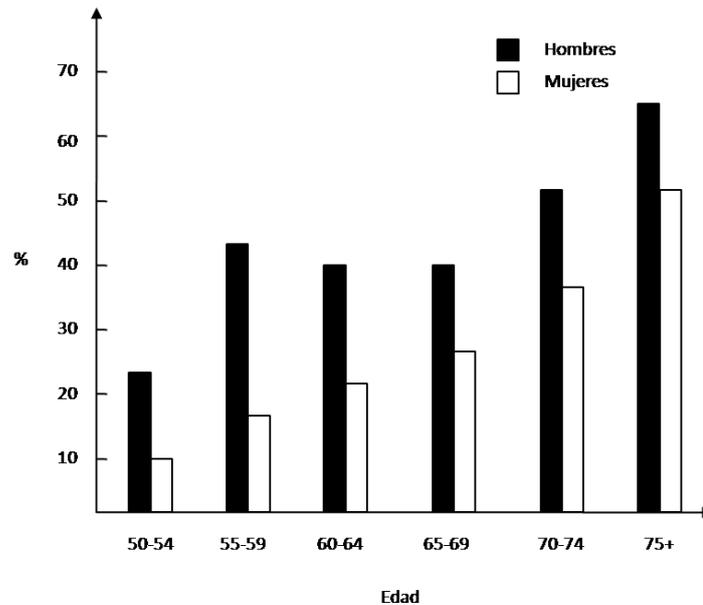
La calcificación vascular es el elemento descriptivo principal de la lesión aterosclerótica avanzada tipo Vb, según la clasificación de Stary (Stary HC. 1992). La severidad y extensión de la calcificación vascular es un reflejo de la carga aterosclerótica subyacente y se correlaciona positivamente con ésta, con el riesgo de infarto agudo de miocardio y con la estabilidad de la placa (Zhu D y cols., 2012; Boström K y cols., 1993; Wexler L y cols., 1996; Mazzini MJ y cols., 2006; Johnson RC y cols., 2006). Así, un 85% de pacientes asintomáticos con calcio coronario presentaron

infarto agudo de miocardio no fatal y la mayoría de las placas de ateroma trombosadas están calcificadas (Wexler L y cols., 1996). Esto convierte a la calcificación vascular en un factor de riesgo para pacientes con enfermedad arterial coronaria, que resulta en una tasa de supervivencia a 5 años de un 20% menos en pacientes con *angina pectoris* (Margolis JR y cols., 1980). Además, estudios recientes sugieren que la calcificación vascular debe ser una manifestación del proceso aterosclerótico al menos en las grandes arterias, sea cuál sea la patología subyacente (McCullough PA y cols., 2008; Coll B y cols., 2011). Por tanto, la aterosclerosis es el sustrato fisiopatológico principal de la calcificación vascular.

Diferentes condiciones clínicas se asocian frecuentemente con el desarrollo y la progresión de calcificación vascular (Block GA y cols., 1998; Mizobuchi y cols., 2009; Wilson PW y cols., 2001; Wexler L y cols., 1996; Mazzini MJ y cols., 2006; Margolis Jr y cols., 1980; Chiu YW y cols., 2010; Shemesh J y cols., 2011; Cannata-Andía JB y cols., 2006; Ketteler M y cols., 2005; O'Neill WC. 2007). Así, desórdenes metabólicos como la ERC y la diabetes son comorbilidades frecuentes en la calcificación vascular y empeoran considerablemente el pronóstico del paciente (London GM y cols., 1997; Snell-Bergeon JK y cols., 2013; London GM y cols., 2003; Chiu YW y cols., 2010; Shemesh J y cols., 2011; Cannata-Andía JB y cols., 2006; Ketteler M y cols., 2005; O'Neil WC. 2007). El uso de fármacos antivitaminas K o desórdenes genéticos raros, como la progeria y el *Pseudoxanthoma elasticum* (PXE) o síndrome de Grönblad-Stranberg, también se asocian con el desarrollo prematuro de aterosclerosis y calcificación vascular (Villa-Bellosta R y cols., 2013; Boraldi F y cols., 2009; Gheduzzi D y cols., 2007).

También la hipertensión constituye un factor de riesgo en la calcificación vascular. De hecho, la combinación de diabetes e hipertensión con una manifestación aterosclerótica resulta en un incremento de 12 veces el riesgo de padecer ictus (Kuller LH y cols., 2000).

Adicionalmente, la induración arterial propia del envejecimiento actúa como sustrato para el desarrollo de calcificación vascular en edades avanzadas. Así, se observa una mineralización progresiva en las grandes arterias de sujetos mayores de 60 años (Cannata-Andía JB y cols., 2006) (**Figura 3**). Es por ello, que la calcificación vascular fue inicialmente considerada una complicación pasiva y degenerativa propia del envejecimiento (Virchow R. 1989; Abedin M y cols., 2004).



**Figura 3. Prevalencia de la calcificación vascular según sexos y progresión de la edad.**

Adaptado de Cannata-Andía JB y cols (2006).

Sin embargo, estudios recientes han evidenciado la presencia de calcificación vascular en un 55% de hombres y mujeres menores de 40 años, encontrándose especialmente diseminada en hombres de  $\geq 50$  años y mujeres de  $\geq 60$  años (Shanahan CM y cols., 2006). Y es que la calcificación vascular puede comenzar en la segunda década de la vida, aunque su historia natural presenta una fase preclínica que puede durar muchas décadas.

La inflamación, el estrés oxidativo, la hiperfosfatemia y la elastinólisis causados por las diferentes condiciones clínicas recogidas como factores de riesgo, son capaces de inducir calcificación vascular mediante diferentes mecanismos que incluyen la activación de vías de diferenciación osteocondroblástica, el compromiso de los inhibidores naturales y el remodelado de la MEC (Shao JS y cols., 2006).

Como en los procesos osteogénicos, la calcificación vascular puede resultar tanto de procesos de osificación intermembranosa como endocondral, según se verá más adelante. Así, no es difícil encontrar tejido cartilaginoso en las arterias (Aigner T y cols., 2008; Speer MY y cols., 2009; Qiao JH y cols., 2003), si bien esto no se ha caracterizado sistemáticamente. La presencia de uno u otro tejido óseo, depende de la evolución del proceso y del factor de riesgo subyacente, y es fundamental la contribución de los componentes celulares vasculares.

## 2.2. CLASIFICACIÓN DE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR

La localización de los depósitos de calcio en la pared vascular y la condición clínica subyacente permiten clasificar la calcificación vascular en 4 tipos (Speer MY y cols., 2004).

### 2.2.1. Ateromatosis o calcificación de la íntima

La ateromatosis se caracteriza histopatológicamente por la presencia de *calcificación difusa de la íntima*, fibrosis, rigidez vascular y reducción del lumen vascular. Éste tipo de calcificación se asocia con la *aterosclerosis* (Hunt JL y cols., 2002) y la evolución natural de la placa de ateroma (**Figura 4A**). Es la forma más común de vasculopatía cálcica y se inicia con la mineralización temprana, durante la segunda década de la vida, en forma de *pequeños agregados de cristales de calcio* (Zhu D y cols., 2012; Johnson RC y cols., 2006). La expansión de la mineralización a áreas mayores ocurre en la cuarta década de la vida adulta (Zhu D y cols., 2012; Johnson RC y cols., 2006) por lo que el estadio preclínico es muy largo. El grado de calcificación aterosclerótica se correlaciona con la edad y la hipertensión, que son los principales factores de riesgo para la calcificación aterosclerótica sistémica (Zhu D y cols., 2012; Johnson RC y cols., 2006).

La *CMLV* participa activamente desde estadios tempranos, en un proceso semejante a la *osificación endocondral* (Hunt JL y cols., 2002; Mohler ER 3rd y cols., 2001), como demuestra la progresiva co-expresión de diferentes marcadores osteo/condroblásticos y la presencia de microvesículas de nucleación (Stary HC. 2000).

### 2.2.2. Esclerosis de Mönckeberg o calcificación de la media

La característica histológica de la esclerosis de Mönckeberg es la *calcificación e hiperplasia de la media* y el desarrollo de rigidez arterial. Éste tipo de calcificación (**Figura 4B**) se asocia con la arteriosclerosis *propia de la vejez, la diabetes mellitus, la ERC, el uso de anticoagulantes orales anti-vitamina K* (derivados cumarínicos), y *otras patologías de origen genético* (Zhu D y cols., 2012; Johnson RC y cols., 2006). Las principales repercusiones clínicas son el desarrollo de hipertrofia del ventrículo

izquierdo (HVI) y otros eventos cardiovasculares adversos (Dao HH y cols., 2005; Guérin AP y cols., 2000).

El papel de la *CMLV* también es fundamental e incluye la formación de vesículas de nucleación, pero el proceso fisiopatológico se asemeja a la *osificación intermembranosa* (Schinke T y cols., 1998). La *mineralización* suele presentarse en forma de *anillos concéntricos* en la media (**Figura 4C**) y, ocasionalmente se pueden observar incluso osteocitos y hueso trabecular (Zhu D y cols., 2012).

### 2.2.3. Calcificación de las válvulas cardiacas

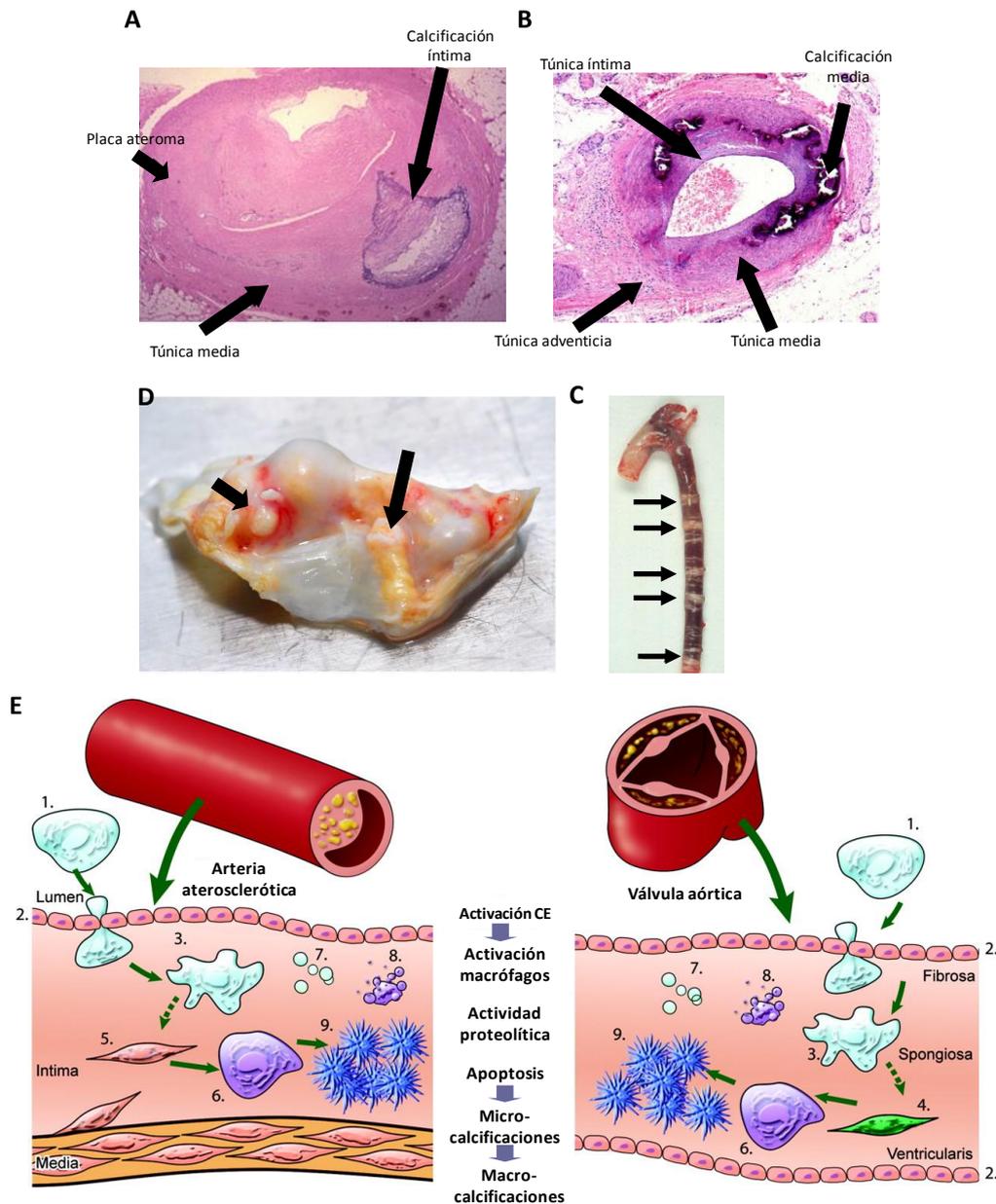
La calcificación de la válvula aórtica se identifica como un engrosamiento y mineralización de las valvas, en ausencia de enfermedad reumática valvular. La *mineralización es amorfa y desorganizada* (**Figura 4D**). Se diferencian dos tipos dependiendo de la obstrucción o no del flujo ventricular izquierdo, como *estenosis aórtica o esclerosis aórtica*, respectivamente.

El proceso fisiopatológico comparte ciertas similitudes con la calcificación de la íntima y de la media, pero es la *célula intersticial valvular* el elemento celular que participa activamente (**Figura 4E**) en respuesta a estrés mecánico e inflamación (Zhu D y cols., 2012; Mohler ER 3rd y cols., 2001). Si bien la *etiología* del proceso es *inflamatoria* como en la aterosclerosis, la célula intersticial valvular se diferencia en osteoblastos en un mecanismo de *osificación intermembranosa* similar a la arteriosclerosis calcificante o esclerosis de Mönckeberg (Mohler ER 3rd y cols., 2001; Rajamannan NM y cols., 2003; Peacock JD y cols. 2010).

### 2.2.4. Calcifilaxis o arteriopatía urémica calcificante.

La calcifilaxis es un tipo de *calcificación diseminada* que afecta la *túnica media de las pequeñas arterias y arteriolas* de pacientes en *estadios terminales de enfermedad renal* (Zhu D y cols., 2012) así como al uso de inmunodepresores, diabetes, obesidad o hipercoagulabilidad (Mathur RV y cols., 2001; Coates T y cols., 1998). Se desarrolla rápidamente y progresa hacia ulceraciones, necrosis isquémicas y calcificaciones en arteriolas dermoepidérmicas (Adrogué HJ y cols., 1981). Se observa una proliferación y engrosamiento de la íntima, fibrosis y trombosis en tejidos cutáneos y subcutáneos. La

uremia, asociada o no al incremento de solubilidad del fosfato cálcico ( $> 60 \text{ mg}^2/\text{dL}^2$ ), desencadena la activación del programa osteo/condroblástico también en la **CMLV** (Moe S M y cols., 2004; Moe S M y cols., 2003; Chen NX y cols., 2006). La presencia de toxinas urémicas combinada con una fosfatemia elevada y una calcemia disminuida y la pérdida de inhibidores naturales de la calcificación ectópica, induce la diferenciación condroblástica de la CMLV (Neven E y cols., 2010; O'Neill. 2007).



**Figura 4.** Tipos de calcificación. Identificación microscópica de la calcificación de la íntima (A) y la media (B). Identificación macroscópica amorfa e irregular de los depósitos cálcicos valvulares (C) y deposición regular en anillos concéntricos de la calcificación de la media (D). Comparación del proceso fisiopatológico propio de la calcificación vascular y la valvular (E). Adaptado de (Zhu D y cols., 2012; New SE y cols., 2011) y utilizando las herramientas en línea [www.medscape.com](http://www.medscape.com) y <https://quizlet.com>

Actualmente, la clasificación clásica de la calcificación vascular en 4 grandes entidades patológicas resulta ambigua dada la frecuente afectación combinada de la media y la íntima en pacientes con ERC (con presencia de depósitos lípidicos, fibroateromas arteriales y un devastador riesgo cardiovascular). La tendencia ideológica actual coincide en que cualquier tipo de calcificación tiene como sustrato anatomopatológico la aterosclerosis, al menos en las grandes arterias o arterias de capacitancia (McCullough PA y cols., 2008; Coll B y cols., 2011). Además, la proximidad anatómica de la íntima y la media, y el bajo contenido de CMLV de la media en las grandes arterias hace que la media sea más sensible al proceso aterosclerótico y dificulta la localización exacta de la túnica afectada mediante las técnicas actuales basadas en los rayos X (Valdivielso JM. 2011; Coll B y cols., 2011).

### **2.3. VALORACIÓN DE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR**

Entre un 5 y un 20% de las arterias ateroscleróticas presentan tejido óseo maduro (Seemayer TA y cols. 1973; Hunt JL y cols. 2002), sin embargo estadios previos deben ser más frecuentes e incluso presentar estadios intermediarios condroblásticos poco o nada mineralizados (Christitan RC y cols., 1999; Aigner T y cols., 2008). Durante las últimas décadas se han desarrollado y mejorado técnicas diagnósticas no invasivas que permiten la detección y cuantificación del grado de calcificación vascular, dada la elevada asociación con el desarrollo de enfermedad coronaria.

#### **2.3.1. La tomografía computerizada coronaria**

Los primeros equipos de tomografía axial computerizada coronaria (TCC) ya confirmaron su superioridad respecto a la fluoroscopia convencional en la detección ateromatosa coronaria (Becker CR y cols., 1999). Su utilización combinada con la coronariografía (patrón oro para la valoración de lesiones coronarias), sugiere una correlación positiva entre el contenido de calcio coronario y la enfermedad coronaria (Masuda Y y cols., 1990; Timins ME y cols., 1991). La gran sensibilidad de la TCC para la detección del calcio coronario ha permitido desarrollar nuevas técnicas diagnósticas como la TCC multicorte (TCCM) o la TC por haz de electrones (TCHE) (Takasu J y cols., 1992; Lee JS y cols., 2012).

La introducción de la TCCM y el desarrollo de técnicas de adquisición de imagen, con sincronización electrocardiográfica y reconstrucción retrospectiva permiten la valoración de las arterias coronarias de forma sencilla y no invasiva a tiempo real (Hoffmann U y cols., 2003). Además, permite la cuantificación del contenido de calcio coronario aplicando la escala de puntuación Agatston (Agatston AS y cols., 1990).

### 2.3.2. Métodos de cuantificación de la calcificación coronaria

Existen diversos métodos de valoración del calcio coronario, pero el algoritmo más empleado es el creado por Agatston y basado en estudios de TCHE obtenidos con sincronización cardíaca prospectiva (Agatston AS y cols., 1990). Su aplicación en TCCM requiere de modificaciones para el análisis de imágenes solapadas (Ohnesorge B y cols., 2002).

El proceso de cuantificación de calcio coronario desarrollado por Agatston establece un umbral de 130 unidades Hounsfield (UH) para determinar si una lesión se encuentra o no calcificada. Posteriormente, se calcula una puntuación para cada lesión individual multiplicando el área ( $\text{mm}^2$ ) por un cofactor (entre 1-4) que depende del valor máximo de UH en cada lesión (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Asignación de la puntuación Agatston de acuerdo con la densidad de la placa de ateroma

Densidad de la placa (UH)	Puntuación
130-199	1
200-299	2
300-399	3
$\geq 400$	4

Las puntuaciones de cada lesión se consideran de forma independiente en cada territorio vascular y la suma de todas ellas da lugar a la cantidad total de calcio (*calcium score*). Finalmente, se puede estimar el riesgo de presentar enfermedad coronaria, mediante la clasificación (en 5 categorías) de la cantidad total de calcio detectada (**Tabla 3**) (Rumberger JA y cols., 1999). La ausencia de calcificación tiene un valor predictivo negativo del 95% a la hora de descartar lesiones coronarias significativas.

**Tabla 3.** Clasificación del riesgo cardiovascular asociado al grado de calcificación coronaria calculada por la escala Agatston. Adaptado de Rumberger JA y cols (1999)

Valor	Probabilidad de enfermedad	Riesgo cardiovascular*
0	Muy baja	Muy bajo
1-10	Muy poco probable	Bajo
11-100	Probabilidad mínima o leve de estenosis coronaria	Moderado
101-400	Alta probabilidad de enfermedad aterosclerótica	Moderado-alto
>400	Alta probabilidad de estenosis coronaria significativa	Alto

\*Mortalidad cardiovascular a 10 años

Además, el desarrollo de métodos volumétricos de cuantificación para el procesado de imágenes secuenciales de TCCM permite obtener equivalentes de volumen ( $\mu\text{L}$ ) y de masa (mg) de las placas calcificadas (Ohnesorge B y cols., 2002).

### 2.3.3. Aplicación clínica

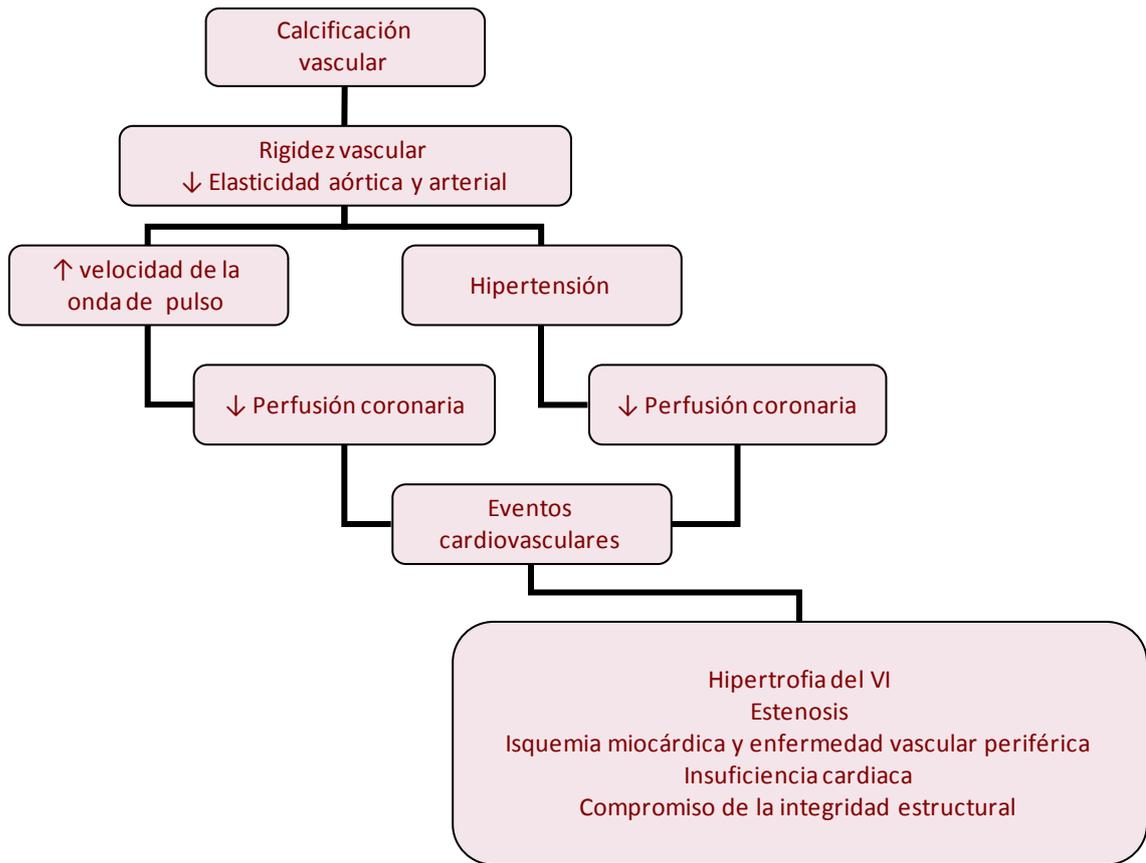
Existen tres situaciones clínicas en las que la realización de TC es de gran utilidad: estudio de pacientes con dolor torácico atípico, cribado de aterosclerosis coronaria en sujetos asintomáticos, y seguimiento y valoración de la progresión de la aterosclerosis coronaria tratada farmacológicamente. La American Heart Association (AHA) considera que la TCC negativa y coronariografía normal, representa una muy baja probabilidad de manifestación clínica cardiovascular en los siguientes 2-5 años, recomendando únicamente el seguimiento del paciente que se consideraría ambulatorio y estable (Bastarrika G y cols., 2004).

## 2.4. IMPACTO CLÍNICO DE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR

La principal repercusión clínica de la calcificación vascular es a la pérdida de elasticidad aórtica y arterial (**Figura 5**). Esta rigidez arterial perjudica significativamente la hemodinámica cardiovascular (Lakatta EG y cols., 2003-I). Las demandas hemodinámicas del sistema cardiovascular requieren del cumplimiento de la ‘fisiología de Windkessel’. Durante la sístole, la aorta almacena energía que libera durante la diástole, minimizando el gasto cardíaco. Esta función se refleja en la

densidad de elastina del arco, donde la energía mecánica es mayor. Sin embargo, en las arterias calcificadas se detecta un incremento de la velocidad de onda de pulso arterial (VOP), indicando una pérdida de esta función (alteraciones estructurales de la media, reducción de la elastina e incremento del colágeno vascular) y permite identificar la rigidez vascular (Lakatta EG y cols., 2003-II). El resultado es un incremento de la presión sistólica y el gasto cardiaco, lo que promueve el desarrollo de hipertensión arterial (sobrecarga de presión) y una menor perfusión coronaria. Todo ello concluye en el desarrollo de eventos cardiovasculares como: la insuficiencia cardiaca, la HVI, compromiso de la integridad estructural, isquemia subendocárdica y disfunción diastólica, independientemente de la aterosclerosis, envejecimiento, diabetes u otras condiciones subyacentes. Por otro lado, la calcificación de la válvula aórtica resulta, además, en estenosis aórtica (**Figura 5**).

En las arterias coronarias, los depósitos de calcio debilitan la respuesta vasomotora y alteran la estabilidad de la placa de ateroma (Lakatta EG y cols., 2003-II). Las calcificaciones de lesiones ateroscleróticas asociadas con angina inestable o infarto, suelen presentarse como múltiples depósitos pequeños de calcio. Por el contrario, la mineralización de arterias ateroscleróticas asociadas con angina estable suele presentarse como depósitos extensos. Aunque estos datos concuerdan con los resultados clínicos y de modelos animales, existe cierta controversia en cuanto al papel de la calcificación arterial en las placas ateroscleróticas y la estabilidad de las mismas.



**Figura 5.** Impacto clínico de la calcificación vascular.

### 3. LA CÉLULA DE MÚSCULO LISO VASCULAR

La calcificación ectópica, incluida la vascular, comparte ciertas similitudes con la formación de hueso u osteogénesis. De hecho, en términos estructurales y de análisis elemental, no hay diferencias significativas entre la osteogénesis y la calcificación ectópica (Epple M y cols., 2007). Durante la osteogénesis existen dos tipos mayoritarios de osificación: la osificación endocondral, que requiere de intermediarios condroblásticos y formación de cartílago previos a la mineralización u osificación y el reemplazamiento osteoblástico; y la osificación intermembranosa, en la que los osteoblastos son capaces de inducir la mineralización de la MEC sin presencia de intermediarios cartilaginosos (Kakashima K y cols., 2003).

#### 3.1. ORIGEN DE LA CÉLULA DE MÚSCULO LISO VASCULAR

El origen embrionario de la CMLV es muy variado incluso dentro del mismo vaso (Kumar MS y cols., 2003). Al igual que el sistema cardiovascular en general, la aorta se origina a partir de hasta tres orígenes distintos mayoritarios. Las células del arco aórtico de la aorta torácica proceden de la cresta neural. En la aorta dorsal que se extiende desde el arco aórtico hasta la unión con la aorta abdominal, la CMLV se origina a partir de los somitos mesodérmicos. En el desarrollo del arco aórtico y primer fragmento de la arteria abdominal también parece haber una implicación de los mesangioblastos, si bien el origen de las CMLV de la aorta abdominal está en el mesodermo esplácnico. Una última fuente de CMLV la constituyen la población de células mesenquimales vasculares y circulantes (Majesky MW. 2007) (**Figura 6**).

También el endotelio podría constituir una fuente de derivados mesenquimales mediante la transición endotelio-mesénquima en respuesta a la expresión del receptor tipo I de proteínas formadoras de hueso (BMP, bone morphogenic protein) (Medici D y cols., 2010).

En definitiva, el linaje mesodérmico constituye la fuente principal de CLMV si bien otros orígenes embrionarios pudieran estar involucrados en la diferenciación de la CMLV. Es importante remarcar que los precursores mesenquimales además de ser el origen principal de la CMLV también los son para fibroblastos, adipocitos, osteoblastos y condroblastos (**Figura 7**).

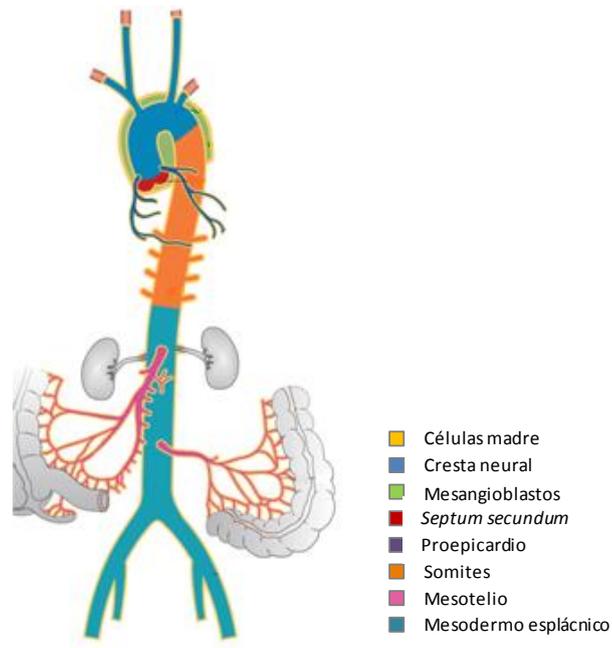


Figura 6. Orígenes embrionarios de la CMLV. Adaptado de Majesky y cols (2007)

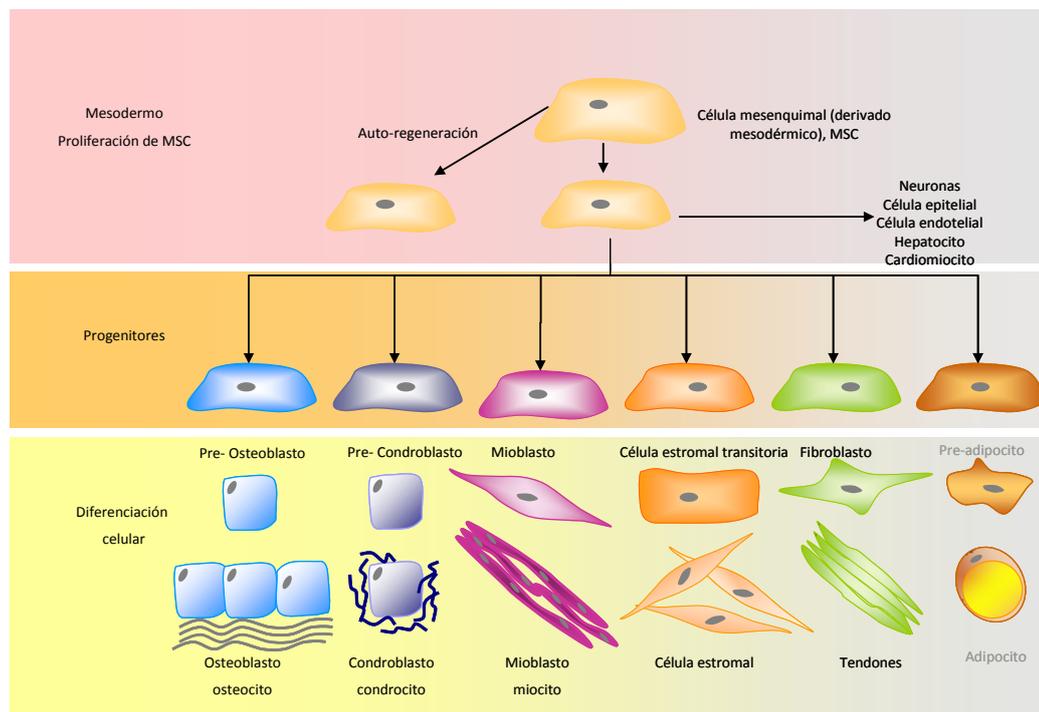
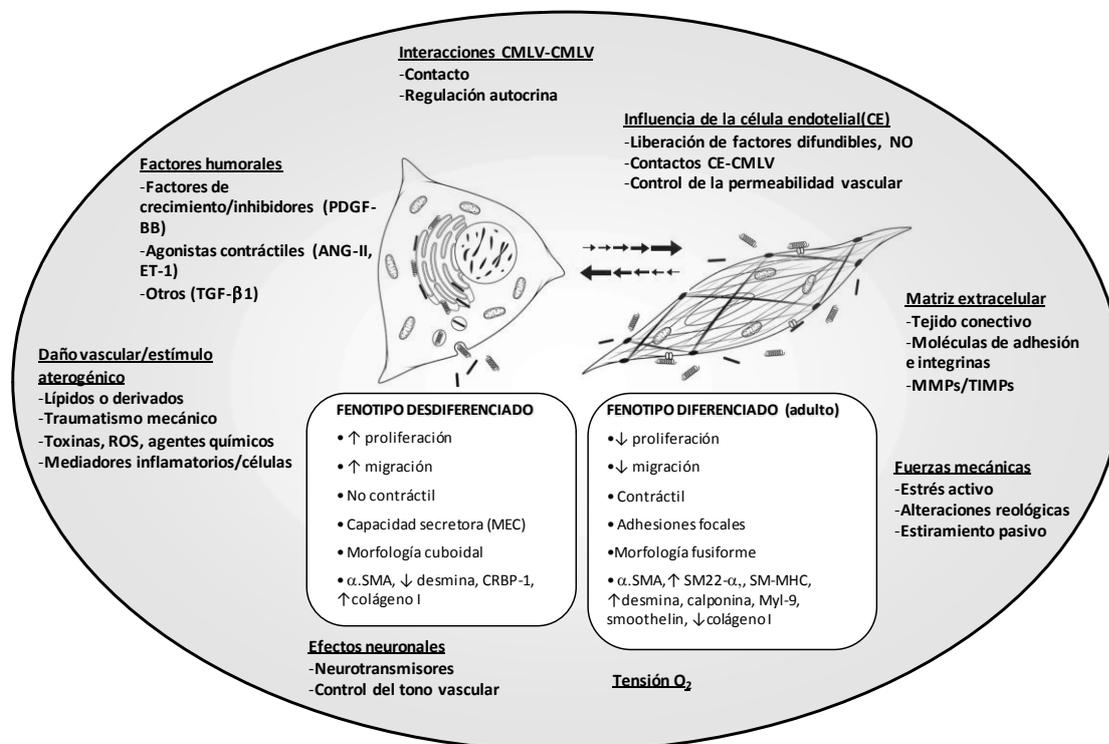


Figura 7. Linaje mesodérmico y plasticidad fenotípica de la célula mesodérmica. Las células mesodérmicas son capaces de diferenciarse en múltiples líneas celulares mesenquimales. MSC, célula mesenquimal.

### 3.2. PLASTICIDAD FENOTÍPICA FISIOLÓGICA Y PATOLÓGICA DE LA CMLV

La capacidad proliferativa de la CMLV es fundamental, incluso en procesos patológicos vasculares como la aterosclerosis, la re-estenosis post-angioplastia y la implantación de stents (Ross R. 1999). Durante el desarrollo de los vasos, la CMLV sufre una fase de proliferación rápida (fenotipo sintético) en la que la pared vascular adquiere el componente mayoritario de la túnica media (Cook CL y cols., 1994). A partir de ese momento, la CMLV entra en una fase quiescente, no proliferativa, sin capacidad migratoria, contráctil y diferenciada (Cook CL y cols., 1994; Clowes AW y cols., 1983). De este modo, la CMLV adulta adquiere su principal función especializada, la contráctil.

Sin embargo, la CMLV adulta conserva una elevada plasticidad fenotípica que permite su fácil desdiferenciación hacia un amplio espectro de fenotipos, como respuesta adaptativa a diferentes estímulos fisiológicos o patológicos (Shanahan CM y cols., 1998). Este ‘fenotipo cambiante’ (Owens GK y cols., 2004) (**Figura 8**) permite a la CMLV participar activamente en el desarrollo normal de los vasos y en multitud de procesos regenerativos, más allá de su principal función contráctil.



**Figura 8. Modulación fenotípica de la CMLV.** Diferentes estímulos filológicos o patológicos ejercen un papel regulador entre el fenotipo secretor y contráctil de la CMLV adulta. Adaptado de Owens y cols (2004).

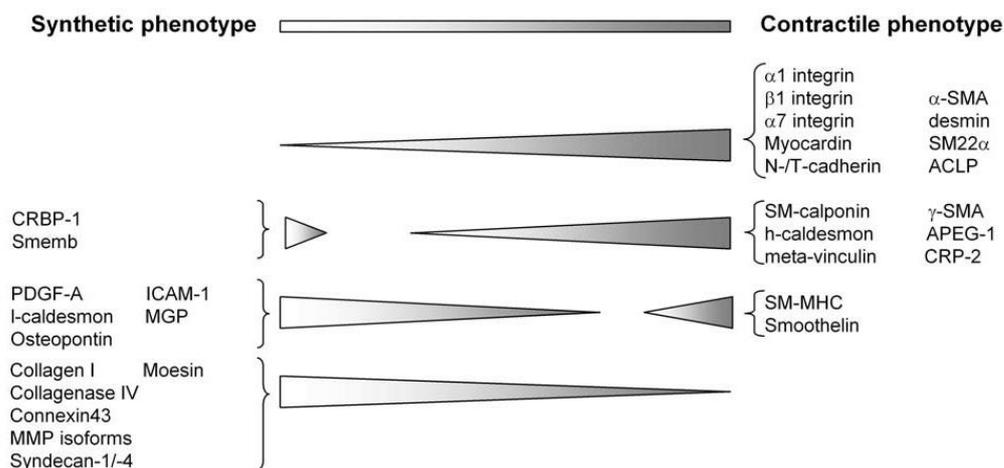
Adicionalmente, el ‘fenotipo cambiante’ intrínseco de la CMLV permite su participación en procesos patológicos localizados en áreas vasculares lesionadas (Clowes AW y cols., 1983; Weiser-Evans MCM y cols., 2000 (I); Iyemere VP y cols., 2006; Shanahan CM y cols., 1999 (I y II)). La lesión de la arteria adulta induce la desdiferenciación de la CMLV que adquiere un fenotipo secretor, no contráctil y proliferativo, semejante al de la CMLV embrionaria (Clowes AW y cols., 1983; Weiser-Evans MCM y cols., 2000 (I y II)). Además las CMLV adultas, durante los procesos reparativos tras daño vascular, recuperan el patrón de crecimiento embrionario (Cook CL y cols., 1994; Weiser-Evans MCM y cols., 2000 (I); Mourani PM y cols., 2004). El resultado es un crecimiento rápido suero-dependiente y, lo más importante, la capacidad de replicación independiente de mitógenos o suero (propia de la CMLV embrionaria). Ésta capacidad está totalmente ausente en la CMLV fetal, neonatal y adulta sanas. Así, la proliferación de la CMLV durante la formación de neoíntima parece ser independiente de los factores que estimulan el crecimiento normal de la CMLV adulta incluyendo factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, ‘Platelet-Derived Growth Factor’) o factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF, ‘basic Fibroblast Growth Factor’) (Ferns GA y cols., 1991; Linder V y cols., 1991). Ello sugiere una desdiferenciación de la CMLV adulta hacia fenotipos embrionarios durante el desarrollo y la progresión de la lesión vascular.

La elevada plasticidad fenotípica de la CMLV, altamente regulada ante lesiones vasculares, explica su fácil transdiferenciación hacia fenotipos osteo-condroblastos (Iyemere VP y cols., 2006) u otros derivados mesodérmicos (Shanahan CM y cols., 1999 (II)).

### **3.3. PAPEL DE LA CMLV EN LA CALCIFICACIÓN VASCULAR**

La CMLV juega un papel fundamental durante el desarrollo y progresión de la lesión arteriosclerótica, sea cual sea su etiología, y su transdiferenciación osteo/condroblástica activa se reporta desde fases tempranas tanto en procesos de calcificación de la íntima como de la media (Shen J y cols., 2011). Esto explica y justifica la utilización de modelos de calcificación vascular basados en la CMLV.

El estudio de la migración de la CMLV a la íntima en procesos de daño vascular ha permitido diferenciar al menos dos poblaciones de CMLV: diferenciadas y desdiferenciadas. Los diferentes fenotipos exhibidos por la CMLV se pueden caracterizar mediante la activación de diferentes programas de expresión génica y antigénica. Las CMLV localizadas en la íntima, a diferencia de las de la media, muestran un fenotipo secretor con baja expresión de marcadores contráctiles, miofilamentos y una elevada síntesis de proteínas que contribuyen a la estabilización de la lesión (Schwartz SM y cols., 1986; Schwartz SM y cols., 1995) Por el contrario, el fenotipo diferenciado de la CMLV, el contráctil, se caracteriza por la expresión mayoritaria de proteínas contráctiles, representando más del 40% de la proteína total en el caso de la  $\alpha$ -actina (Steitz SA y cols., 2001). El descenso de las mismas se asocia, por tanto, con una pérdida de fenotipo contráctil y la adquisición de un nuevo fenotipo re-diferenciado (transdiferenciación) (**Figura 9**). La pérdida o adquisición de estos marcadores constituye una herramienta útil en el estudio de la modulación fenotípica de la CMLV (Steitz SA y cols., 2001; House SJ y cols., 2008; Sammels E y cols., 2010). Proteínas como la proteína de músculo liso-22 alfa o transgelina (SM22- $\alpha$ , 'Smooth Muscle 22 alpha') o la proteína de músculo liso alfa actina ( $\alpha$ -SMA, 'alpha-Smooth Muscle Actin'), entre otras, son marcadores habituales para caracterizar el fenotipo de la CMLV durante los procesos de desdiferenciación (Steitz SA y cols., 2001).



**Figura 9. Marcadores fenotípicos de la CMLV diferenciada (contráctil) y desdiferenciada (secretora).** Adaptado de Steitz SA y cols. (Steitz SA y cols., 2001). CRBP, Proteína celular de unión a retinol o “Cellular Retinol Binding protein”, SMemb/MHC-B, Cadena pesada de la miosina de músculo liso o “Smooth Muscle myosin heavy chain”; PDGF-A, Factor de crecimiento A derivado de plaquetas o “Platelet-derived Growth Factor-A”; ICAM-1, Molécula 1 intracelular de adhesión celular o

“IntraCellular Adhesion Molecule-1”; MGP, Proteína Gla de la Matriz o “Matrix Gla Protein”; MMP, Metaloproteínasa o “Metalloproteinase”;  $\alpha$ -SMA, alfa-actina de músculo liso o “alpha Smooth Muscle Actin”; SM-calponin, calponina de músculo liso o “Smooth Muscle-calponin”; ACLP/AEBP1, Proteína tipo carboxipeptidasa aórtica o “Aortic Carboxipeptidase-Like Protein/ Adipocyte Enhancer Binding Protein-1”;  $\gamma$ -SMA, gama actina de músculo liso o “gamma-Smooth Muscle Actin”; APEG-1, Proteína 1 preferencialmente expresada en aorta o “Aortic Preferentially Expressed protein-1”; CRP-2, Proteína rica en cisteína o Cystein Rich Protein o “Cysteine-rich LIM-only protein 2”

Dos teorías intentan explicar la coexistencia de ambos fenotipos (contráctil y sintético) en el vaso. La primera propone el diferente origen embriológico como agente causal (Topouzis S y cols., 1996), dada la monoclonalidad observada en las CMLV de la íntima aterosclerótica (Benditt EP y cols., 1973; Murry CE y cols., 1997) y la identificación de clones fenotípicamente estables *in vitro* (Bochaton-Piallat ML y cols., 1993). Sin embargo, la segunda propone la existencia de una modulación fenotípica de las CMLV de la media que han migrado hacia la íntima durante los procesos reparativos (Weissberg PL y cols., 1996). La exhibición *in vitro* de diferenciación y transdiferenciación fenotípica de CMLV bajo diferentes estímulos refuerza esta teoría (Bochaton-Piallat ML y cols., 1996; Chamley-Campbell JH y cols., 1979; Neuville P y cols., 1997).

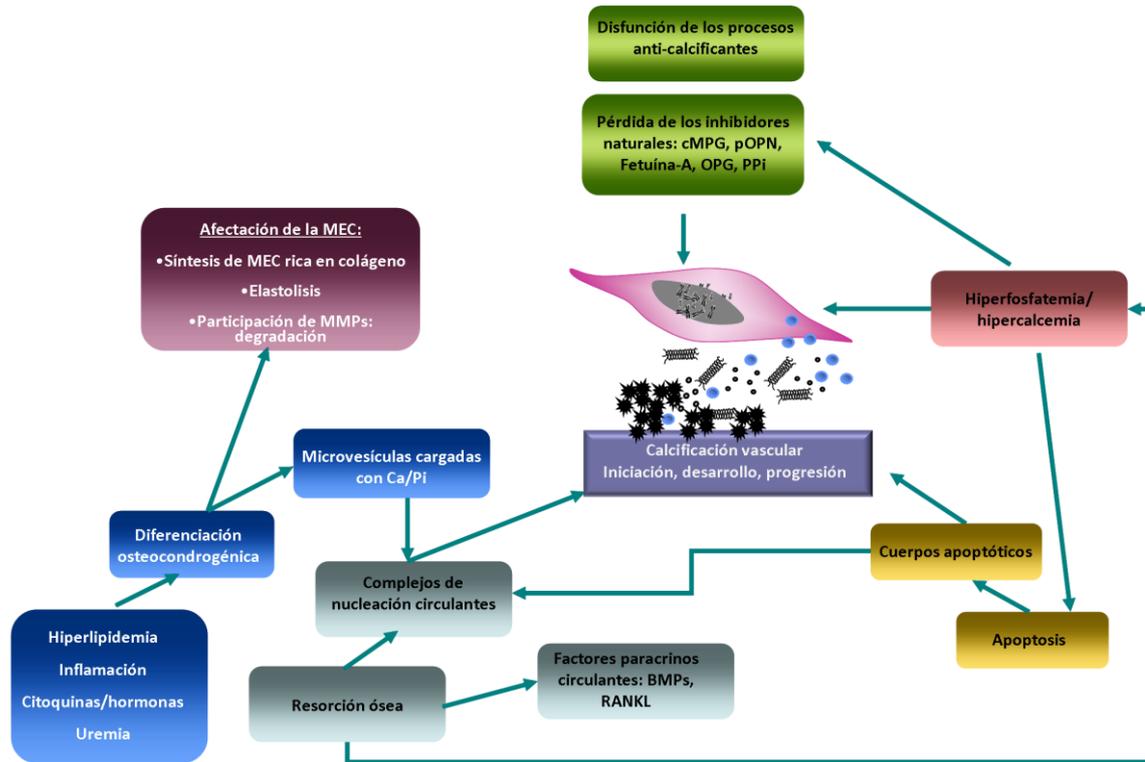
Otros componentes celulares como las células de la adventicia o células progenitoras circulantes también deben participar activamente en los procesos de calcificación ectópica (Sata M y cols., 2002; Abe R y cols., 2001; Shi Y y cols., 1996). En estos tipos celulares también se activan vías semejantes a las del desarrollo embrionario durante los procesos de daño-reparación (Kowal RC y cols., 1999; Weiser-Evans MCM y cols., 2000 (II)).

#### 4. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS Y MOLECULARES DE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR

La fisiopatología de la calcificación vascular muestra dos rasgos definitorios principales en los que acontecen eventos físico-químicos y biológicos: 1) la formación y deposición de fosfatos de calcio en la MEC, generalmente en formas cristalizadas de hidroxiapatita o bioapatita de calcio; y 2) la diferenciación osteo/condroblástica de la CMLV y otras células de origen mesodérmico.

Estudios recientes sugieren una relación entre las vías moleculares propias de la calcificación vascular y de la osteogénesis. La diferenciación de la CMLV en condroblastos y osteoblastos requiere la activación de vías moleculares características del proceso osteogénico (Moe SM y cols., 2003; Moe SM y cols., 2002; Steitz SA y cols., 2001). Del mismo modo se distinguen dos patrones de calcificación u osificación del tejido vascular: 1) *osificación intermembranosa* (células de origen mesodérmico se diferencian en osteoblastos productores de tejido óseo mineralizado); o 2) *osificación endocondral* (intermediarios cartilagosos son, finalmente, reemplazados por los osteoblastos).

A pesar de las similitudes entre la calcificación ectópica vascular y la fisiológica ósea, la calcificación vascular se asocia paradójicamente con la resorción ósea en el sistema esquelético y desórdenes del metabolismo mineral (*'paradoja de la calcificación'*) (Bucay N y cols., 1998). Los valores circulantes elevados de Ca, P y del producto calcio-fósforo (CaxP) promueven la deposición, nucleación y crecimiento de cristales de hidroxiapatita en la MEC (Block GA y cols., 2000; Yang H y cols., 2004; Reynolds JL y cols., 2004). Además, el desequilibrio entre los inhibidores y los agentes pro-calcificantes endógenos se asocia con el desarrollo de calcificación vascular (Speer MY y cols., 2004) (Esquema). Entre los inhibidores naturales de la calcificación en la CMLV están: PPi, osteopontina (OPN), osteoprotegerina (OPG) y MGP, algunos de los cuales se detallaran más adelante. También existen inhibidores circulantes como la fetuína-A que debe inhibir la calcificación dependiente de microvesículas (**Figura 10**).



**Figura 10. Mecanismos fisiopatológicos implicados en la calcificación ectópica.** Modificación adaptada de Giachelli CM y colaboradores (Giachelli CM. 2004)

Otros procesos como la alteración de MEC susceptible de mineralizarse, la inducción de procesos apoptóticos, la secreción de microvesículas y la expresión de factores de expresión osteogénica (FEO), incluyendo morfógenos pro-calcificantes y factores transcripcionales implicados en la expresión de genes osteo/condroblásticos, pueden converger durante la iniciación, el desarrollo y la progresión de la calcificación vascular. Sin embargo, todavía hoy no existe un consenso que defina la calcificación ectópica como un proceso fisiológicamente activado o inhibido (Schinke T y cols., 1999; Schinke T y cols., 2007) y actualmente conviven dos vertientes ideológicas sosteniendo ambas posturas.

#### 4.1. PROCESO DE MINERALIZACIÓN

A pesar de la íntima relación entre los procesos biológicos y los procesos físico-químicos, estos últimos han quedado olvidados en los estudios sobre calcificación vascular. No obstante, la escasa literatura disponible nos recuerda que las propiedades y el proceso físico-químico de formación de los fosfatos de calcio y de la apatita son más complicados que una simple precipitación de los mismos sobre la MEC.

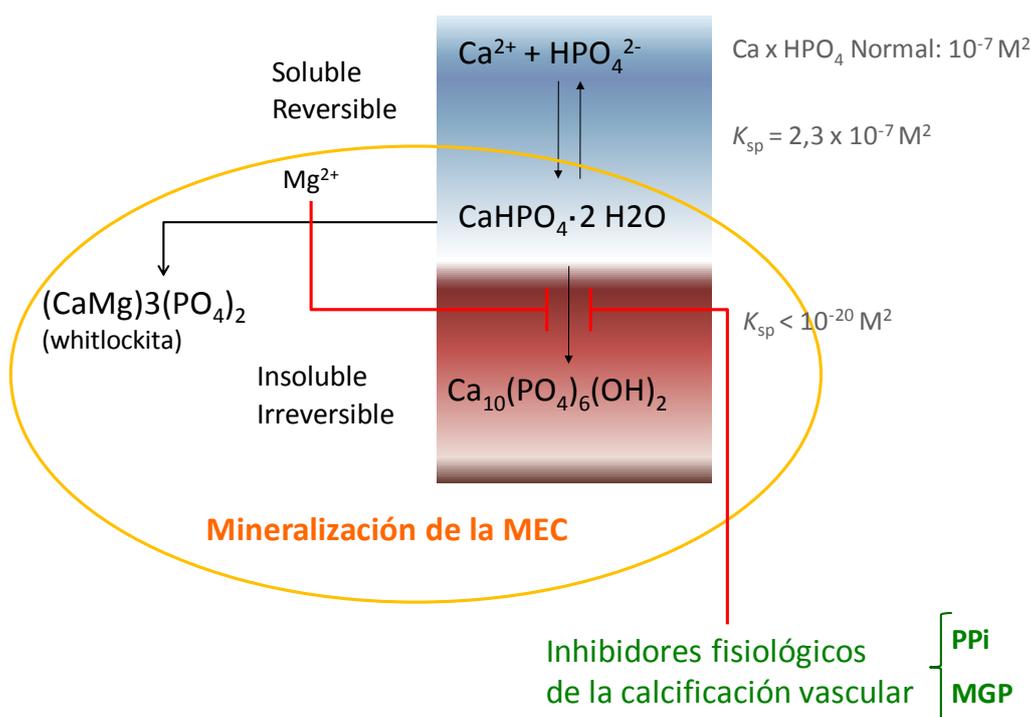
La forma predominante de mineralización ectópica de las paredes vasculares consiste en una combinación de depósitos de fosfato cálcico (no cristalizados y amorfos) y de cristales insolubles de apatita y whitlockita, mayoritarios con la maduración de MEC mineralizada (Moe SM y cols., 2004). Es necesario puntualizar que la whitlockita,  $(\text{Mg}, \text{Ca})_3(\text{PO}_4)_2$ , ha sido descrita en ratas tratadas con vitamina D (Verberckmoes SC y cols., 2007) y en pacientes urémicos (Schlieper G y cols., 2010), a pesar de que el  $\text{Mg}^{2+}$  inhibe la formación de apatita y estabiliza el fosfato de calcio amorfo (O'Neil WC. 2007) (**Figura 11**). Solo una vez ha sido descrita la presencia de whitlockita en pacientes no urémicos (Reid JD y cols., 1993). Así pues, diferentes fases minerales podrían estar presentes dependiendo del tipo de calcificación.

Los depósitos de hidroxiapatita o bioapatita,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , son exactamente depósitos de carbonato de apatita,  $(\text{Mg}, \text{Ca})_{10}(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_6(\text{OH})_2$ , (Moe SM y cols., 2004; Lomashvili K y cols., 2006; LeGeros RZ y cols., 1973; Bonucci E. 2007), aunque rara vez, se encuentra hidroxiapatita pura en las lesiones vasculares.

La calcificación ectópica debería ser un proceso termodinámicamente favorable a concentraciones normales de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Las concentraciones plasmáticas normales de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$  se encuentran próximas al punto de saturación para la hidroxiapatita pero, paradójicamente, por debajo de su constante de solubilidad en solución (fluidos meta-estables) en los fluidos extracelulares (O'Neil WC y cols., 2010; O'Neill WC. 2007; Schinke T y cols., 1999). Ello sugiere que la formación de hidroxiapatita a partir de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$  no ocurre directamente. El proceso de mineralización (LeGeros RZ y cols., 1973) requiere de, al menos, dos pasos para la formación última de la apatita, como demostraron Shear y Kramer (Shear MJ y cols., 1928). Pueden existir varios precursores de la biomineralización: el fosfato de octacalcio o fosfato de ácido cálcico ( $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) y el fosfato de di-calcio dihidratado o hipofosfato de calcio o brusita ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Brown WE y cols., 1987; Mats S y cols., 1992). El hipofosfato de calcio ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) se forma reversiblemente a partir de  $\text{Ca}^{2+}$  libre y  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (**Figura 11**) y gradualmente y espontáneamente se cristaliza e insolubiliza (en condiciones fisiológicas) formando la apatita (LeGeros RX y cols., 1973). Nanopartículas de apatita son las subunidades que originan las formaciones biológicas cristalinas o microcalcificaciones (Robinson C. 2007; Reid JD y cols., 1993). La morfología de los depósitos de calcio es muy variable según la localización y especie de estudio, presentándose como espículas, placas

redondeadas o agregados nodulares de 8 x 8 x 200 μm (Mats S y cols., 1992; Bonucci E. 2007).

Por tanto, *in vivo* deben existir factores locales que favorezcan la primera reacción y que abroguen la inhibición (papel de los inhibidores fisiológicos de la calcificación vascular) de la segunda reacción (Lomashvili KA y cols., 2004; Towler DA y cols., 2005; O’Neill WC. 2007(I); Schinke T y cols., 1999). Todo ello sugiere que la calcificación vascular debe ser un proceso activamente inhibido (O’Neil WC y cols., 2010), si bien los resultados *in vitro* sugieren que la mineralización de la MEC también es, al menos en parte, un proceso activamente regulado por productos génicos específicos. Componentes de MEC deben contribuir potencialmente (O’Neil WC. 2007 (I); O’Neil WC. 2007 (II); Schinke T y cols., 1999; Schinke T y cols., 2007).



**Figura 11. Formación de apatita en la pared vascular.** La mineralización vascular resulta de un proceso, de al menos dos pasos, que se inicia con la formación reversible del fosfato de calcio amorfo y soluble, seguida por la conversión espontánea en apatita. La primera reacción no debe ocurrir a concentraciones plasmáticas normales, que se encuentran por debajo de la solubilidad del producto  $CaHPO_4$ . La segunda reacción es esencialmente irreversible a pH fisiológico y está normalmente inhibida *in vivo*. Adaptado de O’Neil (O’Neil WC. 2007 (II)).

## 4.2. EFECTO DE LA HIPERFOSFATEMIA E HIPERCALCEMIA

El fósforo y calcio ingeridos se absorben en el intestino desde donde alcanzan el torrente sanguíneo. Ya en el riñón calcio y fósforo serán secretados o almacenados en el sistema esquelético, el mayor reservorio corporal dinámico de fosfato (85%) y calcio (99%) (Shanahan CM y cols., 2011). Complejos procesos de retroalimentación permiten la liberación a la sangre de calcio a demanda y a través del recambio dinámico de tejido óseo (Shanahan CM y cols., 2011; Hruska K y cols., 2008). Algunos reguladores hormonales de los valores circulantes de P son la hormona paratiroidea o PTH, el factor de crecimiento fibroblástico-23 (FGF-23, 'Fibroblast-Growth Factor 23), klotho y la 1, 25-dihidroxitamina D (Shanahan CM y cols., 2011).

Se ha publicado que valores elevados de Ca y P son importantes inductores de la transdiferenciación de la CMLV a osteo/condroblasto y, por tanto de la mineralización vascular. Algunos autores también incluyen el producto CaxP como factor de riesgo independiente para el desarrollo de calcificación ectópica vascular. De nuevo, es importante señalar que la formación de bioapatita a partir de  $Ca^{+2}$  y  $HPO_4^{2-}$  es compleja y no puede ser descrita por una simple reacción de precipitación del producto CaxP (O'Neill WC. 2007 (I)). Además los datos epidemiológicos no son consistentes y no existen pruebas causales que indiquen que el producto CaxP es realmente un factor de riesgo (O'Neill WC. 2007 (I)).

### 4.2.1. Hiperfosfatemia

El fósforo es un importante componente celular y participa en la regulación de la homeostasis (generación adenosín trifosfato o ATP, señalización intracelular, sistemas tamponadores, principal constituyente óseo, de fosfolípidos y ácidos nucleicos). Éste representa un 14% y un 1% de los compartimentos intra y extracelulares, respectivamente.

La hiperfosfatemia ( $< 5,5\text{mg/dL}$ ) es un reconocido factor de riesgo cardiovascular en pacientes renales y en la población en general (Block GA y cols., 1998; Tonelli M y cols., 2009; Dhingra R y cols., 2007). Incluso valores de normofosfatemia (2,5-4,5 mg/dL, 0,8-1,46 mM) se asocian con un incremento del riesgo cardiovascular e inducción osteo/condroblástica de la CMLV *in vitro* (Shanahan CM y cols., 2011; Beazley KE y cols., 2012; O'Neil WC y cols., 2010; O'Neill WC. 2007 (I); Villa-

Bellosta R y cols., 2011(II)), lo que sugiere nuevamente la presencia de inhibidores fisiológicos de la calcificación vascular. Estudios recientes (Villa-Bellosta R y cols., 2011(I)) demuestran un estadio inicial de deposición pasiva de calcio inducida por Pi in vitro favorecido por la ausencia de inhibidores naturales, seguida de la transición fenotípica de la CMLV a osteo/condroblastos y la mineralización activa regulada por la expresión de los factores de transcripción específicos osteogénicos (FEO).

El efecto de la hiperfosfatemia y la hipercalcemia en la CMLV humana deben estar mediados por el co-transportador NaPi tipo III (NPC fosfato dependiente de sodio), en particular por los transportadores de fosfato inorgánico tipo 1 y 2 (PiT-1 y PiT-2, respectivamente) (Li X y cols., 2006; Collins JF y cols., 2004). La expresión de PiT-1 y PiT-2 es ubicua, pero se ha visto que PiT-1 se expresa 8 veces más que PiT-2 en la CMLV humana y murina (Shanahan CM y cols., 2011; Zhu D y cols., 2011; Villa-Bellosta R y cols., 2007). PiT-1 y PiT-2 deben actuar como sensores del P extracelular (Shanahan CM y cols., 2011), induciendo la transdiferenciación de la CMLV y la mineralización de la MEC (Yoshiko Y y cols., 2007; Speer MY y cols., 2009). Además la presencia de PiT-1 en las microvesículas celulares las convierte en un reservorio masivo de mineral (Yang H y cols., 2004). Sin embargo, en rata la expresión de PiT-1 y PiT-2 es equitativa y ambos son capaces de saturarse incluso en condiciones de normofosfatemia (Villa-Bellosta R y cols., 2007). Solo una sobreexpresión de los transportadores podría explicar la función sensora ante el fósforo adsorbita a los PiT-1 y PiT-2 (Villa-Bellosta R y cols., 2009) por lo que no está claro que sea el transporte de P el que medie el efecto calcificante de la hiperfosfatemia (Villa-Bellosta R y cols., 2011(I); Villa-Bellosta R y cols., 2007; Villa-Bellosta R y cols., 2009). Se ha sugerido la existencia de otros transportadores de P, todavía no caracterizados, independientes de  $\text{Na}^+$  y funcionales ante la saturación de los PiT-1 y PiT-2 (Beck L y cols., 2009; Villa-Bellosta R y cols., 2007) (**Figura 12**). Además, Beck y colaboradores (Beck L y cols., 2009) demostraron que la expresión de PiT-1 en el RE se asocia con proliferación celular, lo que sugiere una funcionalidad de los PiT independiente del transporte de Pi (Beck L y cols., 2009; Villa-Bellosta R y cols., 2007).

#### 4.2.2. Hipercalcemia

El calcio (forma ionizada y difundible) es fundamental para multitud de procesos fisiológicos (señalización intracelular, potenciales de acción, coagulación y componente mayoritario esquelético). El 99% se encuentra en el hueso, tras la absorción mayoritaria

a nivel del duodeno. Alrededor del 98% es reabsorbido en los riñones y su movilización diaria permite la formación y resorción ósea. Como el P, el Ca viene regulado por los valores de 1,25-dihidroxitamina D, PTH y Klotho, así como por calcitonina.

La hipercalcemia también se asocia con un elevado riesgo cardiovascular (Shanahan CM y cols., 2011), siendo muy frecuente en pacientes renales. Incluso las hipercalcemias esporádicas, frecuentes en pacientes dializados pero subestimados en los controles analíticos, deben ser altamente nocivos.

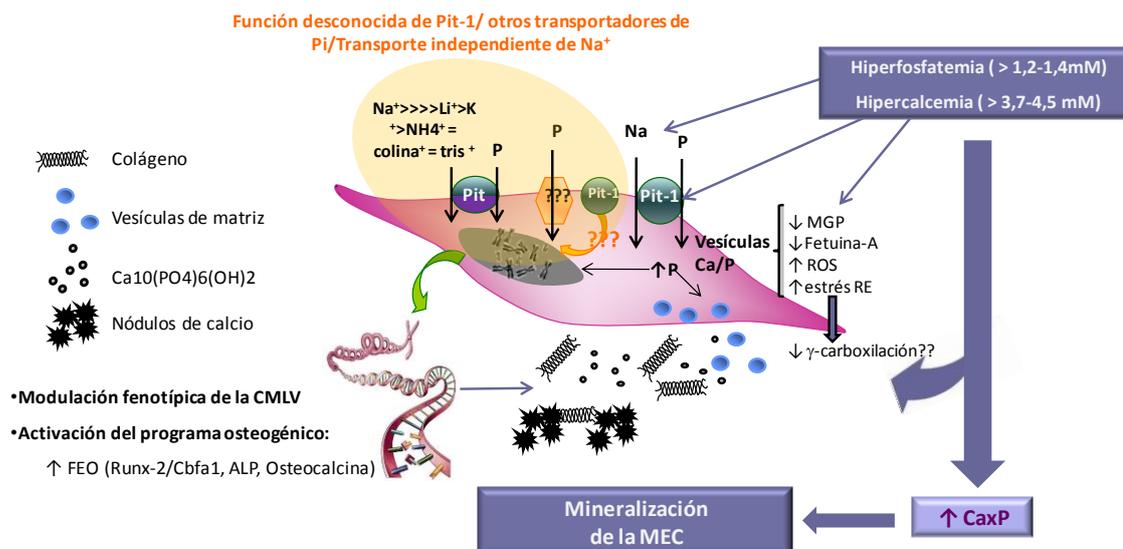
Canales de sodio y bombas iónicas son responsables de regular los valores extracelulares e intracelulares de sodio y de la sensibilización de la CMLV ante la hipercalcemia. La regulación del contenido celular de calcio es dependiente del fenotipo de la CMLV (House SJ y cols., 2008; Sammels E y cols., 2010) y, a su vez, ejerce un impacto dramático sobre la funcionalidad de la misma induciendo respuestas adaptativas (secreción de MGP y fetunína-A), estrés del retículo endoplasmático y, como resultado, regulación ostoblástica (Reynolds JL y cols., 2004; Farzaneh-Far A y cols., 2000; Chen NX y cols., 2008; Farzaneh-Far A y cols., 2001(I); Farzaneh-Far A y cols., 2001(II); Shanahan CM y cols., 1994; Ravindran S y cols., 2011; Boraldi F y cols., 2009; Murakami T y cols., 2009; Saito A y cols., 2009; Tohmonda T y cols., 2011). Además, la elevación del calcio extracelular, sin necesidad de su internalización, parece ejercer un efecto osteoinductor sobre la CMLV a través del receptor CaR y la regulación de la PTH (Smajilovic S y cols., 2007; Molostvov G y cols., 2007).

#### 4.2.3. Sinergia hipercalcemia- hiperfosfatemia

Valores elevados de  $\text{Ca}^{2+}$  deben mediar indirectamente la transición fenotípica de la CMLV (sobreexpresión de los FEO y otros morfógenos) a través de un proceso sinérgico con la hiperfosfatemia. A pesar de la controvertida función de los PiT y el  $\text{HPO}_4^{2-}$ , el  $\text{Ca}^{2+}$  parece inducir la expresión génica de PiT-1 y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Shroff RC y cols., 2010; Yang H y cols., 2004), lo que facilitaría la señalización mediada por la hiperfosfatemia (**Figura 12**).

Además, tanto la hiperfosfatemia como la hipercalcemia promueven la secreción de microvesículas de matriz y la producción de cuerpos apoptóticos procedentes tanto de CMLV vivas como muertas. La composición en anexinas y fosfolípidos de los derivados membranosos actúan como potenciales sitios de nucleación mineral, tanto en

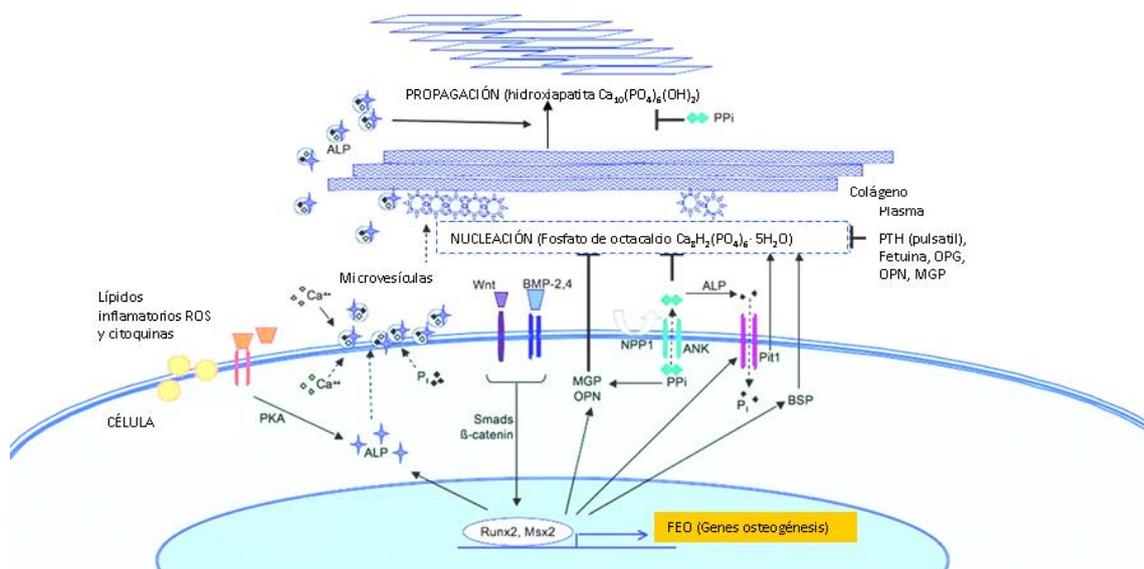
el interior como en superficie, desde estadios muy tempranos, actuando como iniciadores de la mineralización de la CMLV (Shanahan CM y cols., 2011; Reynolds JL y cols., 2004; Reynolds JL y cols., 2005). Además el contenido en proteínas capaces de unir calcio, fosfatasa alcalina (ALP) y elementos colagénicos y no colagénicos, así como cristales de hidroxapatita ‘preformados’, y la ausencia de inhibidores de la calcificación, explicaría éste fenómeno (Giachelli CM. 2004; Shanahan CM y cols., 2011).



**Figura 12. Modelo de los efectos del calcio y el fósforo sobre la CMLV y la calcificación ectópica.** Adaptado de Giachelli y colaboradores (Giachelli CM. 2004)

### 4.3. INDUCTORES DE LA CALCIFICACIÓN ECTÓPICA

Además de la hiperfosfatemia e hipercalcemia, otras situaciones patológicas como la uremia, el estrés oxidativo, la inflamación y valores elevados de leptina, glucocorticoides o glucosa son capaces de inducir la diferenciación osteoblástica de la CMLV (Mizobuchi M y cols., 2009). Esto ocurre generalmente a través del efecto paracrino y autocrino de determinadas proteínas como las **proteínas BMP** (“Bone morphogenetic proteins”) y la activación y expresión de diferentes factores implicados en la regulación de la diferenciación osteo/condroblástica (FEO) (Johnson RC y cols., 2009). (**Figura 13**).



**Figura 13. Representación esquemática de la regulación de la bio mineralización ectópica inducida por diferentes factores endógenos inductores de la calcificación.** Adaptado de Demer LL y cols. (Demer LL y cols., 2008).

Las BMPs son un grupo de más de 40 proteínas de la superfamilia del Factor de Crecimiento Tumoral beta (TGF- $\beta$ , “Tumour Growth Factor-beta”) y se caracterizan por formar homodímeros con un Cys knot (puentes disulfuro entre tres pares de Cys) como motivo estructural (Santibañez JT JF y cols., 2011). Aunque BMP-7 parece inhibir la calcificación vascular, BMP-2, BMP-4 y BMP-6 son potentes morfógenos inductores de la diferenciación osteo/condroblástica (Hruska KA y cols., 2005; Johnson RC y cols., 2006).

La sobreexpresión de BMP-2 y BMP-4 en la lesión aterosclerótica se ha descrito en los dos tipos celulares vasculares mayoritarios (CE y CMLV) y también se ha asociado con procesos de inflamación local y calcificación ectópica (Böstrom K y cols., 1993; Csiszar A y cols., 2005; Dhore CR y cols., 2001; Shin V y cols., 2004; Grainger DJ. 2004; Grainger DJ. 2007). Sin embargo, la señalización dependiente de BMP-2 es la mejor caracterizada.

Los receptores de canónicos de BMP, BMPR tipo I (ALK) y BMPR tipo II (BMPR2), son Ser/Thr kinasas que forman un heterotetrámero en presencia de dímeros de BMP. Sin embargo, BMP-2 puede participar en vías de señalización alternativas a la unión con los receptores ALK y BMPRII (Johnson RC y cols., 2006; Zhang YE. 2009).

Por lo general, la unión de la BMP al receptor BMPR2 resulta en la activación del BMPR1, provocando la fosforilación y traslocación nuclear de los factores

transcripcionales Smad (Massague J y cols., 2000; Chen D y cols., 2004) y la consiguiente activación de los FEO y represión de inhibidores naturales de la calcificación (Chen AL y cols., 2004; Chen D y cols., 2004; Israel DI y cols., 1992; Massagué J y cols., 2000; ten DP y cols., 2003; ten Dijke P y cols., 2003; Hruska KA y cols., 2005; Ryoo HM y cols., 2006) (**Figura 14**). Se diferencian los R-Smad (Smad 1, 2, 3, 5 y 8/9), las I-Smad (Smad 6, 7) y la co-Smad (Smad4). Por un lado, Smad 6 se une a BMPR1 y bloquea la fosforilación de Smad1/5/8. Por otro lado, Smad 7 parece unirse a BMPR2 inhibiendo la formación del heterodímero y la señalización dependiente de BMP-2 (Galvin KM y cols., 2000; Hruska KA y cols., 2005). Además las I-Smad pueden reclutar las proteínas Smurf (“E3 ubiquitin-protein ligases”) que inducen la degradación proteosomal de las R-Smad, los BMPR y del factor Runx2/Cbfa1. Por otro lado, la señalización dependiente de Smad 2, 3 está implicada en procesos apoptóticos y neogénesis de MEC. En respuesta a BMP-2, Smad 1/5/8 se unen a Smad4 formando un complejo capaz de atravesar el núcleo donde inducen la expresión de los genes codificadores de Runx2/Cbfa1 y Osterix/SP7, entre otros (Hruska KA y cols., 2005; Ulsamer A y cols., 2008; Goodwin AM y cols., 2002; Mao B y cols., 2002; Cai J y cols., 2012; Shu B y cols., 2011).

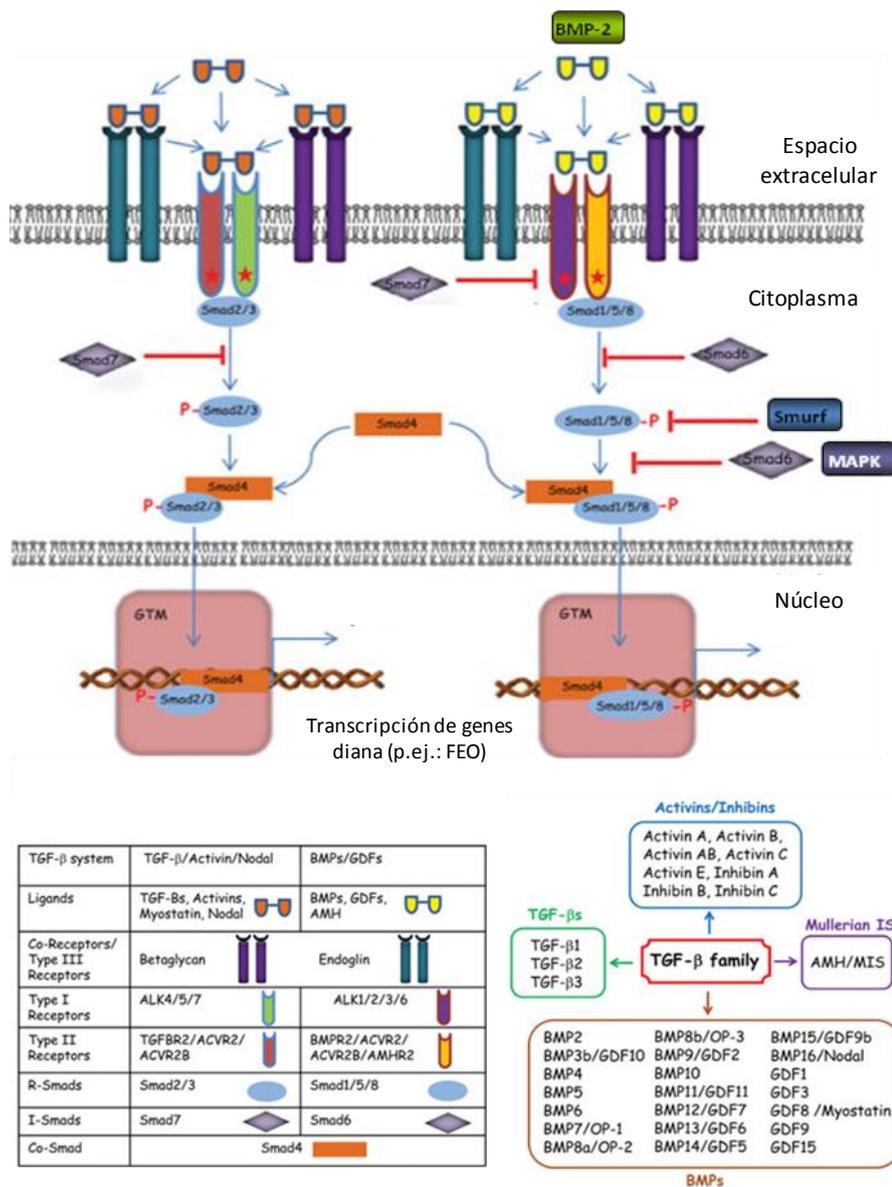


Figura 14. Miembros de la superfamilia TGF-β y mecanismo de acción putativo. Adaptado de Santibañez y cols. (Santibañez JF y cols., 2011).

Diferentes condiciones pro-calcificantes, como la hiperfosfatemia y la uremia, inducen la expresión del gen *RUNX2* que codifica el factor transcripcional heterodimérico **Runx2/Cbfa1** (“Runt-related transcription factor-2/ Core binding factor β”) (Tyson KL y cols., 2003; Jono S y cols., 2000). Runx2/Cbfa1 es el efector necesario de BMP-2, de acuerdo con estudios con construcciones adenovirales (Tyson KL y cols., 2003; Franceschi RT y cols., 2003). Así pues, Runx2/Cbfa1 participa como ‘regulador maestro’ temprano de la diferenciación osteoblástica y la maduración condroblástica

durante la formación de hueso fisiológica y patológica (Komori T. 2010; Cai J y cols., 2012; Mundlos S y cols., 1999; Moe SM y cols., 2003; Shanahan CM y cols., 2011), mediante la activación de otros genes implicados en la diferenciación osteogénica. La importancia de Runx2 en la osteoblastogénesis queda patente en los modelos murinos *knock-out* para *Runx2* (Komori T y cols., 1997; Ducy P y cols., 1997) y en la haplodeficiencia humana de RUNX2 (Mundlos S y cols., 1997; Otto F y cols., 1997), en los que la osificación queda gravemente comprometida. Además, la expresión de Runx2 sólo se ha descrito en lesiones ateroscleróticas avanzadas, pero no en vasos normales (Shindyapina AV y cols., 2014).

Las características estructurales de Runx2 permiten su localización nuclear y sub-nuclear, donde desempeña su función, (Yoshiaki I. 2004). Dichas características son comunes entre los diferentes genes RUNX de mamíferos (RUNX1, control de la hematopoyesis; RUNX2, control de la osteogénesis; y RUNX3, control del desarrollo epitelial y neuronal) (Stein GS y cols., 2004). El extremo N-terminal es la subunidad  $\alpha$  donde se sitúa el dominio *runt* de unión al DNA, homólogo al *runt* de *Drosophila*; en la subunidad  $\beta$  se sitúa el “core-binding factor- $\beta$ ” (Cbfa1) altamente conservado. El dominio Cbfa estabiliza las interacciones del dominio *runt* con el DNA y lo protege de la fosforilación y degradación proteosomal. Por otro lado, la presencia de las secuencias NLS (“nuclear localization sequence”) y NMTS (“nuclear matrix target sequence”) en el extremo C-terminal, permiten la localización nuclear y sub-nuclear de Runx2/Cbfa1. Además, en el extremo C-terminal se localiza una secuencia de aminoácidos (VWRPY) muy conservada (Figura 15).

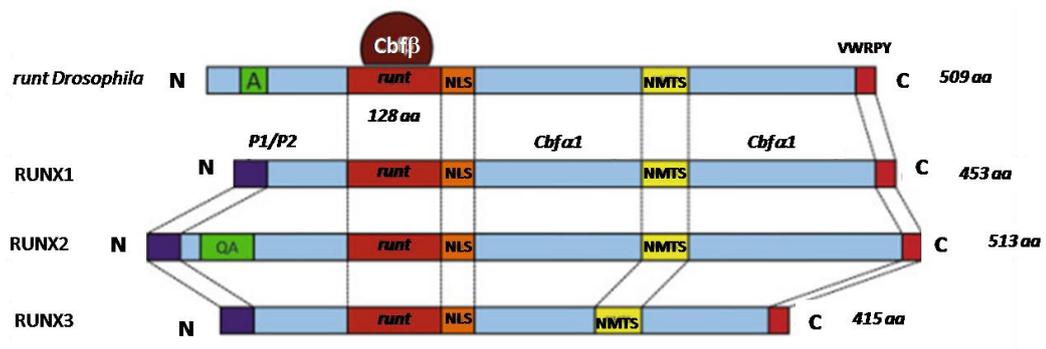


Figura 15. Isoformas de RUNX en mamíferos. Adaptado de Yoshiaki I (Yoshiaki I. 2004).

La cascada de activación de Runx2/Cbfa1 supone la activación de otros factores transcripcionales implicados en la osteogénesis e induce la expresión de proteínas propias del fenotipo osteoblástico.

Runx2/Cbfa1 es capaz de unirse al promotor del gen *SP7* e inducir la expresión de **Osterix (Osx)**, el principal efector de Runx2/Cbfa1 (Nakashima K y cols., 2002; Nishio Y y cols., 2006), si bien algunas señales osteogénicas son capaces de inducir la activación independiente de Runx2/Cbfa1 (Artigas N y cols., 2014). Osx es un factor transcripcional propio del osteoblasto que regula negativamente la diferenciación condroblástica (Kakashima K y cols., 2003). Osx previene la diferenciación condroblástica e induce la diferenciación osteoblástica (Hill TP y cols., 2005). Muchos de los promotores de genes específicos de osteoblastos contienen tanto los sitios de unión a Runx2/Cbfa1 (TGTGGT) como las ‘Sp1-boxes’ a las que se une Osterix. Así, son diversos los estudios que evidencian una compleja cooperación funcional entre Runx2/Cbfa1 y Osx (Artigas N y cols., 2014).

Tanto Runx2/Cbfa1 como Osx son capaces de unirse al promotor de BGLAP e inducir la expresión de osteocalcina (marcador de fenotipo osteoblástico) (Koga T y cols., 2005). Además, ambos favorecen la formación de MEC. En el caso de Osx mediante la unión al promotor de COL1A1 (Koga T y cols., 2005; Ortuño MJ y cols., 2013); y en el caso de Runx2/Cbfa1 mediante la activación de ATF6 y las subsiguiente expresión de Col1a1, Col1a2 y OCN, entre otras (Xiao G y cols., 2005; Komori T. 2010; Franceschi RT y cols., 2003; Tyson KL y cols., 2003; Shanahan CM y cols., 2011).

Osx también es responsable de inducir la expresión de ALP (Shanahan CM y cols., 2011; Nakashima K y cols., 2002). La **ALP** es una enzima glicosilada de unión a membrana, con actividad pirofosfatasa y se considera un marcador fenotípico osteoblástico crucial en el proceso de mineralización. ALP favorece la liberación de fosfato inorgánico a partir de formas orgánicas, como pirofosfato o PPI, utilizando  $Mg^{2+}$  como cofactor (Shioi A y cols., 2002; Lomashvili KA y cols., 2004; Lomashvili KA y cols., 2005; Lomashvili KA y cols., 2008), por lo que induce una hiperfosfatemia local mediante la depleción del inhibidor natural PPI. Además, ALP debe inhibir la funcionalidad de osteopontina (inhibidor natural de la calcificación vascular) al impedir la fosforilación necesaria de los residuos Ser y Thr de la OPN (Jono y cols, 2000(II); Essalihi R y cols., 2004; Lomashvili KA y cols., 2004).

Finalmente, miembros de la vía **Wnt**, junto con **Osx**, previenen la diferenciación condroblástica (Hill TP y cols., 2005). La vía canónica de Wnt permite la estabilización y activación de la  $\beta$ -catenina, su acumulación citosólica y su transporte nuclear. En el núcleo,  **$\beta$ -catenina** se asocia con la familia de factores de transcripción TcF/LEF y regula la expresión de diferentes genes diana de las vías de Wnt/ $\beta$ -catenina. Así,  $\beta$ -catenina recluta a la proteína CBP de unión a CREB, que induce la expresión de **Osx/SP7** (Rifas L y cols., 2003; Hruska KA. Y cols., 2005). También regula la expresión de **Runx2/Cbfa1**. Rodríguez-Carballo y colaboradores (Rodríguez-Carballo E y cols., 2011) describieron la colaboración molecular entre BMP-2 y Wnt/ $\beta$ -catenina durante la activación temprana de genes osteogénicos, como **Runx2**, en células mesenquimales. La inducción de estos genes se media a través de la formación de un complejo de cooperación que implica a las proteínas Smad y la unión de  $\beta$ -catenina a TcF/LEF (TCF4) y “enhancers”, resultando en un reclutamiento más eficiente de coactivadores como p300.

#### 4.4. INHIBIDORES FISIOLÓGICOS DE LA CALCIFICACIÓN ECTÓPICA

Dada la complejidad del proceso de calcificación ectópica, que parece estar gobernado más por procesos biológicos que por las propiedades fisicoquímicas séricas, la pérdida de la inhibición natural es fundamental (Ewence AE y cols., 2008). De entre los múltiples inhibidores fisiológicos de la calcificación descritos en la bibliografía a continuación únicamente se describirán el PPI, la MGP y la fetuína-A. Otros inhibidores como la osteopontina, cuya expresión es anormalmente elevada únicamente en placas ateroscleróticas severas y calcificación valvular únicamente como respuesta adaptativa para contrarestar la progresión de la calcificación (Giachelli CM y cols., 2000; Steitz SA y cols., 2002; Speer MY y cols., 2002; Jono S y cols., 2002(II); Essalihi R y cols., 2004; Lomashvili KA y cols., 2004; Ahmed S y cols., 2001; Moe SM y cols., 2002; Giachelli CM y cols., 1993; Fitzpatrick LA y cols., 1994; Speer MY y cols., 2002; Mizobuchi M y cols., 2009); o la osteoprotegerina cuya utilización como biomarcador sistémico de la calcificación vascular es controvertida a pesar de la aparente actividad inhibidores de ALP, apoptosis y calcificación medial (Collin-Osdoby P y cols., 2001; Papadopouli AE y cols., 2008; Bucay N y cols., 1998; Panizo S y cols., 2009;

Mizobuchi M y cols., 2009; Schoppet M y cols., 2004; Campenhout AV y cols., 2009; Aoki a y cols., 2013), no se profundizan en este trabajo

El **PPi** es una molécula pequeña constituida por la unión de dos iones fosfato unidos por enlace éster que se genera mediante la hidrólisis de nucleótidos trifosfato catalizada por miembros de la familia de la ectonucleotido pirofosfato/fosfodiesterasa (NPP). La afinidad de los grupos fosfato por el calcio presente en la hidroxiapatita hace que el PPi inhiba directamente la calcificación y, además previene la incorporación de P a éstos critales (Fleisch H y cols., 1962; Price PA. 1989; Rutsch F, y cols., 2001; Murshed M y cols., 2005; Proudfoot D y cols., 2006). La CMLV es una fuente de PPi y las concentraciones fisiológicas de PPi son suficientes para inhibir la calcificación vascular en normofosfatemia, incluso en ausencia de actividad celular, pero resulta insuficiente en condiciones de hiperfosfatemia y solo es capaz de inhibir un 30% de la calcificación (Villa-Bellosta R y cols., 2011(II)).

Por otro lado, la **MGP** fue el primer inhibidor endógeno de la calcificación en ser identificado. Pertenece al grupo de las denominadas proteínas Gla o dependientes de vitamina K que se verán más adelante con más detalle en el apartado titulado *La gamma-carboxilación dependiente de vitamina K* epígrafe *Proteínas Gla del metabolismo óseo*. MGP se expresa de forma constitutiva en condroblastos, osteoblastos, CMLV y CE. Diferentes aproximaciones que incluyen modelos animales *knock-out* para el gen *Mgp*, análisis experimental-computacional, ensayos de MGP circulante humana o estudios anatomo-patológicos de arterias calcificadas sugieren que MGP debe inhibir la calcificación vascular directa e indirectamente (Tyson KL cols., 2003; Proudfoot D. 2006). Además, la MGP parece acomplejarse con el inhibidor circulante de la calcificación vascular, la fetuína-A. Así el complejo sérico MGP-Fetuína parece evitar la propagación de la nucleación de fosfato de calcio en los vasos, aunque esto no se ha podido confirmar explícitamente (Price PA y cols., 2002)

La **fetuína-A** es una glicoproteína sérica (glicoproteína  $\alpha 2$ -Heremans-Schmid) capaz de unir  $Ca^{2+}$ . El papel de la fetuína-A en la calcificación ectópica se ha demostrado en el modelo murino *fetuin-A-null* donde se observa mineralización masiva de múltiples órganos y sistemas, incluyendo riñón, lengua, piel y miocardio (Schafer C y cols., 2003; Mizobuchi M et al. Vy cols., 2009). Concretamente, la fetuína-A reduce la formación de novo de cristales de hidroxiapatita en soluciones que contienen Ca y P,

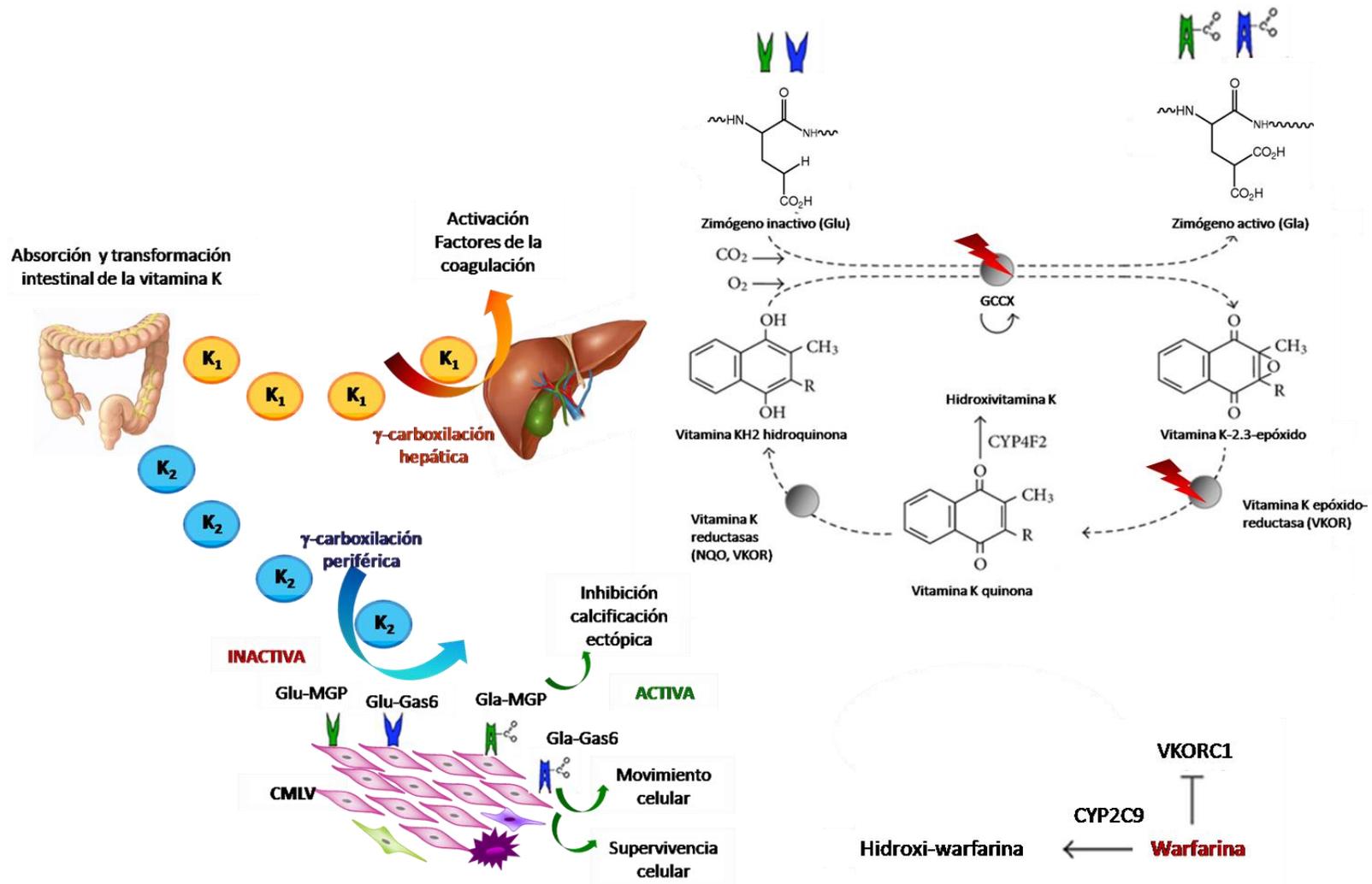
pero no afecta a los ya formados. Así pues, su acción inhibe la calcificación pero no la revierte (Heiss A y cols., 2003).

La producción y secreción de fetuína-A, principalmente hepática, se ve modificada como constantes respuestas adaptativas a la desregulación homeostática del calcio. Por un lado, la CMLV es capaz de internalizar la fetuína-A sérica y empaquetarla en microvesículas de matriz. La secreción de estas microvesículas cargadas de abundante fetuína-A, hacia el espacio extracelular, impide la habilidad de éstas para actuar como sitios de nucleación. Por otro lado, la internalización de fetuína-A por parte de la CMLV también se ve incrementada por valores de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular elevados, que no de  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Esta internalización de fetuína-A facilita la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la CMLV e inhibe su mineralización (Mizobuchi M y cols., 2009; Reynolds JL y cols., 2005). La formación de grandes complejos calciproteicos de fetuína-A-A también facilita la eliminación de cristales de hidroxapatita ‘desnudos’ y minimizan la respuesta inflamatoria inducida por macrófagos (Evrard S y cols., 2015).

## 5. LA GAMMA-CARBOXILACIÓN DEPENDIENTE DE VITAMINA K

El sistema de gamma-carboxilación dependiente de vitamina K es un complejo multimérico de proteínas integrales de membrana localizados en el retículo endoplasmático (RE) (Wallin y cols., 2001; Cain D y cols., 1998). La modificación post-traducciona l de residuos específicos de glutamato (Glu) a ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico (Gla), normalmente localizados en el extremo N-terminal (Suttie J. 1985), se realiza en presencia de vitamina K reducida,  $O_2$  y  $CO_2$ . La vitamina K epóxido reductasa (VKOR) cataliza la reducción de la vitamina K a vitamina K epóxido. Ésta es indispensable y es utilizada por la gamma-glutamil carboxilasa (GCCX) durante la  $\gamma$ -glutamil carboxilación. La incorporación de los residuos Gla activa a las denominadas proteínas vitamina K-dependientes (PVDK) o proteínas Gla (Bandyopadhyay PK. 2008; Berkner KL. 2000). Los residuos Gla unen iones metálicos como el  $Ca^{2+}$  que actúan como cofactores (Furie B y cols., 1990). Por ejemplo, la protrombina necesita unirse a  $Ca^{2+}$  para activarse a trombina. Lo mismo ocurre con la osteocalcina y la MGP. El ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico, a diferencia del ácido aspártico o el glutámico, contiene dos grupos  $-COOH$ . Esto le aporta una naturaleza bivalente similar a la de las inmunoglobulinas o el fibrinógeno, lo que permite formar uniones simétricas con dianas moleculares y, por tanto, la formación de redes de calcio/carboxilato que estabilizan los dominios Gla.

El reciclaje hepático de la vitamina K acoplado a la gamma-carboxilación es el mejor caracterizado, si bien esta actividad enzimática se encuentra ampliamente distribuida entre otros en riñón, sistema circulatorio o sistema esquelético (carboxilación periférica). El buen funcionamiento de la gamma-carboxilación vascular es fundamental para la inhibición de la calcificación ectópica y el mantenimiento de la homeostasis vascular (Schurgers LJ. 2013). Agentes terapéuticos como los anticoagulantes orales antivitaminas-K cortocircuitan las actividades enzimáticas implicadas en la gamma-carboxilación dependiente de vitamina K (**Figura 16**)



**Figura 16. Gamma-carboxilación dependiente de la vitamina K y acoplamiento de las actividades enzimáticas de reciclaje de la vitamina K.** La vitamina K (quinona, estado oxidado) es reducida por VKOR a hidroquinona (KH<sub>2</sub>) que finalmente actúa como cofactor de la GCCX. Formas oxigenadas de la KH<sub>2</sub> hidroquinona (base fuerte) extraen el H del C $\gamma$  del Glu, lo que colapsa la vitamina K a vitamina K-2,3-epóxido. El CO<sub>2</sub> es entonces incorporado al C $\gamma$  del Glu. Durante la reacción de gamma-carboxilación, VKOR reduce nuevamente a la vitamina K epóxido. CMLV, célula de músculo liso vascular; Gla, residuo glutámico gamma-carboxilado; Glu, residuo glutámico no  $\gamma$ -carboxilado

## 5.1. PVKDs Y SU RELACIÓN CON LA CALCIFICACIÓN VASCULAR

La familia de las proteínas Gla o dependientes de vitamina K (PDVK) está constituida por unas 12 proteínas que incluyen factores de la coagulación (Factor II, VII, IX y X, así como proteínas C, S y Z), factores de supervivencia (Gas-6), proteínas del metabolismo óseo (MGP, OCN, periostina y “Gla-rich protein” o GRP) y proteínas implicadas en la transducción de señales (proteínas Gla ricas en Pro, PRGPs). Incluso la propia GCCX parece ser una PDVK, sin ninguna homología estructural aparente con las demás proteínas Gla a excepción de una secuencia homóloga a MGP (Berkner K y cols., 1998).

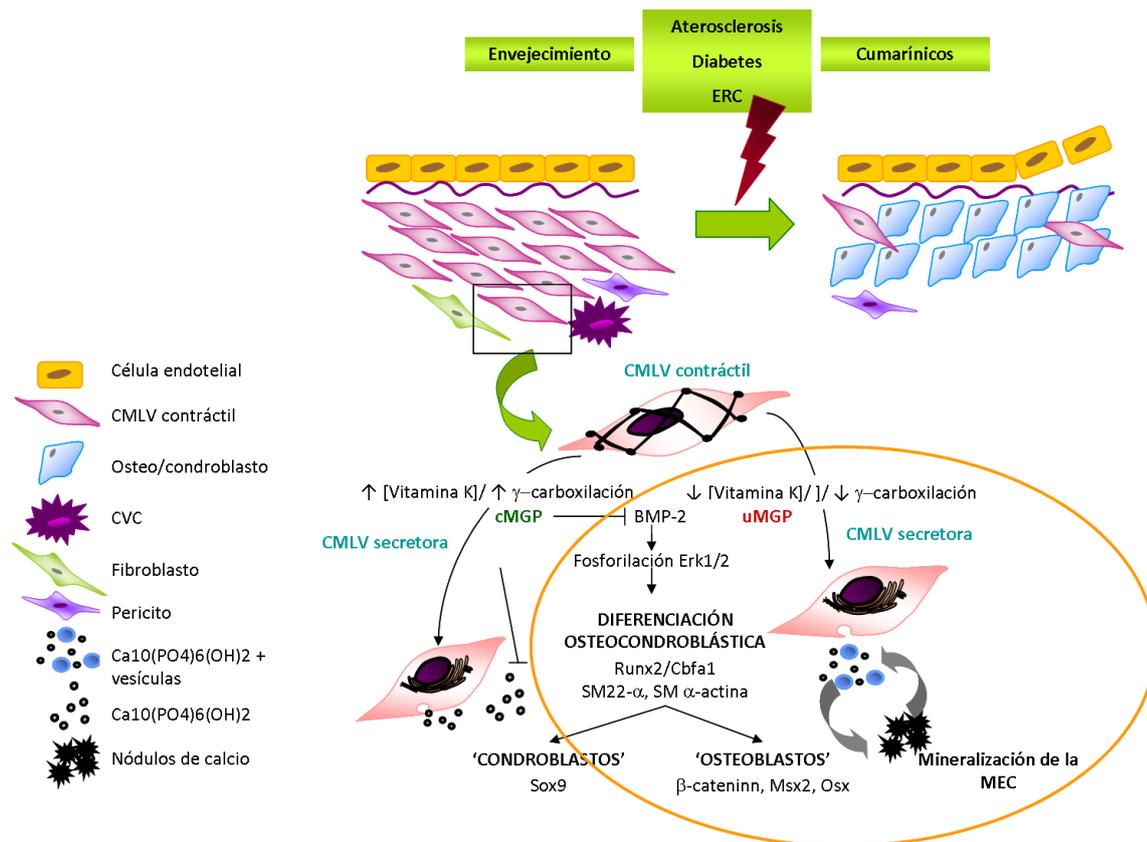
Por lo general, todas las proteínas Gla contienen una secuencia homóloga de unos 18 residuos aminoacídicos, el propéptido, inmediatamente juxtapuesto a uno o varios dominios Gla (Furie B y cols., 1999(II)). Por un lado, los dominios Gla en la PVKD deben participar de algún modo en la carboxilación aunque los datos en la literatura son contradictorios (Berkner KL. 2000). Por otro lado, el propéptido contiene un sitio de reconocimiento para la GCCX, el  $\gamma$ -CRS (“gamma-carboxylation recognition sequence”) (Furie B y cols., 1999; Hubbard BR y cols., 1989). No existe consenso en el  $\gamma$ -CRS, aunque tres residuos (Phe16, Ala10 y Leu6) están particularmente conservados en la secuencia del propéptido y la presencia de mutaciones reduce significativamente (hasta 100 veces) la afinidad de las proteínas Gla por GCCX (Stanley TB y cols., 1999). Además el propéptido funciona como un activador alostérico (Knobloch JE y cols., 1987) y debe inhibir la unión/retención de las PVKD a las membranas del RE a pesar del elevado contenido de Ca<sup>2+</sup>. Finalmente, el propéptido N-terminal es eliminado de los precursores de la PVKD por la acción de una pro-convertasa desconocida en el AG *trans*, por lo que el propéptido está ausente en las formas maduras (Stanton C y cols.,

1991). La MGP es única pues la forma madura conserva el propéptido (Price PA y cols., 1987), todavía con una función desconocida.

A continuación se describen las dos proteínas PVDK mejor caracterizadas y relacionadas en la calcificación vascular: la MGP y la OCN

### 5.1.1. Proteína GLA de la matriz (MGP)

La MGP es un inhibidor natural de la calcificación de unos 14 KDa y sintetizada por diferentes tipos celulares (condrocitos, CMLV, células endoteliales y fibroblastos) (Evrard S y cols., 2015). Se encuentra normalmente expresada en la túnica media de vasos sanos y en los bordes de las áreas calcificadas. Solo la forma carboxilada (cMGP) (Hao H y cols., 1995) es capaz de inhibir localmente la nucleación de los cristales de hidroxiapatita además de la actividad BMP (Shanahan CM y cols., 1999(I); Tyson KL y cols., 2003; Spronk HM y cols., 2001; Luo G y cols., 1997). Un déficit de vitamina K o de actividad GCCX, así como el uso continuado de fármacos anti-vitamina K (derivados cumarínicos) resultan en una depleción de cMGP y desarrollo de calcificación vascular (Essalihi R y cols., 2003; Schori TR y cols., 2004; Luo G y cols., 1997; Munroe PB y cols., 1999). Valores bajos de cMGP o MGP no funcional se relacionan con el desarrollo prematuro de aterosclerosis y calcificación vascular (**Figura 17**). Este fenómeno se describe en síndromes genéticos como el Síndrome de Grönblad-Stranberg (*Pseudoxanthoma elasticum*, PXE) y el síndrome de Keutel entre otros (Boraldi F y cols., 2009; Gheduzzi D y cols., 2007; Hao H y cols., 1995; Meier M y cols., 2001; Evrard S y cols., 2015). La ERC también se asocia con valores reducidos de cMGP y elevados de la forma no carboxilada (ucMGP) (Cranenburg EC y cols., 2009). Igualmente, la ausencia de MGP en ratón se asocia con calcificación arterial fatal y del cartílago (Luo G y cols., 1997). La inhibición de la gamma-carboxilación vitamina K dependiente y, por consiguiente, de la disponibilidad de cMGP e incluso de su síntesis, constituye el fundamento teórico de los modelos animales clásicos y de la utilización de los fármacos anti-vitamina K (derivados cumarínicos) (Price PA y cols., 2006; Lomashvili KA y cols., 2011; Speer MY y cols., 2009; Kapustin A y cols., 2011). Estudios con ratones transgénicos han demostrado que la MGP producida en los vasos y no la sistémica es capaz de inhibir la calcificación vascular (Murshed M y cols., 2004).



**Figura 17. Modelo celular de la calcificación vascular dependiente del déficit de cMGP.** Diferentes factores de riesgo como envejecimiento, aterosclerosis, diabetes mellitus, ERC o el uso de fármacos anti vitamina K desencadenan el cambio fenotípico de la CMLV y la depleción de inhibidores de la calcificación. La ausencia de cMGP (por defectos en la síntesis o modificación post-traducciona l o hipovitaminosis K) debe favorecer favorece la activación de las vías de diferenciación osteo/condroblástica. Adaptación de Schurgers LJ. 2013 y Speer MY y cols., 2009.

Aunque el mecanismo de acción de la MGP no está totalmente esclarecido, cMGP es capaz de inhibir directa e indirectamente la calcificación vascular. Por un lado, es capaz de unir cristales de hidroxiapatita de calcio de microvesículas y cuerpos apoptóticos, evitando la formación de sitios de nucleación y el crecimiento de los cristales (Evrard S y cols., 2015; Roy ME y cols., 2002; Price PA y cols., 2000; Shanahan CM y cols, 1999 (I); Shanahan CM y cols, 1999 (II); Spronk ME y cols., 2001) y preserva el fenotipo de la CMLV, previniendo la diferenciación osteoblástica (Evrard S y cols., 2015). Por otro lado, cMGP es capaz de unirse a BMP-2 e inhibir su actividad pro-calcificante (Yao Y y cols., 2010; Zebboudj AF y cols., 2002; O'Young y cols., 2011; Wallin R y cols., 2000; Böstrom K y cols., 2001 (I); Böstrom K y cols., 2001 (II); Zebboudj AF y cols., 2003). Wajih N et al (Wajih N y cols., 2000)

demonstraron por unión de ligando que existe una interacción entre MGP y BMP2, en concordancia con los resultados de Zebboudj et al (Zebboudj AF y cols., 2002) y la existencia de complejos MGP/BMP2. La forma Gla de la MGP es capaz de unirse a  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que produce un cambio conformacional necesario para la formación del complejo MGP/BMP2 (Wajih N y cols., 2000; Sweat A y cols., 2003). Sin embargo, publicaciones recientes sugieren que éste no es el efecto inhibitorio principal de la MGP (Lomashvili KA y cols., 2011). Adicionalmente, la MGP es especialmente insoluble, al contrario que otras PVKD, y se ha hipotetizado que MGP debe participar en la formación de complejos fetuína-A calciprotéicos (Price PA y cols., 2003) y que el déficit de MGP debe asociarse con la alteración de la MEC (Evrard S y cols., 2015) y la 'exclusión por tamaño' en la inhibición de los sitios de nucleación de la elastina.

#### 5.1.2. Osteocalcina (OCN)

La osteocalcina (OCN) o proteína Gla ósea, es una pequeña proteína secretada por los osteoblastos, por lo que es un buen marcador fenotípico de diferenciación osteoblástica. La forma gamma-carboxilada se une a la matriz mineralizada a través de sus tres residuos Gla favoreciendo la nucleación de los cristales de hidroxiapatita y la maduración de la MEC (Shanahan CM y cols., 2000; Price PA y cols., 1989; Ducy P y cols., 1996), por lo que es un componente no colagénico de la MEC en hueso y tejido vascular calcificado (Shanahan CM y cols., 1999 (I); Proudfoot D y cols., 2002; Tyson KL y cols., 2003). Recientemente, se ha confirmado el papel osteoinductor de la osteocalcina (Idelevich A y cols., 2011), aunque se desconoce el mecanismo de acción.

Por el contrario, Gerard Karsenty demostró en 2007 que la forma no carboxilada de la OCN (ucOCN) es efector circulante del metabolismo energético (Lee NK y cols., 2007; Ferron M y cols., 2010). La actividad hormonal de ucOCN induce la expresión y secreción pancreática (células  $\beta$ -pancreáticas) de insulina y de adiponectina en el tejido adiposo (Kapustin AN y cols., 2011). Además, ucOCN también parece regular los niveles de testosterona circulante (Patti A y cols., 2013).

## 5.2. OTRAS PVKD RELEVANTES DURANTE LA CALCIFICACIÓN ECTÓPICA

### **5.2.1. Factor “growth arrest specific-6” o Gas-6**

El factor Gas-6 presenta una marcada homología con la proteína S (Manfioletti G y cols., 1993; Furie B y cols., 1999) y estructuralmente se caracteriza por la presencia de un dominio Gla y EGF entre otros. La CMLV secreta Gas-6 y ejerce funciones autocrinas de proliferación, supervivencia celular y migración (Ohashi K y cols., 1995; Varnum BC y cols., 1995). Durante la hiperfosfatemia Gas-6 se fosforila reduciéndose se expresión y la de su receptor Axl (Son BK y cols., 2006; Son B y cols., 2007) y esto se ha asociado con la activación de vías apoptóticas dependientes de hiperfosfatemia y el desarrollo de calcificación vascular (Son B y cols., 2007).

### **5.2.2. Periostina**

La periostina ha sido recientemente incorporada al grupo de las PVKD. Estructuralmente se caracteriza por la presencia de repeticiones en tándem de dominios fasciclina y de 4 sitios de reconocimiento para la GGCX entre estos, múltiples residuos glutámicos susceptibles de ser gamma-carboxilados y la presencia de la secuencia CRS (Coutu DL y cols., 2008). Periostina y PLF ‘periostin-like factor’ (‘splicing variant’ del gen que codifica la periostina) se expresan abundantemente en MEC ósea producida por derivados mesenquimales como fibroblastos, osteocitos, condrocitos y adipocitos (Rubinacci A. 2009; Coutu DL y cols., 2008; Rani S y cols., 2009).

Adicionalmente, los dominios fasciclina (“FAS1 domain”) de la periostina deben facilitar la interacción con integrinas de la superficie celular y con proteínas de MEC, por lo que participa en el desarrollo, maduración y reparación tisular en condiciones fisiológicas; así como en procesos angiogénicos, remodelado miocárdico y metástasis tumoral (Coutu DL y cols., 2008).

### **5.2.3. Gla-rich protein (GRP)**

GRP, también UCMA (‘Unique Cartilage Matrix Associated Protein’) es una pequeña proteína Gla (-135 aa) descrita recientemente (2008) por tres grupos independientes (Cancela ML y cols., 2012; Viegas CSB y cols., 2008; Tagariello A y cols., 2008; Surmann-Schmitt C y cols., 2008). Estructuralmente destaca por su denso clúster de residuos Gla, que la hace la PVKD más gamma-carboxilada (Viegas CSB y

cols., 2008). Además, se ha sugerido una relación evolutiva entre la OCN y la MGP con la GRP (Cancela ML y cols., 2012). GRP se expresa específicamente en condrocitos distales (maduros e inmaduros) y es esencial en la condrogénesis y la regulación de la biodisponibilidad de  $Ca^{2+}$  (Booth SL. 2009; Cancela ML et al. 2012; Surmann-Schmitt C y cols., 2011; Eitzinger N y cols., 2011). Se considera principalmente un marcador de diferenciación condroblástica aunque se acumula en zonas de calcificación ectópica en asociación con calcinosis, PXE, ERC y calcificación vascular aterosclerótica (Cancela ML y cols., 2012).

### 5.3. MECANISMO DE ACCIÓN E INTERACCIÓN ENTRE LA PROTEÍNA GLA Y LA GCCX

La gamma-carboxilación *in vivo* requiere, entre otros (Tabla 4), del reciclaje continuo de la vitamina K éxido a  $KH_2$  hidroquinona. La subunidad 1 de la enzima VKOR, VKORC1, cataliza la reacción redox. VKOR forma un complejo multimérico con la GCCX (Cain D y cols., 1997) y esta última utiliza la  $KH_2$  hidroquinona como cofactor para incorporar los residuos Gla (Suttie JW y cols., 1985; Berkner KL. 2005). El complejo enzimático constituido por la VKOR y la GCCX se localiza en el RE.

Tabla 4. Requisitos para la gamma-carboxilación de residuos Glu en PVDK

Requisitos de la gamma-carboxilación
Ciclo de la vitamina K activo-vitamina K intracelular
Presencia de sitio $\gamma$ -CRS
Tráfico de la proteína a través del RER
Presencia celular de la GCCX acoplada al RER
Presencia de residuos Glu

La GCCX es una glicoproteína integral de membrana, de unos 758 aminoácidos y unos 94 KDa, con el extremo C-terminal probablemente dirigido hacia el lumen del RE. Además, en la GCCX se distinguen diferentes sitios de elevada y baja afinidad para la unión y reconocimiento de dominios no  $\gamma$ -glutamil-carboxilados (Glu) y  $\gamma$ -glutamil-carboxilados (Gla) (Berkner KL. 2000). Un sitio  $\gamma$ -CRS (“gama-carboxylation

recognition sequence”) une las PVKD por los residuos Gla (Benton ME y cols., 1995; Stanley TB y cols., 1998). La unión a la GCCX se realiza, normalmente, a través del pro-péptido y del dominio Gla. El propéptido se une covalentemente a la GCCX, quedando fijo, e incrementa, por lo general, la afinidad del sustrato Glu a través del dominio Gla. Mientras, el dominio Gla realiza movimientos intramoleculares de reposición de los residuos Gla por los Glu pendientes de modificación, como si fuera una cremallera (Berkner KL. 2000). Además, la unión coordinada del propéptido y el dominio Gla genera un segundo evento alostérico por el que se incrementa la afinidad de la GCCX por la vitamina  $KH_2$  hidroquinona y la actividad enzimática (Knobloch JE y cols., 1987; Soute BAM y cols., 1992; Houben RJTJ y cols., 1999). Este mecanismo de asistencia catalítica de sustrato (“substrate-assisted catalysis”, SAC) asegura la completa gamma-carboxilación de las proteínas Gla y el incremento drástico de la especificidad de la reacción (actividad procesiva), por el que cada gamma-carboxilación se gestiona independientemente (Dall’Acqua y cols., 2000). Por otro lado, un elevado control de calidad del proceso contribuye a asegurar la completa gamma-carboxilación de la PVKD, como demuestra la inmediata degradación de las formas parcialmente carboxiladas (Tokunaga F y cols., 1995; Wu W y cols., 1996). Otros cofactores ( $KH_2$ ,  $O_2$ ,  $CO_2$ ) no incrementan su afinidad por el efecto alostérico del propéptido.

#### **5.4. REGULACIÓN DE LA GAMMA-CARBOXILACIÓN DEPENDIENTE DE VITAMINA K**

La regulación endógena o exógena de cualquiera de las actividades enzimáticas acopladas en el sistema de gamma-carboxilación vitamina K dependiente puede comprometer el normal funcionamiento del sistema de la coagulación (ej., discrasias hematológicas como deficiencias familiares de los factores de coagulación, estado anticoagulado por tratamiento farmacológico, etc.) o del sistema esquelético (ej., osteogénesis imperfecta), así como asociarse con la severidad de síndromes genéticos como el PXE entre otros (Zhang B y cols., 2004).

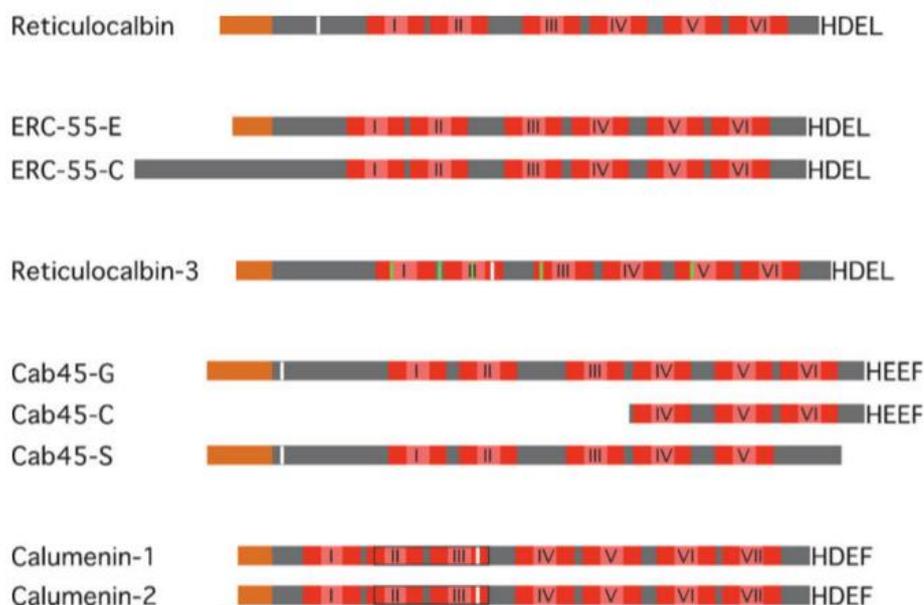
##### **5.4.1. Regulación exógena: papel de los fármacos anti-vitamina k**

Desde el descubrimiento de la vitamina K en 1935 hasta la actualidad se han realizado importantes avances, incluyendo el descubrimiento de los antagonistas de la

vitamina K y su introducción como agentes farmacológicos como terapia anticoagulante oral (Furie B y cols., 1999). Los fármacos anti-vitamina K, derivados de análogos cumarínicos, actúan como inhibidores exógenos de la gamma-carboxilación dependiente de la vitamina K. El mecanismo de acción mejor descrito es el de la warfarina e implica la inhibición de la VKORC1. La inhibición de VKORC1 interfiere tanto en el ciclo de la vitamina K como en las reacciones acopladas de gamma-carboxilación (Whitlon DS y cols., 1978). Los derivados cumarínicos se usan en la terapia anticoagulante oral para inhibir la activación de los factores de la coagulación miembros de las PVKD (Suttie JW y cols., 1985; Berkner KL. 2005). Sin embargo, el efecto de la warfarina es sistémico e inhibe la activación de las PVDK en otros territorios como el vascular y el esquelético. Por lo que la utilización de fármacos anti-vitamina K podría tener el mismo efecto que el déficit de vitamina K y la magnificación de la calcificación vascular por depleción de cMGP (Evrard S y cols., 2015). Esto explica la asociación entre el uso de warfarina y el desarrollo de calcificación vascular observado en estudios con animales y en el hombre (Tantisattamo y cols. 2015; Evrard S y cols., 2015). Además, este fenómeno constituye el fundamento teórico para el desarrollo de modelos animales y celulares de calcificación vascular a base de warfarina (Demer LL y cols., 2008).

#### 5.4.2. Regulación endógena: papel de la calumenina

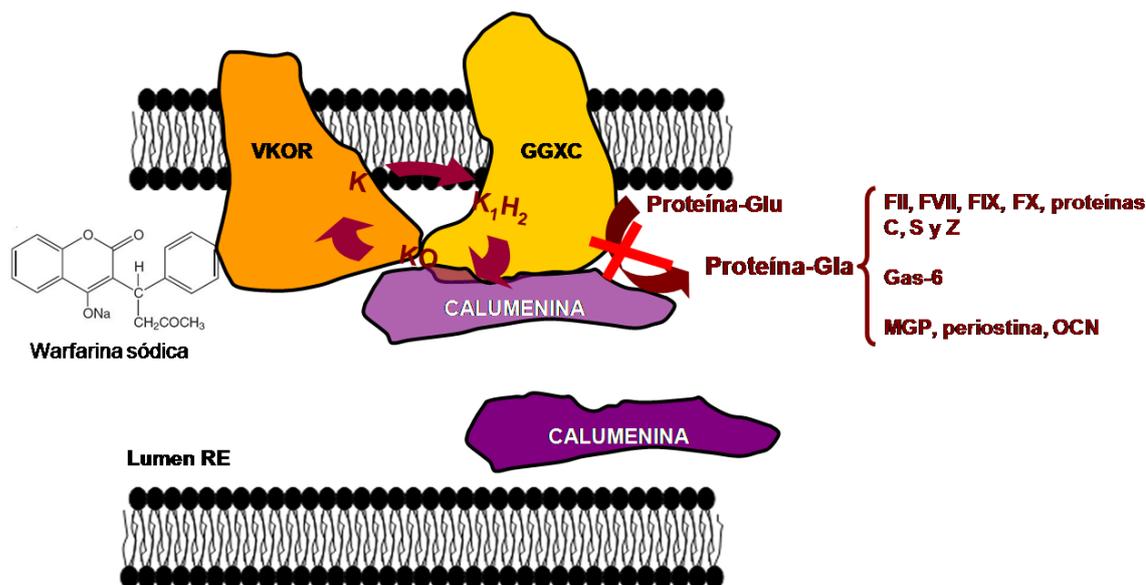
La proteína Calumenina, crocalbina o CBP50 (-315 aminoácidos, 37 KDa, gen CALU chr.: 7q32) (Yabe D y cols., 1998; Yabe D y cols., 1997) es un miembro de las proteínas CREC (acrónimo de Cab45, Reticulocalbina, ERC-55 y Calumenina). Las proteínas CREC se caracterizan por la presencia de dominios “EF-hand” de unión a  $Ca^{2+}$  y señales de retención al retículo endoplasmático (RE) y aparato de Golgi (AG) en el extremo C-terminal (HDEL, HDEF y HEEF) (Honoré B y cols., 2000). La mayoría de proteínas CREC, incluidas reticulocalbinas, Erc-55, Cab-45, son chaperonas que participan en vías secretoras, si bien nuevos miembros incorporados en los últimos años también se localizan en el compartimento citosólico y en la superficie celular (Yabe D y cols., 1998; Honoré B. 2009) (**Figura 18**).



**Figura 18. Estructura de las proteínas CREC.** Adaptado de Honoré y colaboradores (Honoré B. 2009).

A excepción de calmodulina y parvalbumina, las proteínas CREC unen  $\text{Ca}^{2+}$  débilmente (mM) (Vorum H y cols., 1998). Se desconoce la función del  $\text{Ca}^{2+}$  en las interacciones calumenina/GCCX/VKOR, si bien la adición de EDTA parece estimular la actividad VKOR (Wajih N y cols., 2004).

A pesar de que la calumenina es una proteína hidrofílica ácida, ésta se asocia a micelas lipídicas derivadas del RE (Wallin R y cols., 2001; Honoré B y cols., 2000). Así, calumenina es una chaperona molecular, con un motivo HDEF y localizada en el RE y AG (Vorum H y cols., 1999), que por sus características estructurales debe orientarse hacia el lumen del RE (Wallin R y cols., 2001). Sin embargo, su dominio de unión a membrana, a diferencia del resto de miembros de la familia CREC, es más débil por lo que, además debe de participar en vías secretoras (Yabe D y cols., 1997; Vorum H y cols., 1999; Coppinger JA y cols., 2004). De forma interesante, calumenina se asocia a la GCCX y capaz de regular fisiológicamente la gamma-carboxilación dependiente de vitamina K (Wajih N y cols., 2004) mediante la inhibición de la GCCX (Wajih N y cols., 2006) (**Figura 19**).



**Figura 19. Regulación endógena y exógena de la gamma-carboxilación vitamina K dependiente.** Calumenina se une a GGXC e inhibe el sistema de gamma-carboxilación dependiente de vitamina K. Los derivados cumarínicos, como la warfarina, inhiben este complejo enzimático mediante la inhibición directa de la VKOR. El resultado de la regulación endógena o exógena del sistema de gamma-carboxilación vitamina K dependiente repercute en la funcionalidad de las PVKD. Adaptación de Wajih N y cols., y Wallin y cols. (Wajih N y cols., 2004; Wallin R y cols., 2001; Wajih N y cols., 2006).

Estudios proteómicos en células óseas han demostrado una expresión temporal de calumenina dependiente de procesos de maduración (Wilson R y cols., 2012; Rasaputra KS y cols., 2010). Además, el estudio anatomopatológico de lesiones ateroscleróticas muestra inequívocamente la presencia de calumenina, cuya secreción en estas áreas lesionadas todavía no se ha caracterizado funcionalmente (Coppinger JA y cols., 2004; Vorum H y cols., 1999). Calumenina está sobre-expresada en el hígado de ratas genéticamente resistentes a warfarina y su utilización exógena es capaz de inducir resistencia a warfarina en VKOR (Wallin R y cols., 2001; Wajih N y cols., 2004). Esto explicaría, en parte, el fallo terapéutico de los anti-vitamina K en humanos o la asociación con las dosis requeridas de anti-vitaminas K y polimorfismos afectando tanto a VKORC1 como a la GCCX (King CR y cols., 2010; Vecsler M y cols., 2006; González-Conejero R y cols., 2007; Cadamuro J y cols., 2010; Burmester JK y cols., 2011; Wadelius M y cols., 2007; Kariminejad A y cols., 2014; Songpatanaslip T y cols., 2011). Por tanto, calumenina debe jugar un papel fundamental en la regulación de la gamma-carboxilación dependiente de vitamina K y, por tanto, de la biodisponibilidad de PVKD funcionales, con posibles e importantes implicaciones fisiológicas y patológicas.

## 6. REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR

La calcificación vascular es un proceso multifactorial y complejo en el que interaccionan la diferenciación de la CMLV, factores moleculares y genéticos. Desde que Conrad Waddington acuñase por primera vez el término ‘epigenética’ en 1942 (Waddington CH. 1942) hasta la actualidad, la epigenética emerge como uno de los más importantes mecanismos dinámicos de regulación génica.

La epigenética estudia las alteraciones heredables en la expresión génica que no afectan al código genético *per se* pero permiten ‘encender’ o ‘apagar’ los genes (Wu SS y cols., 2015) y es fundamental durante el desarrollo embrionario, la impronta genética (“imprinting”) y la diferenciación (Esteller M. 2008) Además, las modificaciones epigenéticas regulan la fisiopatología de multitud de enfermedades incluyendo cáncer, enfermedades neurológicas, enfermedades autoinmunes, diabetes y enfermedad cardiovascular (Wu SS y cols., 2015).

La metilación del DNA, la modificación de histonas y cromatina y los miRNA, son los principales mecanismos de regulación epigenética (Esteller M. 2011). La metilación del DNA en las islas CpG de los promotores representa el método de silenciamiento génico mejor caracterizado. La hiperfosfatemia se ha asociado con la activación de DNMT (DNA metiltransferasas) y la metilación del promotor del gen *TAGLN* y un incremento de actividad transcripcional dependiente de Runx2/Cbfa1, ALP y mineralización. Por otro lado, las modificaciones de los extremos N-terminales de las histonas (acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinización, SUMOilación, ADPribosilación, deiminación o isomerización) también son fundamentales en la regulación transcripcional (condensación cromosómica, replicación del DNA, *splicing* alternativo y reparación del DNA). Este mecanismo es mucho más dinámico que la metilación del DNA y se correlaciona indirectamente con la activación o represión génica. Datos recientes sugieren que la unión del SRF (factor de respuesta sérica) a los genes CMLV-específicos está modulada por la estructura de la cromatina (Wu SS y cols., 2015). Finalmente, el microRNA (miRNA) surge como un nuevo factor de regulación epigenética. Su regulación en procesos de diferenciación de células MSC sugiere su regulación en procesos de diferenciación patológica de la CMLV durante la calcificación vascular (Martin EC y cols., 2015).

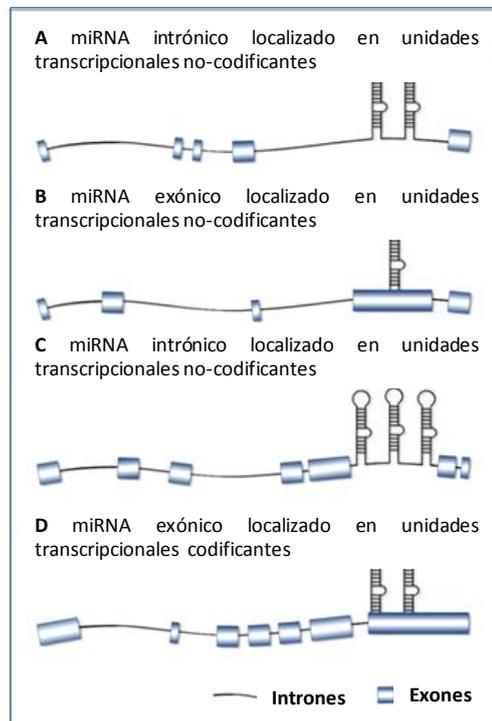
## 6.1. ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y BIOSÍNTESIS DE LOS miRNA

Tras el descubrimiento de los miRNA en 1993 (Lee RC y cols., 1993), los miRNA surgen como potenciales reguladores epigenéticos de diversas condiciones patológicas incluidas las enfermedades cardiovasculares. Además, la expresión de los miRNA es estable y son potenciales y atractivos biomarcadores circulantes dada su estabilidad en el suero, su resistencia a las nucleasas y su expresión consistente entre sujetos (Chen X y cols., 2008(II)).

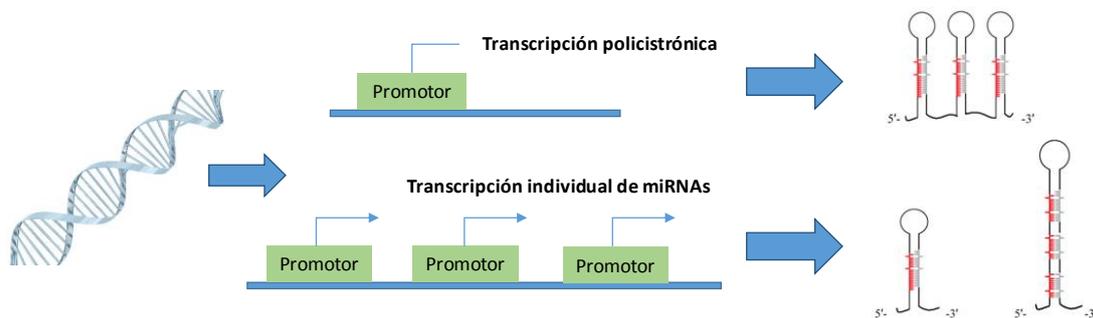
Los miRNA son pequeños RNA (15-25 nucleótidos), de cadena simple, no codificantes y capaces de regular la expresión génica post-transcripcional (Ambros V. 2004; Fabbri M. 2014). Multitud de procesos biológicos como la proliferación celular, metástasis, diferenciación y apoptosis son regulados por miRNAs (He L y cols., 2004; Bushati N y cols., 2007; Martin EC y cols., 2015; Fabbri M. 2014). Así, alrededor de un 60% de los genes codificantes de mamíferos están regulados por miRNAs (Fabbri M. 2014).

La organización de los genes que codifican miRNAs es muy variable y pueden tener localizaciones muy diversas: regiones intergénicas fuera de las unidades transcripcionales, regiones intragénicas en exones, intrones o entre ambos tanto en genes codificantes como no codificantes (**Figura 20 A**) (Wanet A y cols., 2012; Winter J y cols., 2009). La distribución genómica de estos genes se caracteriza por la presencia de familias de miRNA cuya estructura madura es muy semejante y se encuentran codificados en los mismos clústeres (Fabbri M. 2014). En los humanos, aproximadamente el 50% de los genes de miRNA se organizan en clústeres y se transcriben como transcritos policistrónicos primarios (Lagos-Quintana M y cols., 2001; Lau NC y cols., 2001). Por ello es esperable cierta redundancia o sinergia entre los miembros del mismo clúster, aunque cada miRNA localizado en un mismo cluster puede ser transcrito independientemente a los demás miembros del clúster (Fabbri M. 2014) (**Figura 20 B**).

A



B



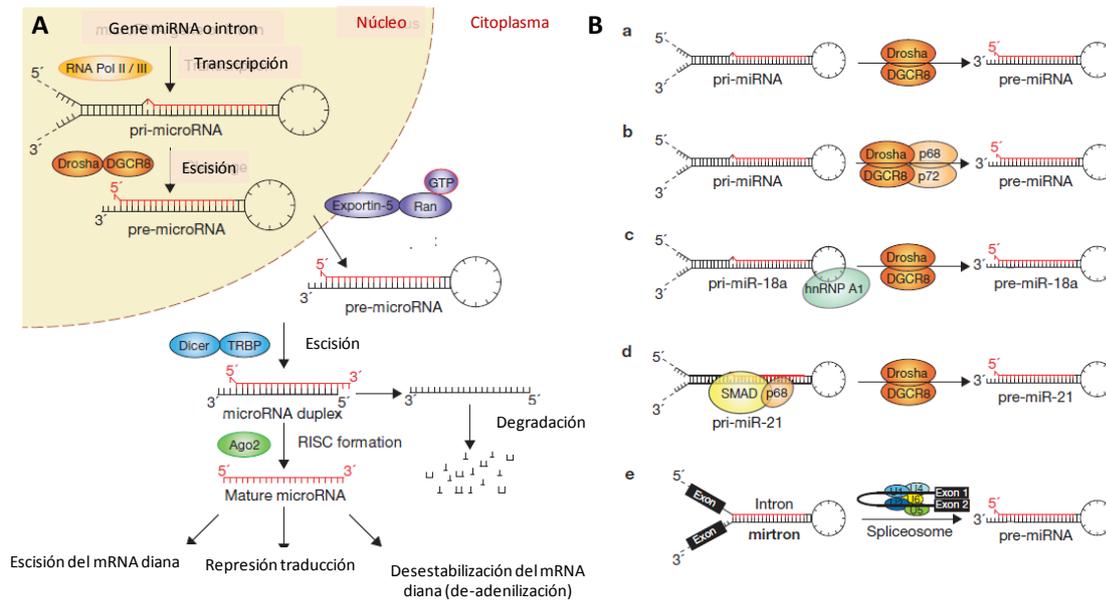
**Figura 20. Organización de genes codificantes de miRNA y regulación de su expresión.** La localización de los genes que codifican miRNAs es muy variada y pueden encontrarse en regiones intrónicas o exónicas codificantes o no codificantes, adaptado de (Martin EC y cols., 2015). La transcripción de los mismos puede ser incluso individual en los miRNA que forman clústeres, por lo que los perfiles de expresión pueden ser muy variados, B.

La biosíntesis de los miRNA es un proceso muy regulado. Las RNA polimerasa II (generalmente) o III (repeticiones Alu) regulan la transcripción nuclear de los miRNA y la formación de los largos transcritos de doble cadena (conteniendo uno o más miRNAs funcionales) (Pri-miRNA) (Faller M y cols., 2008). La estructura general de

un pri-miRNA en humanos consta de una estructura en horquilla o *hairpin* de unos 33 nucleótidos, un *loop* terminal y dos extremos flanqueantes de cadena simple en la base del *stem loop* (5'-cap y 3'-poli A). Los precursores (pre-miRNA) resultan de la escisión de los extremos 5'-cap y 3'-poliA llevada a cabo en el complejo multiproteico denominado microprocesador. El microprocesador está constituido, al menos, por 2 Droscha (RNA endonucleasa III, ribonucleasa de RNAs de doble cadena o dsRNA) y 2 moléculas de DGCR8/Pasha (*DiGeorge síndrome critical region gene 8*). DGCR 8 es capaz de reconocer el tallo y las cadenas simples de RNA de los extremos del pri-miRNA, actuando como una regla para que Droscha pueda cortar las regiones flanqueantes 5'-cap y 3'-poli A. El resultado es un precursor o pre-miRNA de unos 60-70 nucleótidos, también en forma de horquilla y con un fosfato 5' y 2 nucleótidos 3' excedentes. Exportina-5 o XPO5 (miembro de la familia de factores transportadores nucleocitoplasmáticos karioferinas) es capaz de unir el pre-miRNA por los nucleótidos 3' excedentes y transportar el pre-miRNA hacia el citoplasma a través de su cofactor Ran (guanosín trifosfatasa o GTPasa) y un gradiente de GTP/GDP. Para ello, Ran-GTP forma un heterotrímero con XPO5 y el pre-miRNA e hidroliza el GTP a GDP hacia el citoplasma.

En el citoplasma, continúa el procesamiento del pre-miRNA hacia dúplex maduros de unos 22 nucleótidos. Para ello, el pre-miRNA es nuevamente cortado por la RNAsa III Dicer1 y su compañero catalítico TRBP (*Trans activator RNA (TAR)-binding protein*), dando lugar a un duplex maduro de miRNA constituido por las cadenas guía y '*star*', también miR/miR\*. El dúplex miR/miR\* es conducido hacia en el complejo heteromérico RISC (*miRNA-induced silencing complex*), constituido, al menos, por Dicer1, TRBP y una proteína Argonauta (Ago1-4). El ensamblaje del complejo RISC y la del miRNA da lugar al complejo multiproteico RLC (*RISC Loading Complex*). La cadena miR\* es más estable termodinámicamente y escindida por Ago2 para ser finalmente degradada. Solo la molécula guía o miR es funcional y capaz regular la expresión de sus mRNA diana por complementariedad de bases (Martin EC y cols., 2015; Fabbri M. 2014; Winter J y cols., 2009) (**Figura 21**). La regulación de los factores implicados en la biosíntesis de los miRNA depende de la condición fisiológica/patológica y de la línea celular, y resulta en un amplio espectro fenotípico (Lenkala D y cols., 2015; Winter J y cols., 2009). Argonauta ejerce múltiples funciones durante la biosíntesis de los miRNA: 1) participa en el procesamiento del pre-miRNA;

2) es el efector del complejo RISC degradando, desestabilizando o inhibiendo la traducción de los mRNA diana; y 3) media la estabilidad del miRNA regulando la expresión post-transcripcional y la actividad de los miRNA, independientemente de su función endonucleasa (Winter J y cols., 2009).



**Figura 21. Biosíntesis general del miRNA.** La biosíntesis de los miRNA es compleja y muy regulada tanto a nivel nuclear como citoplásmico, A; la formación de los precursores puede ocurrir mediante diferentes vías de procesamiento del pri-miRNA que incluyen la participación de diferentes factores como el microprocesador Drosha-DGCR8/Pasha (B-a), factores específicos como p68 y p72 (B-b), participación de hnRNP A1 (B-c), señalización dependiente de TGF- $\beta$ /Smad (B-d) o *splicing* by-paseando la actividad de Drosha en el caso de los miRtrones (B-e). Adaptado de (Martin EC y cols., 2015).

## 6.2. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS MIRNA

El mecanismo de acción putativo de los miRNA implica el reconocimiento y complementariedad de bases entre el miRNA y las regiones 3'UTR de los mRNA. Para ello el miRNA generalmente interactúa con su mRNA diana a través de los nucleótidos 2 y 8 del extremo 5' (región *seed*), si bien otras regiones del miRNA pudieran participar alternativamente (Breving K y cols., 2009). La complementariedad de bases entre el miRNA y su diana puede ser total (habitualmente en plantas) o parcial (generalmente en animales). Dada la existencia de salientes y de discrepancias o “mismatches”, el grado de complementariedad entre el miRNA y su diana es el factor determinante de los dos mecanismos principales de silenciamiento génico post-transcripcional: inhibición

traslacional o degradación del mRNA (Fabbri M. 2014; Bushati N y cols., 2007). Si la complementariedad es perfecta RISC corta el mRNA diana (interferencia clásica generalmente restringida a plantas); si la complementariedad es imperfecta, RISC induce la represión traduccional del mRNA a través de la región 3'-UTR.

Adicionalmente, los miRNA son capaces de regular la expresión génica mediante la unión a las regiones no traducionales 5'-UTR (Untranslated region) y regiones codificantes (CDS) e incluso a promotores del DNA genómico (Place RF y cols., 2008; Bushati N y cols., 2007; Vasudevan S y cols., 2007; Fabbri M. 2014; Kim DH y cols., 2008; Dweep H y cols., 2013; Hausser J y cols., 2013; Winter J y cols., 2009; Li L y cols., 2006).

Un único miRNA es capaz de regular múltiples mRNA diana (Breving K y cols., 2009; Ding XC y cols., 2009) y un único mRNA puede ser diana para multitud de miRNAs (Krol J y cols., 2010).

#### **6.3. PREDICCIÓN DE DIANAS DE MIRNA: ESTUDIOS *IN SILICO***

Hasta el momento se han descrito 1881 miRNA en humanos y el número de nuevos miRNA identificados va en aumento ([www.mirbase.org/cgi-bin/mirna\\_summanry.pl?org=hsa](http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summanry.pl?org=hsa)). Numerosos miRNA han sido identificados como reguladores críticos en la patología vascular incluyendo la aterosclerosis, remodelado vascular, angiogénesis y apoptosis (Jamaluddin MS y cols., 2011). Es por ello, que las predicciones bioinformáticas o computacionales constituyen una herramienta muy útil a la hora de explicar y entender la regulación epigenética dependiente de miRNAs y su asociación con una patología concreta. Actualmente existen disponibles múltiples versiones gratuitas, cuyos modelos de predicción y análisis están basados en diferentes algoritmos que integran diferentes criterios como la complementariedad de los miRNAs, la energía de la unión y la estabilidad termodinámica del dúplex miRNA-mRNA (**Anexo I**). Estos algoritmos son capaces tanto de predecir múltiples mRNA diana para un único miRNA como múltiples miRNA para un único mRNA. En algunos casos, dichos modelos combinan los resultados de la predicción con información validada disponible en bases de datos internacionales y publicaciones previas, así como una asociación funcional (Dweep H y cols., 2013). El consenso actual de la comunidad científica acepta que se usen entre 2-5 parámetros de predicción para validar una diana.

## 6.4. PARTICIPACIÓN DE MIRNAS EN LA CALCIFICACIÓN VASCULAR

Los miRNA participan en procesos de diferenciación celular. Son numerosos los estudios que demuestran diferentes patrones de expresión de miRNA durante la diferenciación de las células MSC. Como resultado se han elaborado listas de miRNAs regulados durante adipogénesis, osteogénesis y miogénesis (Martin EC y cols., 2015). La contribución de los miRNAs sugiere un papel fundamental en todos los aspectos biológicos de la formación de hueso incluyendo la osificación, reabsorción y remodelado, y es especialmente importante la regulación de la cascada de señalización dependiente de BMP (Martin EC y cols., 2015). Por tanto, los miRNA deben actuar como reguladores endógenos de la diferenciación osteoblástica de la CMLV. Son numerosos los trabajos que demuestran que la calcificación vascular está regulada por miRNAs. Un estudio reciente demostró que la expresión de miR-125b está disminuida durante la formación de la placa de ateroma y la calcificación vascular, y que su diana es SP7/Osterix (Goettsch C y cols., 2011). También la expresión de los miRNA-30b y -30c se ve reprimida durante la inducción de calcificación de la CMLV en asociación con una expresión aumentada de BMP2 y Runx2/Cbfa1 (Balderman JAF y cols., 2012). Igualmente, ensayos *knocking-down* y de sobreexpresión demuestran que los miRNA-133a y -204 tienen a *RUNX2* como diana por lo que modulan la desdiferenciación de la CMLV dependiente de hiperfosfatemia (Liao XB y cols., 2013; Cui RR y cols., 2012). Otros miRNA recientemente identificados en asociación con la calcificación de la CMLV dependiente de hiperfosfatemia son miR-29b, miR-125, miR-133b, miR-135, miR-141, miR-200a, miR-204 y miR-211 (Panizo S y cols., 2015), miR-205 (Qiao W y cols., 2014) y miR-135a en asociación con la calcificación de CMLV dependiente de senescencia mediante la inhibición de KLF4/STAT3 (Lin L y cols., 2015). Aunque más escaso, también se han descrito miRNAs cuya sobreexpresión induce la calcificación vascular. Este es el caso de los miRNA -135a\*, -762, -714, -712\* (Gui T y cols., 2012). Mackenzie y colaboradores (Mackenzie NCW y cols., 2014), demostraron la sinergia entre los miR-221 y -222 para inducir la diferenciación osteoblástica de CMLV de ratón mediante la regulación de *Enpp1* y PiT-1.

---

## 7. PAPEL DE LA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC) EN LA CALCIFICACIÓN VASCULAR

La MEC proporciona soporte mecánico y bioquímico a las células y tejidos, y participa en los procesos de comunicación celular y diferenciación. Por tanto, la MEC no es un simple elemento pasivo y se calcula que la MEC tiene una contribución relativa del 30% en el proceso formación de hueso (Burdan F y cols., 2009). Durante la maduración fisiológica de los osteoblastos y condroblastos se produce una síntesis activa de MEC estricta y temporalmente regulada (Hong HH y cols., 2004). La síntesis temprana de MEC rica en colágeno tipo I es un requisito para la diferenciación osteoblástica, induce la expresión de OCN, BSP, ALP y la mineralización, probablemente a través de la unión a integrinas conteniendo la subunidad  $\beta 1$  (Franceschi RT. 1999). Así, alteraciones en la expresión de proteínas reguladoras del ensamblaje, entrecruzamiento (“cross-linking”) y estabilización del colágeno se han asociado con una disminución de la mineralización (Risteli, M. 2008). Además, los proteoglicanos (10-20% del contenido proteico no colágeno de la MEC ósea) son relevantes en la estabilización de la matriz y en el proceso de mineralización. Por tanto, la integridad de la MEC es fundamental durante la mineralización fisiológica (Behonick DJ y cols., 2003) o patológica (Johnson RC y cols., 2006).

El estudio de la calcificación vascular también evidencia una expresión temporal-dependiente de diferentes marcadores osteoblásticos y condroblásticos, incluidos componentes de la MEC (De la Fuente A y cols., 2012; Wilson Ry cols., 2012; Nakazawa T y cols., 2004; Alford AI y cols., 2010).

El desequilibrio de los componentes de la MEC y el remodelado vascular son característicos en la fisiopatología aterosclerótica y en la calcificación vascular (Fuster JJ y cols., 2010; Bailey M y cols., 2004; Bonucci E. 2006 (capítulos 4, 5, 6 y 14; Eisenstein R y cols., 1964). Estos procesos de remodelado de la MEC resultan en anomalías mecánicas y bioquímicas capaces de influir el fenotipo de la CMLV que adquiere un fenotipo sintético, proliferativo y migratorio (Fuster JJ y cols., 2010; Dzau VJ y cols., 2002; Kim SH y cols., 2011). Al igual que el osteo/condroblasto, la CMLV residente en la lesión aterosclerótica y fenotípicamente sintética es capaz de producir y modificar la MEC simultáneamente con el inicio de la expresión de genes de diferenciación osteoblástica/condroblástica (FEO) (Bonucci E. 2006 (Capítulos 4, 5, 6 y

14); Villa-Bellosta R y cols., 2011 (II); Tintut Y y cols., 2003; Tyson KL y cols., 2003; Davies JD y cols., 2005; Shanahan CM y cols., 1999 (I)).

## 7. 1. EL COLÁGENO: COMPONENTE PRINCIPAL DE LA MEC

El colágeno representa alrededor de un 25% de la proteína total en mamíferos. Es una glicoproteína extracelular y el principal constituyente de la MEC ósea (alrededor del 90%). Además de las funciones mecánicas y estructurales del colágeno, éste participa y regula una amplia variedad de funciones biológicas como la adhesión celular, la proliferación, la comunicación y tráfico celular, la migración, la supervivencia celular y la diferenciación. La identificación de colágenos transmembrana en la superficie celular y su capacidad de ejercer funciones paracrina incrementa notablemente la complejidad funcional de esta familia de proteínas y ha suscitado un interés creciente en los últimos años (Gelse K y cols., 2008; Kadler y cols., 2007; Myllyharju J y cols., 2001; Myllyharju J y cols., 2004).

Todos los tipos de colágeno comparten similitudes estructurales, pero las funciones y los contextos biológicos en los que se expresan son diferentes. Así, el colágeno tipo I es el más relevante en tendones, ligamentos y hueso, siendo el tipo II el mayoritario en cartílago y el III en tejido vascular arterial.

La adecuada conformación (Prockop DJ. 1990) y empaquetamiento molecular (Landis WJ. 1995) y el entrecruzamiento o 'cross-linking' (Yamauchi M y cols., 1993; Prockop DJ. 1990; Landis WJ. 1995) son fundamentales para la subsiguiente mineralización ósea (Yamauchi M y cols., 1993; Prockop DJ. 1990; Landis WJ. 1995). En la formación del hueso la presencia del osteoblasto es necesaria pero no exclusiva y requiere de un substrato de mineralización, la MEC.

## 7.2. BIOSÍNTESIS Y ESTRUCTURA DEL COLÁGENO

La biosíntesis del colágeno es un proceso complejo y con múltiples etapas que tiene lugar tanto en el compartimento intracelular como extracelular (**Figura 22**). El colágeno está característicamente constituido por tres cadenas alfa o pro- $\alpha$  que forman una triple hélice (pro-colágeno). Dependiendo del tipo de colágeno, la composición en cadenas pro- $\alpha$  varía (De Paepe A. 1998; Eberhard P. 2009). Fibroblastos, osteoblastos y

condroblastos sintetizan principalmente colágeno tipo I cuyos subunidades funcionales (pro-colágenos) están constituidos por dos cadenas  $\alpha 1$  y una cadena  $\alpha 2$  (De Paepe A. 1998). Es por ello, que este trabajo se centrará en el colágeno tipo I.

Las cadenas  $\alpha 1$  y una  $\alpha 2$  son codificadas por los genes *COL1A1* y *COL1A2*, respectivamente (De Paepe A. 1998). En condiciones normales, ambas cadenas se producen en cantidades iguales. Sin embargo, un desequilibrio resultante de mutaciones afectando la síntesis de pro- $\alpha 1$  induce la degradación de moléculas  $\alpha 2$ . El resultado es una síntesis reducida de procolágeno tipo I. Deleciones en *COL1A1*, *splicing* alternativo y otras alteraciones génicas, resultan en la síntesis defectuosa de las moléculas de procolágeno. Debido a la contribución de las cadenas pro- $\alpha 1$  en el pro-colágeno, los desequilibrios en la expresión de *COL1A1* son más graves que los del *COL1A2* (Wenstrup J y cols., 1990).

Diferentes enzimas hidroxilasas contribuyen al ensamblaje y entrecruzamiento de las subunidades de pro-colágeno y tropocolágeno y, por tanto, a la formación de una MEC biológicamente funcional, como se detalla a continuación.

#### 7.2.1. Etapas intracelulares

En los ribosomas del RER, series simples y periódicas de tres aminoácidos se ensamblan en tándem. El resultado es la formación de los polipéptidos o cadenas prepro- $\alpha$ , de conformación helicoidal levógira y unos 18 aminoácidos por cada giro. Estas cadenas prepro- $\alpha$  contienen extensiones N y C-terminales, y un péptido señal. Tras la traslocación luminal, el péptido señal de las cadenas alfa es escindido para formar las cadenas pro- $\alpha$ . Estas cadenas pro- $\alpha$  sufren una serie de modificaciones post-traduccionales incluidas hidroxilaciones enzimáticas, glicosilaciones en el AG y, finalmente, el ensamblaje de las cadenas de pro-colágeno y la formación de puentes S-S (Gelse K y cols., 2003; Myllyharju J y cols., 2003). Así en las cadenas pro- $\alpha$ , cada tres aminoácidos se alterna una Gly, siendo el motivo estructural general (Gly-X-Y)<sub>n</sub>, donde X es generalmente una Prolina (Pro) o hidroxiprolina (H-Pro); y la Y es una Lisina (Lys) o hidroxilisina (Hyl). La glicina (Gly) es necesaria para el plegamiento de la triple hélice dextrógira de cadenas pro- $\alpha$  que da lugar a la molécula de pro-colágeno. Todas estas modificaciones permiten la formación de puentes de hidrógeno intercatenarios

estabilizadores que aportan rigidez conformacional para limitar la rotación del polipéptido y estabilizar la triple hélice o pro-colágeno (Eberhard P. 2009; Myllyharju J y cols., 2004). El ensamblaje de la molécula de procolágeno ocurre en el lumen de RE mediante la interacción y asociación de los extremos C-terminales de las tres cadenas pro- $\alpha$ . El resultado es una triple hélice que se propaga en sentido C-terminal a N-terminal como una cremallera (Gelse K y cols., 2003; Myllyharju J y cols., 2001). Para ello, se requiere la presencia de multitud de enzimas residentes en el lumen del RE (Nagata K. 2003), incluyendo las chaperonas que evitan la agregación de las cadenas formadas de novo (Myllyharju J y cols., 2004). El pro-colágeno es entonces empaquetado en vesículas del AG para ser secretado hacia el espacio extracelular.

### 7.2.2. Etapas extracelulares

A nivel extracelular, las procolágeno peptidasas proteinasas N y C (metaloproteinasas dependientes de  $Zn^{2+}$ ) eliminan los péptidos N-terminal y C-terminal, dando lugar al tropocolágeno (subunidad estructural del colágeno). Los dominios no colagénicos que flanquean las moléculas de pro-colágeno, el N-propéptido (PINP) y C-propéptido (PICP), inician la formación de la triple hélice y regulan el diámetro de las fibrillas. Por otro lado, los telopéptidos no helicoidales participan en el entrecruzamiento de los colágenos con otras moléculas (Gelse K y cols., 2003; Myllyharju J y cols., 2004). Finalmente, el ensamblaje y entrelazamiento estable (cross-linking) de múltiples moléculas de tropocolágeno da lugar a la forma madura e insoluble de colágeno y puede ocurrir espontáneamente (Prockop DJ y cols., 1998; Shindyapina AV y cols., 2014) (**Figura 22**).

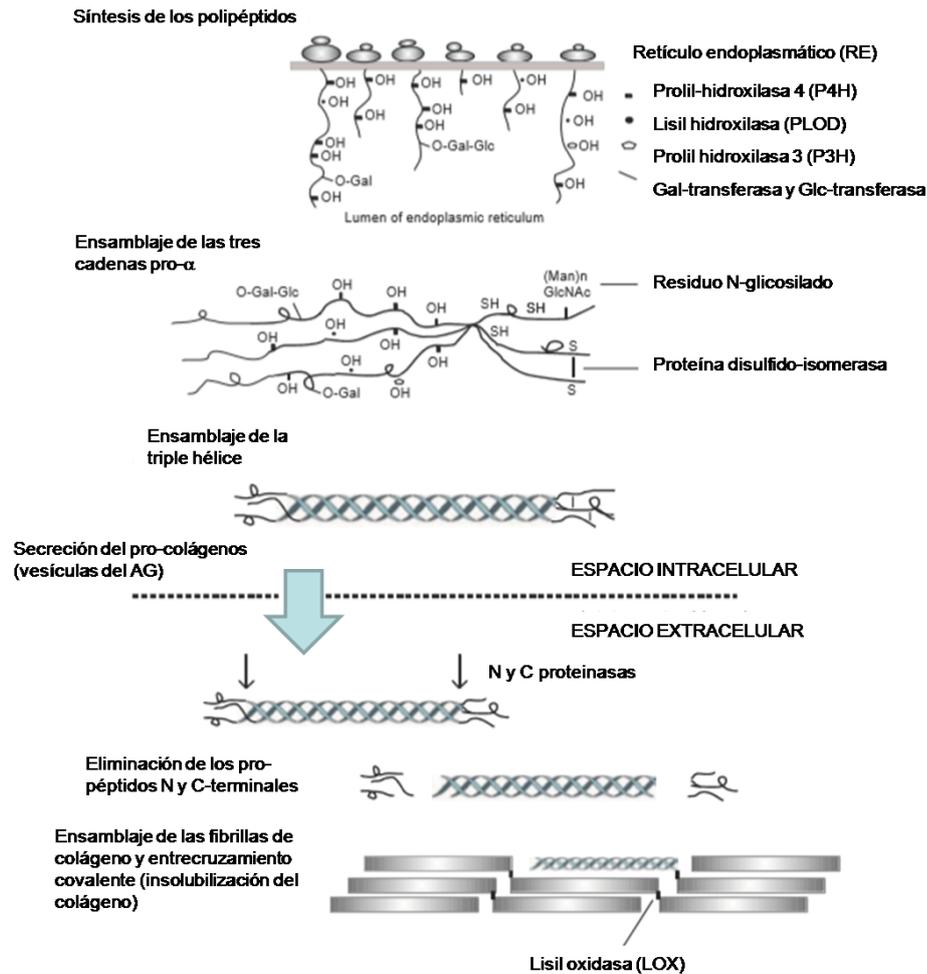


Figura 22. Estructura y biosíntesis del colágeno. Adaptado de Myllyharju, 2004

### 7.3. MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DEL COLÁGENO

Las modificaciones post-traduccionales del colágeno incluyen la eliminación de los péptidos señal en las cadenas polipeptídicas prepro- $\alpha$ , la escisión de los extremos N y C-terminales, hidroxilaciones enzimáticas, glicosilaciones, el ensamblaje de las cadenas de pro-colágeno y la formación de puentes S-S (Gelse K y cols., 2003; Myllyharju J y cols., 2003). Sin embargo, la hidroxilación de Lys y Pro es uno de los eventos más relevantes, dada su participación en la formación del procolágeno, la glicosilación, entrecruzamiento y ensamblaje del colágeno en la MEC (Kirivikko KI y cols., 1985).

#### 7.3.1. La hidroxilación de Pro y Lys como principal modificación post-transcripcional

La alteración de los patrones de hidroxilación, en términos cuantitativos y cualitativos, resulta en el desarrollo de desórdenes esqueléticos como la osteoporosis, osteogénesis imperfecta y osteopenia (Kirsch E y cols., 1981; Bätge B y cols., 1992; Knott L y cols., 1995; Köwitz J y cols., 1997; Yamahuchi M y cols., 1988; Yamauchi M y cols., 1981) y sus modificaciones y pérdida de funcionalidad es frecuente en la vejez (Shindyapina AV y cols., 2014). La oxidación de los AGE (del inglés “advanced glycation end products”), característicos de la aterosclerosis, la diabetes y el envejecimiento; son uno de los tipos mayoritarios de entrecruzamiento espontáneo de las fibrillas de colágeno y potenciales sitios de nucleación de los cristales de bioapatita vascular (Shindyapina AV y cols., 2014). Sin embargo, también existe una hidroxilación enzimática que contribuye al ensamblaje, entrecruzamiento y estabilización del colágeno. Recientemente se ha revisado las vías moleculares conducentes a la calcificación en pacientes con aterosclerosis y ERC junto con las vías de entrecruzamiento del colágeno y mineralización ósea (Shindyapina AV y cols., 2014).

La biosíntesis de colágeno funcional requiere de múltiples hidroxilaciones enzimáticas post-traduccionales. Existen al menos ocho enzimas hidroxilasas específicas, pero destacan tres: prolil 4-hidroxilasa (P4H), la lisil hidroxilasa-1 (PLOD) y las lisil oxidasas (LOX, también LOS). Todas ellas pertenecen al grupo de las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato, las cuales requieren de  $Fe^{2+}$ , 2-oxoglutarato,  $O_2$  y ascorbato (Gelse K y cols., 2003; Myllyharju J y cols., 2003; Dembure PP y cols., 1987). La participación de residuos aminoacídicos específicos es fundamental para la biosíntesis y maduración del colágeno. Así, las Hyl intra e intermoleculares estabilizan el ensamblaje de las moléculas de tropocolágeno, proporcionan estabilidad mecánica e insolubilidad a la molécula madura mediante la formación de enlaces covalentes (Myllyharju J y cols., 2004), mientras que la H-Pro además favorecen la glicosilación (Myllyharju J y cols., 2003).

La funcionalidad del colágeno tipo I además se ve afectada por el patrón de hidroxilación específico de dominio intramolecular y es tejido-específico (Uzawa K y cols., 2003; Uzawa K y cols., 1999). Mientras que el colágeno dérmico presenta un patrón de hidroxilación casi exclusivamente derivado de  $Lys^{ald}$ , el óseo deriva de  $Hyl^{ald}$  y está directamente relacionado con la mineralización temprana (Uzawa K y cols., 1999; Yamauchi M y cols., 1989).

---

## 7.4. ENZIMAS HIDROXILASAS IMPLICADAS EN LA MADURACIÓN DEL COLÁGENO

### 7.4.1. Prolil-4-hidroxilasa

En el lumen del RE, la prolil hidroxilasa (P4H) cataliza la formación de residuos 4-hidroxiprolina en los tripletes X-Pro-Gly de las cadenas pro- $\alpha$  y de otras proteínas que contienen secuencias ‘tipo-colágeno’ o “collagen-like”. Esta modificación es necesaria para la formación de una triple hélice termoestable de pro-colágeno (Myllyharju J. 2013). Además, P4H ejerce un control de calidad sobre la nueva molécula de procolágeno reteniéndola en el RE hasta que el ensamblaje ha sido totalmente completado (Walmsley AR y cols., 1999). Finalmente, la P4H hidroxila los residuos Pro de los motivos X-Pro-Ala del colágeno IV, en el motivo (Val-Pro-GLy-Val-GLy)<sub>n</sub> de la elastina (Myllyharju J y cols., 2004; Myllyharju J y cols., 2008) y en el motivo X-Pro-GLy de Pro700 presente en Argonauta 2 (Ago2) (Qi HH y cols., 2008).

### 7.4.2. Lisil hidroxilasas (LH): actividades PLOD y LOX

A diferencia de la P4H, las LHs pueden modificar covalentemente aminoácidos en el colágeno tipo I tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Shindyapina AV y cols., 2014). La Hyl tienen al menos dos funciones: i) formación de entrecruzamientos o “cross-linkings” estables intermoleculares, y ii) facilitan la glicosilación post-traducciona del colágeno. Para ello los residuos Hyl actúan como sitios de unión de grupos carbohidrato que son transferidos a los grupos hidroxilo de las enzimas hidroxilisil galactotransferasa y galasilhidroxilisil-gluco transferasa. Algunas LH (como la LH3) tienen, además, actividades hidroxilisil galactotransferasa y galasilhidroxilisil-gluco transferasa (Risteli M y cols., 2009). Aunque se desconoce exactamente la función de las unidades hidroxilisina-carbohidrato, parecen ser importantes en la formación y morfología de las fibrillas colagénicas (Notbohm H y cols., 1999; Takaluoma K y cols., 2007).

Los entrecruzamientos resultantes de Hyl<sup>ald</sup> son más estables que los derivados de Lys<sup>ald</sup> y son los principalmente descritos en el hueso (Prockop y cols., 1984; Kivirikko y cols., 1985).

❖ ***Protil-lisil-oxidasa (PLOD)***

Existen tres LHs identificadas como 5-dioxigenasas, 2-oxoglutarato, lisina-procolagénicas o PLOD (PLOD 1-3) (Uzawa K y cols., 1999). Estructuralmente se caracterizan por la presencia de una secuencia consenso IKGIGIKG (Hautala T y cols., 1992), un motivo de unión al RE próximo al extremo C-terminal (Suokas M y cols., 2000).

Las mutaciones afectando al gen *PLOD*, comprometen gravemente la funcionalidad del tejido conectivo y el correcto desarrollo óseo (Myllyharju J y cols., 2004; Ha Vinh R y cols., 2004). Los patrones de expresión de las enzimas PLOD1-3 están regulados durante la diferenciación osteoblástica de células osteoprogenitoras y es tisular-dependiente (Uzawa K y cols., 1999).

PLOD1 hidroxila Lys localizados en el dominio helicoidal del colágeno, sin afectar los dominios no helicoidales, mientras que la expresión de PLOD2 y PLOD3 es más específica de tejido (Valtavaara M y cols., 1998; Valtavaara M y cols., 1997). La sobreexpresión de algunos miembros PLOD ha sido descrita exclusivamente durante las etapas tardías de la diferenciación coincidiendo con la mineralización y con un entrecruzamiento intra e intermolecular propio de la vía Hyl<sup>ald</sup>, sin variación de los niveles de H-Pro (Uzawa K y cols., 1999).

❖ ***Lisil oxidasa (LOX)***

La lisil oxidasa (LOX o LOS) y las enzimas LOXL son enzimas extracelulares cuya actividad permite el entrecruzamiento intermolecular covalente de las moléculas de tropocolágeno y las fibrillas de colágeno, así como de elastina (Rodríguez C y cols., 2008). LOX es una enzima dependiente de Cu cuya actividad enzimática participa en la deaminación oxidativa de residuos específicos de Lys e Hyl. La condensación espontánea de las alisina e hidroxialisina resultantes, da lugar a la formación de uniones covalentes inter e intramoleculares que estabilizan la MEC (Kagan HM y cols., 2003).

LOX se sintetiza y secreta como pro-enzima de unos 50 KDa, la pro-lisil oxidasa. La escisión proteolítica extracelular da lugar a LOX activa (33 KDa) y su pro-peptido (LOX-PP, 18 KDa) (Hurtado PA y cols., 2008; Orriols M y cols., 2014). Por un lado, LOX-PP se acumula normalmente en la monocapa de osteoblastos normales e inhibe la proliferación ‘obligando’ a las células a salir del ciclo celular e iniciar la

diferenciación (Vora SR y cols., 2010). Por otro lado, la regulación de la LOX ha sido descrita como un marcador de diferenciación osteoblástica fisiológica en pre-osteoblastos (Hong HH y cols., 2004) y la máxima sobreexpresión de LOX precede a la fase más eficiente de acumulación e insolubilización del colágeno (Hong HH y cols., 2004). Además, LOX tiene funciones biológicas únicas que incluyen el control de la expresión génica durante la transición endotelio-mesénquima; regulación de procesos de proliferación/migración/adhesión (Gacheru SN y cols., 1997; Green RS y cols., 1995); desarrollo del sistema respiratorio y cardiovascular (Orriols M y cols., 2014); dentinogénesis (Tjäderhane L y cols., 2013); regulación del fenotipo de la CMLV (Orriols M y cols., 2014; Hurtado PA y cols., 2008). Así, su desregulación tisular se asocia con el desarrollo de patología cardiovascular (Rodríguez C y cols., 2008; Rodríguez C y cols., 2002; Rodríguez C y cols., 2009; Rodríguez C y cols., 2008; Payne SL y cols., 2007).

La utilización de agentes latirogénicos como el  $\beta$ -aminopropionitrilo (BAPN), un inhibidor específico de la actividad LOX (incluyendo las enzimas LOX y LOXL) demuestra que ésta es fundamental en el control de la maduración del colágeno en la MEC (Hong HH y cols., 2004; Gerstenfeld LC y cols., 1993; Chang K y cols., 1980). El resultado es la acumulación de colágeno soluble en el espacio extracelular, una menor disponibilidad de MEC susceptible de mineralizarse y una menor capacidad osteoinductiva (Gerstenfeld L y cols., 1984; Maruel E y cols., 1982; Smiley JD y cols., 1962; Di Cesare PE y cols., 1994).



## **Sección IV. Justificación**

---



El mecanismo de calcificación vascular es un proceso fisiopatológico multifactorial, complejo, activo y parcialmente modificable en el que la CMLV reemplaza el fenotipo contráctil por el secretor, induce la formación y remodelado de MEC, secreción de factores autocrinos y de derivados membranosos que actúan como sitios de nucleación de los cristales de hidroxapatita. Múltiples mecanismos de iniciación han sido propuestos como resultado de trabajos *in vitro* e *in vivo*, sin embargo los avances en el conocimiento de la calcificación vascular no han sido suficientes para ofrecer una solución terapéutica eficaz. Actualmente, no existen terapias capaces de revertir el proceso, ni siquiera los bifosfonatos, y únicamente permiten reducir la progresión de la calcificación vascular.

La mejor caracterización y conocimiento de las vías moleculares implicadas en la fisiopatología multifactorial de la calcificación vascular debe permitir la identificación de potenciales dianas terapéuticas. Resultados previamente publicados por nuestro grupo han sugerido que el polimorfismo rs1043550 afectando la región 3'-UTR del gen *CALU* se asocia con las dosis ajustadas de acenocumarol (el fármaco anti-vitamina K más ampliamente utilizado en España), así como con el contenido de calcio coronario valorado semicuantitativamente en una cohorte de pacientes con Síndrome Coronario Agudo sin elevación del segmento ST. Estos resultados junto con la funcionalidad descrita para esta proteína la convierten en un potencial regulador del proceso patológico de la calcificación vascular en relación con la gamma-carboxilación. Sin embargo, la calcificación vascular es un proceso multifactorial que no puede ser explicado exclusivamente por un único factor. La reconstrucción del proceso de osificación demuestra que además de la presencia de las células óseas, la MEC es el substrato fundamental para ser mineralizado. La cantidad, pero también la calidad de la MEC producida *de novo* contribuyen al proceso de mineralización fisiológica. Este trabajo de Tesis se ha centrado en abordar el estudio de las vías moleculares relacionadas con la pérdida de protección vascular frente a la calcificación vascular (depleción de inhibidores naturales resultante de la regulación de calumenina) y dependientes de la calidad de la MEC sintetizada *de novo*, ambos íntimamente relacionados con la ulterior diferenciación osteoblástica de la CMLV.



---

## **Sección V. Objetivos**



A continuación se desarrollan los objetivos generales y específicos de este trabajo de Tesis:

**OBJETIVO 1. Estudiar la relevancia del polimorfismo rs1043550 afectando la región 3'-UTR del gen *CALU* y evaluar la participación de la proteína calumenina en el proceso de la calcificación vascular.**

1. Estudiar la implicación clínica del polimorfismo *CALU* rs1043550 (A29809G) en una población de bajo riesgo.
2. Estudiar la expresión tisular de calumenina en asociación con el polimorfismo rs1043550.
3. Estudiar la funcionalidad del polimorfismo *CALU* rs1043550 (A29809G) mediante vectores de expresión de luciferasa.
4. Analizar el patrón temporal de expresión de calumenina en asociación con la calcificación *in vitro* de la célula de músculo liso vascular humana (CMLVh) en condiciones de hiperfosfatemia.
5. Evaluar la regulación epigenética por miRNAs de la expresión de calumenina sobre las variantes silvestre y polimórfica
6. Confirmar el papel de los miRNA regulando la expresión de calumenina en un modelo de calcificación de la CMLVh *in vitro*.

**OBJETIVO 2. Analizar el papel de la MEC en un modelo celular de calcificación vascular en cultivos primarios de célula de músculo liso vascular humana y de ratón.**

1. Estudiar la regulación dependiente de hiperfosfatemia de la síntesis y expresión de colágeno y las enzimas hidroxilasas PLOD1 y LOX, en cultivos de CMLVh y CMLV de ratón (CMLVr).
2. Estudiar el efecto de la sobreexpresión de lisil oxidasa sobre la calcificación y la activación del programa de diferenciación osteoblástica.
3. Estudiar el efecto de inhibidores específicos de las actividades enzimáticas PLOD y LOX/LOXL sobre la calcificación y la activación del programa de

diferenciación osteoblástica en un modelo celular de calcificación en CMLVr y CMLVh.

**OBJETIVO 3. Comparar los efectos de la warfarina y el acenocumarol sobre la mineralización y activación del programa de diferenciación osteoblástica, en un modelo de calcificación vascular en CMLVh.**

1. Estudiar el efecto de warfarina y acenocumarol sobre los patrones de activación del programa de diferenciación osteoblástica y la potencia pro-calcificante en la CMLVh.
2. Evaluar el efecto de warfarina y acenocumarol sobre la expresión y síntesis de calumenina.

## **Sección VI. Materiales y Métodos**

---



La Sección de Materiales y Métodos de la presente Tesis se distribuye en 5 grandes bloques. La preparación de los medios, soluciones y tampones utilizados se adjuntan en forma de Anexos

## **BLOQUE I. ESTUDIO CLÍNICO**

### **1. ADMISIÓN Y SELECCIÓN DE PACIENTES**

Se realizó reclutamiento prospectivo de pacientes ambulatorios de bajo riesgo consecutivos, sin cambios ECG, ni valores circulantes de TnT elevados indicativos de necrosis cardiaca que llegaron a consulta en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca por dolor torácico. Se realizó TCCM y angiografía coronaria para la evaluación de calcio coronario y de lesiones coronarias.

Los criterios de exclusión se citan a continuación:

- I. elevación de valores circulantes de TnT,
- II. presencia de enfermedad inflamatoria incluyendo neoplasia concomitante, procesos infecciosos o enfermedad del tejido conectivo,
- III. discrasia hematológica,
- IV. fibrilación auricular,
- V. enfermedad renal,
- VI. cardiopatía isquémica previa y/o enfermedad valvular o válvulas prostéticas.

El estudio, reclutamiento e inclusión de los pacientes fue autorizado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de nuestro Centro (*Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, HCUVA*) el 22 de febrero de 2010. El estudio se realizó de acuerdo con los principios éticos recogidos en la Declaración de Helsinki de 1964 y sus ulteriores modificaciones. Todos los pacientes consintieron su participación mediante la cumplimentación y firma de los consentimientos informados desarrollados a tal fin.

## 2. EXTRACCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE Y PROCESAMIENTO

La extracción de muestras de sangre se realizó por punción venosa antecubital, tras un periodo de reposo de 20 min, en los pacientes que autorizaron su participación en los estudios. La extracción se llevó a cabo por personal de enfermería cualificado y se requería de ayuno, abstinencia en la ingesta de bebidas alcohólicas o cafeína durante la noche anterior y abstinencia de tabaco de al menos 12 h. La toma de muestra se realizó antes de la TCCM, sin trauma ni estasis, en tubos de vacío tipo Vacutainer precargados con citrato sódico (0,011 mol/L), en tubo seco de silicona y en tubos EDTA-K3.

Las fracciones séricas se obtuvieron mediante centrifugación a 3500 g, 15 min, 4°C (Kubota 5900, Kubota Corporation, Osaka, Japón). Adicionalmente se aisló la fracción de plasma pobre en plaquetas por centrifugación a 2200 g, 20 min, 4°C; así como la capa leucoplaquetaria para la posterior purificación de DNA genómico. Las alícuotas de suero, plasma y capa leucoplaquetaria se guardaron a -80°C para el análisis en bloque de diferentes biomarcadores no incluidos en las determinaciones rutinarias del HCUVA.

## 3. PRUEBAS RUTINARIAS DE LABORATORIO

Las pruebas rutinarias de laboratorio se desarrollaron en el *Servicio de Análisis Clínico del HCUVA* e incluyeron:

- hemograma completo (recuento y fórmula),
- perfil bioquímico incluyendo la valoración de glucosa, urea, ácido úrico, proteínas totales, albúmina, calcio, bilirrubina total, triglicéridos, HDL-colesterol, LDL-colesterol, transaminasa glutámico-oxalacética (GOT), transaminasa glutámico-pirúvica (GPT), fosfatasa alcalina (ALP), gamma-glutamil transpeptidasa (GGT), lactato deshidrogenasa (LDH) y creatinina
- valoración de proteínas y enzimas relacionadas con la ocurrencia y valoración de eventos cardiacos (CK, CK-MB y TnT)

### 3.1. HEMOGRAMA

La sangre total (EDTA-K3) se analizó rutinariamente por citometría de flujo (Sysmex XE2100, Roche, Basel, Suiza). Un láser semiconductor ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ) se proyecta sobre las células sanguíneas determinando el número de células, volumen, complejidad o granulosidad y su clasificación mediante el contenido en RNA y DNA midiendo la fluorescencia emitida. El contenido en hemoglobina se determinó mediante el Sulfato lauril sódico cuya unión al grupo hemo da lugar a un producto estable cuantificable.

Los parámetros obtenidos fueron: hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio, ancho de distribución plaquetaria, leucocitos, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos.

### 3.2. PERFIL BIOQUÍMICO

Las muestras séricas se valoraron en diferentes módulos del autoanalizador Cobas 6000 (Roche, Basel, Suiza). En el módulo e501 se valoró la concentración de glucosa, urea, creatinina, CK, albúmina, colesterol, HDL-colesterol y triglicéridos. En el módulo e601 se cuantificó CK-MB y TnT.

La **glucosa, urea y CK** se determinaron mediante test enzimático cinético en que la velocidad de formación de NADPH, medido fotométricamente, es directamente proporcional a la concentración del analito o de la actividad enzimática de interés.

La **albúmina** se cuantificó mediante una prueba inmunoturbidimétrica. La unión de la albúmina contenida en la muestra a anticuerpos policlonales anti-albúmina, forma complejos cuya aglutinación es cuantificable.

La **creatinina, triglicéridos, HDL-colesterol y el LDL-colesterol** se cuantificaron por colorimetría en test enzimático cinético.

La concentración sérica de **TnT** ultrasensible se valoró durante la admisión del paciente y en las siguientes 6 y 12 h, como marcador de necrosis miocárdica sugestivo de infarto agudo de miocardio (IAM) (European Society of Cardiology & American College of Cardiology Committee, 2000; Apple FS y cols., 2002; Thygesen K y cols., 2007). Las determinaciones se realizaron por enzoinmunoensayo electroquimioluminiscente (ECLIA) (Autoanalizador Elecsys 2010, Roche, Basel, Suiza) que combina la reacción antígeno-anticuerpo sobre una micropartícula magnética

(0,28  $\mu\text{m}$  de diámetro) marcada con estreptavidina y la reacción electroquímica sobre un electrodo. La interacción entre el quelato de rutenio y la tripropilamina (TPA) sobre la superficie de un electrodo de platino es capaz de generar luminiscencia cuantificable en un fotomultiplicador. Los pacientes con concentraciones superiores a 0,035 mg/mL no fueron incluidos.

#### **4. VALORACIÓN SÉRICA DE TESTOSTERONA**

El andrógeno testosterona (17 $\beta$ -hidroxiandrosteno) se valoró para estudiar su asociación con los valores de adiponectina y CAC (Nishizawa H y cols., 2002; Haddad RM y cols., 2007). Como para TnT, se utilizó un test ECLIA (ECLIA Elecsys Testosterone II, Autoanalizador Elecsys 2010, Roche, Basel, Suiza), en el que la testosterona endógena compete con un derivado marcado con rutenio y unido a un anticuerpo monoclonal de oveja anti-testosterona biotinilado. Una segunda incubación con micropartículas recubiertas de estreptavidina y su fijación temporal a los electrodos permite la valoración de la reacción de electroquimioluminiscencia (ECL) medida directamente con un fotomultiplicador. El límite de detección fue de 0,025 ng/mL y la variación interanalítica fue del 8,4%.

#### **5. VALORACIÓN SÉRICA DE ADIPONECTINA DE ELEVADO PESO MOLECULAR**

La concentración plasmática de adiponectina de elevado peso molecular (HMW Acrp30) se cuantificó mediante ensayo inmunoenzimático ELISA tipo sándwich (Quantikine Human HMW Adiponectin/Acrp30, R&D Systems). El límite de detección de la prueba es de 0,195 ng/mL y tiene una variación interanalítica de 8,6%.

Este ensayo emplea un anticuerpo monoclonal de ratón anti-HMW Acrp30, adsorbido en pocillos donde la muestra sérica se sometió a una reacción convencional antígeno-anticuerpo. Una segunda incubación con un anticuerpo monoclonal específico contra la HMW-Acrp30 y conjugado a la enzima peroxidasa de rábano, que utiliza TBM (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) como sustrato, permite desarrollar y valorar colorimétricamente la muestra ( $\lambda = 450 \text{ nm}$ ). Se utilizó HMW Acrp30 humana

recombinante como estándar. La sensibilidad para este ensayo es de 0,989 ng/mL, estableciendo el rango de ensayo entre 3,9-250 ng/mL.

## 6. IMAGEN DE CALCIO CORONARIO: TCCM

Se escogió la TCCM de 64 cortes (VTC LightSpeed; General Electric Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) para la valoración del contenido de calcio coronario y la severidad de las lesiones coronarias. Personal altamente cualificado, de la *Sección de Cardiología Hemodinámica del HCUVA*, realizó adquisiciones de 64 cortes. El árbol coronario fue completamente evaluado a una velocidad de mesa de 3 mm de cortes axiales/rotación, el tiempo de rotación ‘gantry’ fue de 0,4 s y el voltaje del tubo fue de 120 KV. Se utilizó ECG prospectivo en un 75% de cada intervalo RR. Se inyectó atenolol por vía intravenosa (2 a 10 mg) a los pacientes con elevada frecuencia cardiaca y sin contraindicación, para objetivar  $< 70$  latidos/min. El contenido total de calcio fue calculado utilizando la escala Agatston (Agatston AS y cols., 1990), que depende del área calcificada y de la densidad. Los depósitos de calcio coronario se identificaron cuando se excedían las 30 UH del umbral. Las imágenes capturadas se transfirieron a ‘Advantage Workstation’ y fueron analizadas mediante el software Smartscore 4.0 (General Electric Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Una puntuación Agatston  $\geq 400$  UH fue considerada calcio elevado. Adicionalmente se realizó angiograma coronario para la valoración de las lesiones coronarias y se consideró lesión coronaria severa cuando la oclusión  $\geq 70\%$ .

## 7. GENOTIPADO DEL POLIMORFISMO 3'-UTR CALU rs1043550

Se realizó extracción de DNA genómico de las placas leucoplaquetarias congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para ello se utilizó el kit GentraPuregene Blood Kit (Qiagen, Hilden Alemania) que combina el lisado celular con un detergente aniónico en presencia de un estabilizador de DNA que inhibe la actividad de DNAsas endógenas y exógenas. Además incorpora una digestión enzimática de RNA (RNasa A) y las proteínas se retiran por precipitación con sales. El DNA se precipita en isopropanol con lavados consecutivos en solución alcohólica al 70% y, finalmente, se disuelve en 1 mM EDTA/10 mM Tris-HCl, pH 7,5, esperando entre 16-50  $\mu\text{g}$  de 1 mL en sangre total.

Tras la obtención del DNA genómico se procedió al genotipado en bloque de todos los pacientes incluidos en este trabajo. El genotipado del polimorfismo *CALU* rs1043550 (A29809G) se realizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, “Polimerase Chain Reaction”) cuantitativa en tiempo real (qPCR) utilizando Light Cycler LC480 PCR (Roche, Basel, Suiza) mediante ensayo ya validado (Applied Biosystems C\_7564455\_20, Life technologies, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU). Adicionalmente se realizó una secuenciación directa de 5 muestras escogidas al azar para confirmar los resultados del genotipado (Hernández-Romero D y cols., 2010) en el *Centro de Hemodonación del Hospital Reina Sofía (Murcia, España)*.

## **BLOQUE II. ESTUDIO HISTOLÓGICO**

### **1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL HISTOLÓGICO**

Se utilizó muestras de arteria femoral y poplítea de pacientes llevados a cirugía cardiovascular amablemente proporcionadas por la *Sección de Cirugía Cardiovascular del HCUVA*.

### **2. FIJACIÓN, DESCALCIFICACIÓN Y PROCESAMIENTO HISTOLÓGICA**

#### **2.1. FIJACIÓN**

Tras la extracción del tejido, éste fue inmediatamente sumergido en *solución fijadora* pre-enfriada (**Anexo II- epígrafe 1.1**). Las muestras se conservaron durante 16-24 h a 4°C para ralentizar el proceso de lisis tisular en los estratos más profundos del tejido durante la fijación y durante 3-4 días a temperatura ambiente (15-25°C)

#### **2.2. DESCALCIFICACIÓN**

Se realizó descalcificación suave y parcial de los tejidos, durante 16-36 h, dependiendo del grado de calcificación, y antes de la inclusión en parafina. Se utilizó un volumen de *solución descalcificadora suave* (**Anexo II- epígrafe 1.2**) unas 10 veces mayor al tamaño de la muestra, según lo recomendado en manuales de histología y anatomopatología (García del Moral R, 1993). Se valoró la presencia de calcio

contenido en el extracto mediante el método de la *o*-cresoftaleína para confirmar la descalcificación de la muestra.

### **2.3. PROCESAMIENTO E INCLUSIÓN EN PARAFINA**

En el presente trabajo de Tesis el únicamente el procesamiento histológico se realizó de forma automatizada en el *Servicio de Anatomía Patológica-Biobanco del HCUVA*.

La impregnación o infiltración con parafina se realizó sumergiendo la muestra, procesada e introducida en un cassette, en parafina líquida histológica durante  $\geq 1$  h. En este paso, el xilol es reemplazado por parafina. Finalmente se proporcionó un soporte sólido al tejido, mediante la inclusión de la muestra en parafina a 64°C. La preparación manual de los bloques de parafina se realizó en una estación de parafinado en el *Servicio de Anatomía Patológica del HCUVA*. Los bloques se dejaron solidificar y se enfriaron en placa de frío a -15°C antes de realizar los cortes histológicos.

### **2.4. MICROTOMÍA**

Se realizaron cortes histológicos seriados de 2-3  $\mu\text{m}$  de espesor mediante microtomía de rotación (Microm HM 325, Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU) y la utilización de cuchillas especiales para cortar tejidos duros (Shandon MX35 Premier+ 35°/80 mm Microtome Blade, Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU). La posición de las cuchillas se fijó en 15°. Los cortes seriados se dispusieron en baño de flotación de agua destilada para que la parafina se estirase y se pescaron en portaobjetos identificados con la fecha, tipo de tejido, número del corte/s cargado/s y tipo de tinción histológica o inmunohistoquímica. Se utilizaron portaobjetos cargados positivamente (Superfrost™ Plus adhesión slides, Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU).

## **3. TINCIONES**

### **3.1. DESPARAFINIZACIÓN, RE-HIDRATACIÓN, DESHIDRATACIÓN Y MONTAJE**

### **3.1.1. Desparafinización**

Los cortes histológicos se desparafinaron rutinariamente durante  $\geq 60$  min a  $60^{\circ}\text{C}$  en estufa, seguida de la inmersión en xileno (Neoclear, Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU) 20 min o aproximadamente 16 h a  $15-25^{\circ}\text{C}$  para técnicas inmunohistoquímicas (IHQ).

### **3.1.2. Rehidratación**

Antes de iniciar protocolos de tinción se llevó a cabo la rehidratación de los cortes por inmersión en alcoholes decrecientes (soluciones hidroalcohólicas con concentraciones decrecientes de etanol 100%, 96%, 70% y 60%) cada 5 min, y finalizando con lavados de agua destilada.

### **3.1.3. Deshidratación**

Al finalizar la tinción la muestra se deshidrató por inmersión en alcoholes crecientes (sentido opuesto a la rehidratación) terminando en una deshidratación definitiva en xileno (Neoclear, Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU)

### **3.1.4. Montaje**

El montaje se realizó en medio no acuoso (Neomount, Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU), depositando una gota en un extremo y dejando caer el cubreobjetos para distribuir el medio sobre la muestra.

## **3.2. TINCIÓN ALIZARIN RED**

Alizarin Red S es una antraquinona (1,2-dihidroxi-antraquinona, compuesto orgánico aromático derivado del antraceno) utilizada para la detección de calcio. La interferencia inespecífica con otros cationes bivalentes como Mg, Mn, Ba, Sr o Fe, es despreciable.

La muestra se sumergió durante unos 2 min en *Solución Alizarin Red* (**Anexo II-epígrafe 1.3**). En esta caso la deshidratación se realizó en acetona (20 inmersiones)

---

seguida de repetidas inmersiones en acetona-xileno (20 más), para terminar con la deshidratación definitiva en xileno (Neoclear, Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU). El resultado es un producto birrefringente de tonalidad rojo-anaranjada (excepto oxalatos).

### 3.3 TINCIÓN IHQ

Se estudió la expresión y localización de Calumenina (1:500), cMGP (1:250) y ucMGP (1:250), en muestras parafinadas de arteria femoral y poplítea

El formol contenido en la *solución fijadora* (**Anexo II- epígrafe 1.1**) produce una reacción típica de aminoformaldehído (HCHO) con un grupo amino de las Lys, dando lugar a la formación de derivados del metilol y una reacción de condensación proteína-CH<sub>2</sub>-proteína. Esta reacción puede continuar con la de otro grupo amino produciendo un enlace cruzado, llamado puente metilénico, y así sucesivamente. El resultado final es el entrecruzamiento inter e intra proteico y la pérdida de inmunoreactividad (enmascaramiento antigénico).

En este trabajo de Tesis se realizó desenmascaramiento químico a pH 9,0 (*Tampón TE I*, **Anexo II-epígrafe 2.1.1**) combinado con calor. Las secciones tisulares se incubaron con *Tampón TE I* precalentado (**Anexo II- epígrafe 2.1.1**) en baño María a 95-100°C durante 35 min y se enfriaron durante 1 h. Los lavados se realizaron con TBST 1X (2-3 x 5 min) a 15-25°C. El *bloqueo antigénico* (**Anexo II- epígrafe 1.5a**) se realizó durante 30-60 min a 15-25°C. Los anticuerpos primarios se incubaron a 60 min durante 15-25°C. La peroxidasa endógena se bloqueo incubando con *solución tamponada de peróxido de hidrógeno* (**Anexo II- epígrafe 1.4**) durante 10 min, para seguir con la incubación del anticuerpo secundario durante 30 min a 15-25°C. Se utilizó el sustrato 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) durante 10 min a 15-25°C para desarrollar la reacción inmunohistoquímica. Los cortes histológicos se contrastaron con tinción convencional de hematoxilina ácida. Finalmente se realizó protocolo convencional de deshidratación en alcoholes crecientes y xileno, y montaje en medio no acuoso.

De acuerdo con las propiedades de los reactivos empleados, los resultados a esperar son: Núcleos: azul; Citoplasmas basófilos: púrpura; Proteína de interés: marrón.

## BLOQUE III. CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS DE LAS VARIANTES SILVESTRE Y POLIMÓRFICA DE LA REGIÓN 3'-UTR DEL GEN CALU.

### 1. MANEJO DE CEPAS BACTERIANAS

#### 1.1. CEPA BACTERIANA EMPLEADA

Cepa	Utilización	Características
JM109	Amplificación de plásmidos y vectores de clonación y subclonación	Células competentes <i>dam+</i>

*Dam+*, adeninas metiladas en GATC

Todo el manejo se realizó en esterilidad, bajo mechero Bunsen. Las incubaciones se realizaron a 37°C con o sin agitación orbital (Incubador con agitación orbital, OPTIC ivymen system, JP Selecta, Abrera, Barcelona, España).

#### 1.2. PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

Se inoculó una colonia de *E. coli* JM109 en 10 mL de medio *Luria-Broth* (LB) (**Anexo II- epígrafe 3.1.1**) y se cultivó a 37°C y agitación ( $\approx 250$  rpm) hasta alcanzar una OD  $\approx 0,6-0,7$  (crecimiento exponencial). Rápidamente se incubaron en baño de hielo y se centrifugaron en una centrifuga de mesa a 8000 g durante 7 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y al pellet se añadieron 5 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M pre-enfriado y estéril (autoclavado). Se realizó incubación de las bacterias durante 10 min en baño de hielo y se centrifugaron a 2500 g, 5 min, 4°C. De nuevo se descartó el sobrenadante y se añadió 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M frío y se incubó durante otros 10 min en baño de hielo. Se alicuotó las células competentes y se prepararon stocks de glicerol para su preservación (**Sección VI Materiales y Métodos, Bloque III, apartado 1, epígrafe 1.3**).

#### 1.3. TRANSFORMACIÓN BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO

Se llevó a cabo la preparación de placas de *LB-agar selectivo* (**Anexo II- epígrafe 3.1.4**) suplementado con ampicilina (pGEM y pGL3) o kanamicina (pEGFP-c1), se equilibraron a temperatura ambiente y se dejaron solidificar para añadir 400 mM isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopioranosido (IPTG) (40  $\mu$ L) y 500 ng/mL X-Gal (40  $\mu$ L).

Se preparó *medio SOC* (**Anexo II- epígrafe 3.1.5 y 3.1.6**) para la transformación. Se utilizó  $>1 \times 10^8$  ufc/ $\mu$ g DNA (vectores de clonación y expresión, productos de ligación o productos de mutagénesis). El DNA a transformar se conservó en baño de hielo, mientras se descongelaban las JM109 competentes en hielo durante 5 min. Se añadió 50  $\mu$ L de JM109 y la mezcla se incubó durante 30 min en baño de hielo. Posteriormente se aplicó choque térmico a una temperatura de, exactamente, 42°C durante 45-50 s en termobloque (P Selecta Multiplaces, JP Selecta, Abrera, Barcelona, España) inmediatamente seguido de 2 min de incubación en hielo. Se añadió 950  $\mu$ L de *medio SOC* atemperado a 25 °C, se incubó durante 1h 30 min a 37°C en agitación ( $\approx$  150 rpm) y se centrifugó en centrifuga de mesa a 1000 g, 10 min. El pellet se resuspendió en 200  $\mu$ L con *medio SOC*, se plaqueó por estría múltiple en las placas reservadas y se incubó durante 16-24h a 37°C. Se seleccionaron y picaron las ufc aisladas para inocularlas en 5 mL de *medio LB selectivo* (**Anexo II- epígrafe 3.1.2**) y se crecieron durante 16 h a 37°C, en agitación ( $\approx$ 250 rpm).

## 2. OBTENCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DEL INSERTO 3'-UTR CALU SILVESTRE

Se seleccionó y adquirió el clon de cDNA BC013383.2 de 1963 pb (clone IMAGE 3507961, cadena +) (**Anexo III**) correspondiente a la variedad 2 o isoforma b del mRNA (Locus NM\_001130674, UCSC Genome Bioinformatics) para el gen CALU (chr7:2,854,968-2,854,968) (**Anexo IV**).

Se llevó a cabo la búsqueda de la secuencia silvestre 3'-UTR del gen *CALU* en las bases de datos de UCSC Genome Bioinformatics (UCSC Genome Bioinformatics / Genome Browser/ Calu/ mRNA Secondary structure of 3' and 5'-UTR) y se introdujo en el software Nebcutter v2.0 para caracterizar los sitios de restricción.

Los cebadores para la PCR convencional se diseñaron utilizando el programa virtual en línea Primer 3 output (**Anexo V**). Dentro de la secuencia de cada cebador se introdujo la secuencia específica de corte de las enzimas de restricción que no cortan ni la secuencia 3'-UTR del gen *CALU* ni la de los vectores de clonación pGEM®-T Easy vector (Promega, Fitchburg, Wisconsin, EEUU) y pGL3-Basic (Promega, Fitchburg, Wisconsin, EEUU) (**Tabla 6**). En el diseño de los cebadores F6 y R10, se tuvo en

cuenta la temperatura de melting (Tm) que se cálculo asignando 2°C por cada A o T, 4°C por cada G o C y por cada discordancia o “mismatch” introducida en la secuencia.

**Tabla 6. Cebadores diseñados para la PCR convencional de 3'-UTR CALU.** En negrita se indican los sitios de restricción introducidos en la secuencia del cebador obtenido para la región 3'-UTR mediante Primer 3 output. Subrayados aparecen los cambios o mismatch. Con / se indica el sitio de corte de la correspondiente endonucleasa.

Cebador	Secuencia 5'→3' (sitio de restricción)	Endonucleasa
<b>Primer 3 output</b>	5'-GCAAGCTTACCAAGGAGGAGATCGTTG-3'	
<b>Directo (forward), F6</b>	5'-GCAT/ <u>CTAG</u> / <u>ACCAAGGAGGAGATCGTTG</u> -3'	<i>XbaI</i>
<b>Primer 3 output</b>	5'-GGAACCGGATGGGGGCATTTACAGTGATT-3'	
<b>Reverso (reverse), R10</b>	5'-GGAG <u>TT</u> / <u>AACT</u> GGGGGCATTTACAGTGATT-3'	<i>HpaI</i>

Se amplificó la secuencia 3'-UTR CALU silvestre mediante PCR convencional utilizando una polimerasa de ADN *Pfu* (*Pyrococcus furiosus*) y una *Taq* termoestables. La *Pfu* tiene actividad exonucleasa correctora en sentido 3' → 5', generando menos errores; sin embargo, *Pfu* no añade extremo A. Por ello, se realizó PCR convencional con *Pfu* seguida de *Taq* según las recomendaciones del proveedor. La *Taq* añade adeninas con elevada probabilidad al extremo 3' y los productos resultantes se utilizaron para la clonación TA de la secuencia 3'-UTR CALU silvestre en pGEM®-T Easy vector (pGEM®-T Easy Vector System, Promega, Fitchburg, Wisconsin, EEUU).

## 2.1. PREPARACIÓN DE LA REACCIÓN DE PCR

Reactivo	Volumen (µL)/reacción
<i>10X buffer</i> (1X)	5
Cebador F6	1
Cebador R10	1
Mezcla dNTPs	4
DNA molde (3'-UTR CALU)	1
Taq o <i>Pfu</i> DNA polimerasa	37
V <sub>F</sub>	50

## 2.2. PROTOCOLO DE PCR

Se realizó PCR convencional utilizando Termociclador Techne TC-412 (Bibby Scientific, Staffordshire, Reino Unido) y el siguiente protocolo de ciclos:

Fase	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Inicio	1 ciclo	94	4
Desnaturalización		94	1
Alineamiento	30 ciclos	58	1
Extensión/elongación		72	2
Extensión final	1 ciclo	72	10
Conservación	1	4	∞

Finalmente, se realizó digestión simple (ver más adelante) de los amplicones con *Hind*III (A/AGCT/T). Según Nebcutter v2.0, *Hind*III debe cortar la secuencia 3'-UTR *CALU* silvestre (o inserto) en 7/11 y 712/716, resultando en tres fragmentos.

## 3. OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS DE pDNA

### 3.1. PREPARACIONES PLASMÍDICAS MINIPREP Y MIDIPREP ENDOTOXIN FREE

Se confirmó la transformación bacteriana mediante preparaciones plasmídicas tipo mini (Qiagen, Hilden Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante, para confirmar la presencia del vector transformado por electroforesis y secuenciación en los vectores recombinantes transformados. Adicionalmente, se realizaron preparaciones plasmídicas libres de endotoxinas, generalmente, mediante una adaptación del protocolo de maxiprep endotoxin free (Plasmid maxi endofree Kit, Qiagen, Hilden Alemania) en un formato midi (Plasmid midiprep, Qiagen, Hilden Alemania) y, ocasionalmente, en formato Maxiprep Endo free (Plasmid maxi endofree Kit, Qiagen, Hilden Alemania). Las preparaciones plasmídicas libres de endotoxinas se utilizaron en protocolos de transfección de células animales.

Las ufc picadas y crecidas en 5mL de medio LB de selección eran escaladas a formatos mayores dependiendo de la finalidad última (preparación plasmídica tipo midi o maxi). Se escaló 450-500 µL de JM109 en 25-30mL de *medio LB selectivo* (**Anexo**

**II- epígrafe 3.1.2)** y se realizó midiprep o se continuó escalando 3mL en 200mL de LB de selección para preparaciones tipo maxi.

Generalmente se realizó protocolo adaptado de preparación tipo midi endofree. Se centrifugó 1-3 mL a 5000 g, 15 min y se retiró el medio sobrenadante. El pellet bacteriano se resuspendió en 250 µL de Tampón P1 del kit suplementado con RNAsa A con vórtex. Se adicionaron 250 µL de Tampón P2 del kit y se mezcló por inversión 4-6 veces, sin dejar más de 5 min. Entonces se añadió 350 µL de Tampón N3 del kit y se mezcló inmediatamente por inversión otras 4-6 veces. Se centrifugó a 17900 g, 10 min en centrifuga de mesa y se transfirió los sobrenadantes a las columnas *QIAprep spin column*. Se centrifugó otros 60 s y se lavó la columna mediante la adición de 500 µL de Tampón PB del kit. Se realizó un último lavado de la columna con 750 µL de Tampón PE del kit y se centrifugó otros 2 min para descartar el sobrenadante. El pDNA fue eluido en 50 µL de Tampón EB del kit y centrifugación en centrifuga de mesa a 17900 g, 1 min. La cuantificación se realizó en espectrofotómetro (Eppendorf, Hamburg, Alemania) para dsDNA (absorbancia 260/280  $\geq$  1,8-2,00).

Excepcionalmente se realizó protocolo de preparación plasmídica tipo maxi siguiendo las indicaciones del proveedor.

## **3.2. DIGESTIONES CON ENDONUCLEASAS, ELECTROFORESIS ANALÍTICA EN GELES DE AGAROSA, PURIFICACIÓN DE BANDAS Y SECUENCIACIÓN**

### **3.2.1. Digestiones del DNA con endonucleasas**

Para el tratamiento de muestras de DNA con enzimas de restricción o endonucleasas se siguieron las especificaciones comerciales en cada caso con las condiciones generales descritas por Sambrook y cols. (Sambrook JF y cols., 2010). Las enzimas utilizadas en la presente Tesis se adquirieron de Fermentas (Life technologies, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU): *HindIII*, *EcoRI*, *NcoI*, *HpaI* y *XbaI*. En todos los casos las mezclas de digestión se incubaron durante 1h 30 min a 37°C en termobloque (P-selecta Multiplaces, JP Selecta, Abrera, Barcelona, España)

En este trabajo de Tesis se realizó protocolo de digestión simple con *HindIII* para confirmar la amplificación del clon de *CALU*; *NcoI* y *EcoRI* para confirmar la

amplificación de pEGFP-c1 y pNR-L, respectivamente. La preparación de cada reacción individual de digestión simple se describe a continuación:

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
buffer 10X Rojo/Tango	1
plásmido	5
<i>Hind III/NcoI/EcoRI</i>	1
agua	3
$V_F$	10

$V_F$ , volumen final preparado

Adicionalmente, se realizó digestión doble con las endonucleasas *HpaI* y *XbaI* para el aislamiento y obtención de extremos cohesivos del inserto 3'-UTR *CALU* silvestre clonado en el vector pGEM®-T Easy vector (Promega, Fitchburg, Wisconsin, EEUU) recombinante y para linealizar el vector de expresión pGL3-Basic (Promega, Fitchburg, Wisconsin, EEUU). Ambas enzimas son compatibles con el tampón 10X Tango®, lo que permite la realización de digestión doble en  $V_F = 20 \mu\text{L}$ . El protocolo utilizado para cada reacción de digestión doble fue el siguiente:

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Tango 10X (1X)	2
0,5-1 $\mu\text{g}$ pDNA producto de miniprep/midi endofree	5
<i>HpaI</i> (1U/ $\mu\text{L}$ )	0,5-1
<i>XbaI</i> (1U/ $\mu\text{L}$ )	0,5-1
agua	10
$V_F$	20

U, unidades enzimáticas;  $V_F$ , volumen final preparado

### 3.2.2. Electroforesis analítica en geles de agarosa y purificación de bandas

Los productos de digestión (pDNA linealizados e inserto 3'-UTR *CALU* con 1-6 Kb) se separaron electroforéticamente en geles de 50 mL de agarosa generalmente al 1,6% (Low range agarose A7431, Sigma, San Luis, MO, EEUU) preparada en TBE 1X y 2,5  $\mu\text{L}$  de RedSafe™ (iNtRON Biotechnology Inc, Korea). Las muestras se prepararon en tampón de carga 5X Loading Dye Solution (Fermentas, Life technologies, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU):

5 µL producto digestión,  
 3µL agua ultra pura,  
 2µL tampón de carga 5X (1X).

La separación electroforética se desarrolló a 90 mV, 400 mA, 60-90 min y las bandas se visualizaron con radiación UV (Sambrook JF y cols., 2010) usando un transiluminador (Alpha Innotec Corporation, Kasendorf, Alemania). El tamaño de los fragmentos se comparó con las bandas de DNA de doble cadena y peso molecular conocido (pGEM® DNA marker, Promega, Fitchburg, Wisconsin, EEUU). Las bandas o fragmentos de interés, los insertos 3'-UTR *CALU* (977 pb) y los plásmidos pGL3-Basic linealizados, se purificaron. Para ello se cortaron cuidadosamente las bandas con bisturí y se procedió a la extracción del DNA mediante la utilización del kit Quiaquick Gene Extraction Kit (Qiagen, Hilden Alemania).

### 3.2.3. Secuenciación de DNA

Las preparaciones plasmídicas conteniendo el inserto fueron secuenciadas en el *Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia* para confirmar la secuencia silvestre (p3U-CALUa) y el cambio de nucleótido en la variedad polimórfica de 3'-UTR *CALU* (A→G) (pU3-CALUg) (**Anexo VI**). Se utilizó los cebadores directo F5 y reverso R9 (Primer3 output) para la secuenciación de los plásmidos (**Tabla 7**):

**Tabla 12.** Secuencias de los cebadores utilizados para secuenciar el inserto 3'-UTR *CALU*

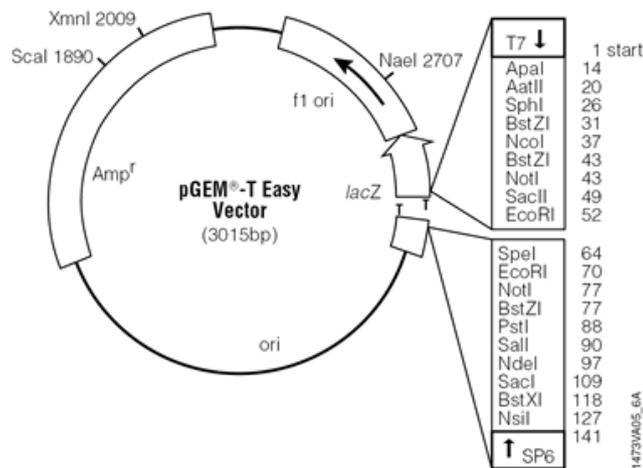
Cebador	Secuencia 5'-3'
Directo F5	CCA AGG AGG AGA TCG TTG AC
Reverso R9	TGG GGG CAT TTA CAG TGA TT

## 4. CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS: CLONACIÓN Y SUBCLONACIÓN DE 3'-UTR *CALU*

### 4.1. CLONACIÓN DEL INSERTO 3'-UTR *CALU* SILVESTRE EN EL VECTOR pGEM®-T EASY VECTOR

El clonación *TA-cloning* fue la técnica empleada en este trabajo de Tesis y se fundamenta en la capacidad de hibridación de la A y T sobre diferentes fragmentos de DNA en presencia de la DNA ligasa T4.

Para ello se utilizó el vector pGEM®-T easy vector (Promega, Fitchburg, Wisconsin, EEUU) (**Figura 23**), un vector de clonación de doble cadena linealizado que contiene una única timidina (T) 3' terminal en ambos extremos. El residuo sencillo de T en el extremo 3' mejora enormemente la ligación de los productos de PCR (que contienen las terminaciones 3' complementarias de A) al prevenir la re-circularización de la molécula. Además, este vector contiene múltiples sitios de restricción (*poli-linker site*), que permiten el aislamiento del inserto mediante sencillas digestiones enzimáticas. La presencia de resistencia a ampicilina, permitió posteriormente seleccionar las bacterias transformadas con el vector recombinante. Las reacciones se prepararon atendiendo a lo indicado en la **Tabla 8**.



**Figura 23.** Mapa del vector pGEM®-T Easy vector

Se calcularon los ng de inserto necesarios para ligar con 50 ng del vector pGEM®-T easy vector siguiendo la ecuación:

$$ng \text{ del inserto} = [(ng \text{ vector} \times Kb \text{ del inserto}) / Kb \text{ del vector}] \times \text{ratio molar inserto:vector}$$

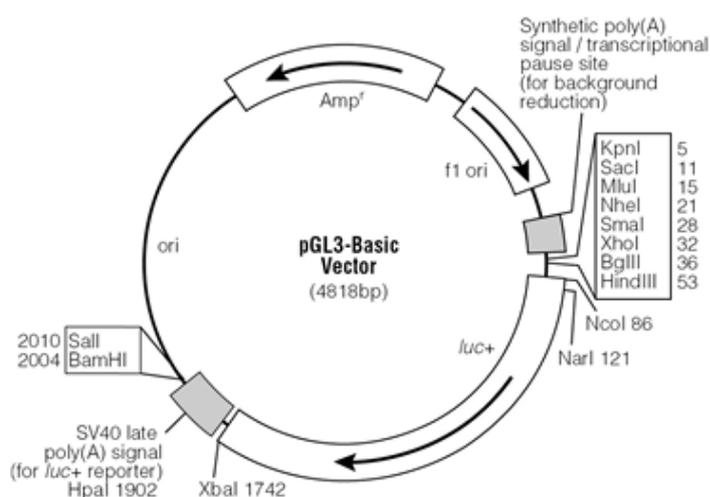
**Tabla 8.** Preparación de la reacción de ligación del inserto silvestre 3'-UTR CALU en pGEM®-T easy vector

Reactivo	Reacción estándar	Control (+)	Control sin inserto
2X Rapid ligation buffer, T4 DNA ligase	5 µL	5 µL	5 µL
pGEM®-T Easy Vector (50 ng)	1 µL	1 µL	1 µL
Producto de PCR ( <i>ng del inserto</i> )	1,2 µL	-	-
Control insert DNA	-	2 µL	-
T4 DNA ligase	1 µL	1 µL	1 µL
Agua libre nucleasas	1,8 µL	1 µL	3 µL
V <sub>F</sub>	10 µL	10 µL	10 µL

V<sub>F</sub>, volumen final preparado

#### 4.2. SUBCLONACIÓN DEL INSERTO 3'-UTR CALU EN pGL3-BASIC

Una vez cortados y purificados el inserto 3'-UTR CALU silvestre y el pGL3-Basic (**Figura 24**) linearizado, se realizó subclonación (p3U-CALUa). El vector de expresión pGL3-Basic es un plásmido que contiene el gen de luciferasa (*luc+*) de luciérnaga, resistencia a ampicilina (*Amp<sup>r</sup>*) y una región poli-linker con múltiples sitios de endonucleasas, entre ellas *HpaI* y *XbaI* (**Figura 24**). En este caso se utilizó la ligasa T4 de Fermentas (Rapid DNA ligation kit, Fermentas, Life technologies, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU) siguiendo las recomendaciones comerciales.



**Figura 24.** Mapa del plásmido de expresión pGL3-Basic (Promega, Fitchburg, Wisconsin, EEUU) utilizado en este trabajo de Tesis.

### 4.3. LIGACIÓN DE DNA

La ligación de fragmentos de DNA se realizó durante aproximadamente 16 h a 4°C. Las cantidades de inserto y de vector presentes en la mezcla de ligación se ajustaron atendiendo a las recomendaciones comerciales (ver apartados 4.1 y 4.2), procurando adicionar en cada caso al menos el doble o triple molar de inserto que de vector (30-50 ng).

## 5. OBTENCIÓN DE LA VARIEDAD POLIMÓRFICA 29809G: MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE LA VARIEDAD SILVESTRE DE 3'-UTR CALU

La variante alélica polimórfica 29809G del polimorfismo 3'-UTR CALU (rs1043550) fue generada mediante mutagénesis dirigida (QuickChange® II-site-directed mutagenesis Kit, Stratagene) realizada sobre la construcción plasmídica p3U-CALUa. La técnica elegida permite realizar mutaciones específicas sobre plásmidos de doble cadena (productos de miniprep) mediante la realización de una PCR y cebadores específicamente diseñados y conteniendo el cambio nucleotídico de interés, eliminando así la necesidad de subclonación y rescate de DNA de cadena simple. Se diseñó cebadores específicos conteniendo el cambio nucleotídico A>G (**Tabla 9**) para desarrollar el ulterior protocolo de mutagénesis dirigida (apartado 5.1).

**Tabla 9.** Cebadores utilizados durante la mutagénesis dirigida de p3U-CALUa

Cebador	Secuencia 5'→3' (sitio de restricción)
<b>Primer 3 output</b>	
<b>Directo, a109g forward</b>	5'- CATGATGAGTTCTGAGCTGCGGAGGAACCCTCAT-3'
<b>Primer 3 output</b>	
<b>Reverso, a109g reverse</b>	5'-ATGAGGGTTCCTCCGCAGCTCAGAACTCATCATG -3'

Se utilizó una DNA polimerasa de alta fidelidad *Pfu* Ultra HF DNA *polimerase* en combinación con los cebadores 'a109g forward' y 'a109g reverse', y la secuencia plasmídica silvestre pU3-CALUa para sintetizar los amplicones que contendrían el cambio nucleotídico (p3U-CALUg).

## 5.1. PREPARACIÓN DE LA REACCIÓN DE MUTAGÉNESIS

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
10X reaction buffer (1X)	5
50 ng pU3-CALUa (producto miniprep)	X
125 ng Cebador a109g F	X
125 ng Cebador a109g R	X
dNTPs	2
DMSO (1,5%)	0,75
Añadir agua ultra-pura hasta	50 $\mu\text{L}$ finales
Añadir PfuUltra HF DNA pol. (2,5U/ $\mu\text{L}$ )	1

U, unidades enzimáticas

## 5.2. PROTOCOLO DE PCR

Fase	Número de ciclos	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo
Inicio	1 ciclo	95	60 s
Desnaturalización		95	50 s
Alineamiento	5 ciclos	60-64	50 s
Extensión/elongación		72-74	13-16 min
Desnaturalización		95	50 s
Alineamiento	16 ciclos	62-66	50 s
Extensión/elongación		72-74	13-16 min
Extensión final	1 ciclo	72-74	13-20 s
Conservación	1	4	$\infty$

Se añadió 0,8  $\mu\text{L}$  PfuUltra HF DNA polimerasa en el ciclo 2/16, para evitar agotamiento de la DNA polimerasa.

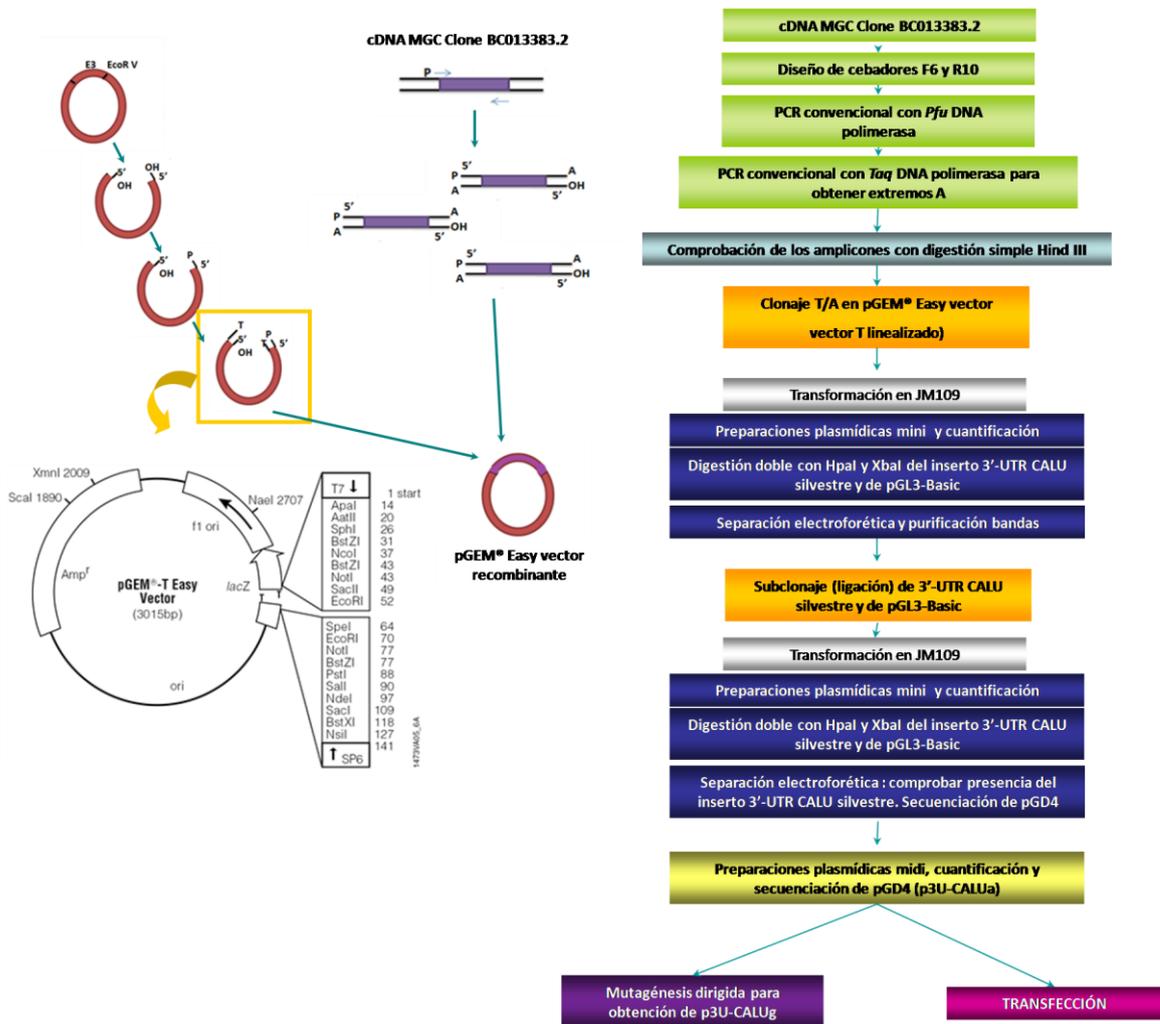
Adicionalmente, se utilizó 10 ng de pWhitescript 4,5-kb *control plasmid* como control y 125 ng de cada uno de los cebadores incluidos en el kit, siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

Posteriormente, como los plásmidos parentales pU3-CALUa (solo 40  $\mu\text{L}$ ) fueron producidos en JM109 (*dam+*) están metilados y fueron degradados mediante una digestión con 1  $\mu\text{L}$  DpnI (10U/ $\mu\text{L}$ ) (digestión específica de DNA parental metilado y hemimetilado). La mezcla se centrifugó en centrifuga de mesa durante 1 min e

inmediatamente se incubó durante 1 h a 37°C en termobloque. Los 10 µL restantes de la mutagénesis se reservaron para comparar con p3U-CALUa la movilidad electroforética en gel de agarosa 1,6%. Los plásmidos polimórficos (p3U-CALUg) se transformaron en JM109 competentes.

## 6. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO GLOBAL

El procedimiento global de clonaje, transformación, mutagénesis y la transfección final en líneas celulares eucariotas se resume en la **Figura 25** incluida a continuación.



**Figura 25.** Esquema del proceso de clonación y subclonación del inserto 3'-UTR CALU utilizado en este trabajo

## **BLOQUE IV. MODELO CELULAR DE CALCIFICACIÓN VASCULAR**

Las técnicas de cultivo celular empleadas en el presente trabajo de Tesis se adecuaron a las recomendaciones básicas y especializadas y las buenas prácticas del cultivo celular recogidas en diferentes guías y libros de texto especializados (Coecke S y cols., 2005; Freshney RI, 2010). El listado y características de las células utilizadas en esta Tesis se detallan en el **Anexo VII**.

Las CMLV fueron una amable cesión de los Doctores José Martínez-González y Cristina Rodríguez del *Hospital de la Santa Creu i Sant Pau* (Barcelona, España). Se obtuvieron de arterias humanas de corazón durante procesos de trasplante cardiaco mediante la adaptación del protocolo previamente publicado por Churchman AT y cols. (Churchman AT y cols., 2009). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional en investigación Humana y atienden a la Declaración de Helsinki y posteriores modificaciones. También las células endoteliales de arteria bovina (BAEC) y las CMLV de ratón (CMLVr) silvestre y transgénico para el gen LOX humano (Orriols M y cols., 2014) fueron cedidas por los Doctores Martínez-González y Rodríguez. Finalmente, las células endoteliales humanas (HUVEC Eahy.926) y hepatocitos (HepG2) fueron una amable contribución del Doctor Constantino Martínez, del Centro de Hemodonación de Murcia y miembro del grupo de investigación liderado por el Dr. Vicente Vicente.

### **1. SIEMBRA INICIAL DE LÍNEAS CELULARES ADHERENTES**

Las condiciones de incubación de las líneas celulares fueron 37°C, 95% humedad relativa (HR), 5% CO<sub>2</sub> (incubador Memmert GmbH, Schwabach, Alemania).

#### **1.1. Gelatinización de superficies de siembra**

Solo en el caso de BAEC fue necesaria la gelatinización de la superficie de siembra. Se utilizó 0,1mL/cm<sup>2</sup> de gelatina bovina al 0.1% preparada en DPBS 1X (Gibco® Life technologies, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU) estéril a 37 °C durante 20 min-16 h. Transcurrido ese tiempo se retiró la gelatina y se lavó el exceso con 2 lavados de DPBS 1X (Gibco® Life technologies, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU). Se dejó en el segundo lavado, antes de añadir las células.

### 1.2. Descongelación de viales preservados

Los viales de células congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  o en nitrógeno líquido se transportaron en baño de hielo y rápidamente se sumergieron en baño termostático a  $37^{\circ}\text{C}$  durante aproximadamente 1-2 min, homogeneizando la distribución del calor con agitación muy suave hasta que los cristales de hielo se han fundido completamente. Se añadieron las células del vial a un tubo de propileno estéril conteniendo unos 9-10 mL de *medio completo* (**Anexo II- epígrafe 3.2.1**) y se centrifugó a 250-290 g, 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, se retiró el medio sobrenadante y se resuspendió el botón celular o pellet en 2-3 mL de medio completo fresco. Las células resuspendidas se transfirieron a la botella de siembra. Se homogeneizó la distribución de las células transferidas mediante la agitación de la botella trazando una cruz. Transcurridas 24 h se examinó el estado del cultivo celular. Dependiendo del tipo celular el tiempo necesario de recuperación tras la descongelación fue variable, pudiendo necesitar 2-3 días para entrar en fase exponencial de crecimiento (fase II). Según se pudo observar, para alcanzar la fase II de cultivo celular se requerían unos 2 días en CE y HepG2, y 4-5 días para CMLV.

### 1.3. Protocolo de tripsinización y bloqueo de la tripsinización

Las monocapas celulares se lavaron con DPBS 1X (Gibco® Life technologies, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU) y se tripsinizaron con 2-3 mL de Tripsina/0,25% EDTA 1X (Gibco® Life technologies, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU) (en botella de siembra de  $75\text{ cm}^2$ ). La reacción de tripsinización se incubó durante 2-5 min a  $37^{\circ}\text{C}$  dependiendo del tipo celular y se controló por microscopia la total disgregación de agrupaciones o clústeres celulares.

El bloqueo de la tripsinización se realizó con la adición de  $\geq 2$  volúmenes de medio completo por cada volumen de tripsina/EDTA 1X utilizada. La mezcla se transfirió a un tubo de propileno estéril tipo Falcon y se centrifugó a 250-290 g, 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ , para descartar el medio sobrenadante y resuspender el pellet celular con 1-3 mL de medio completo donde se efectuó el conteo celular.

### 1.4. Recuento y estimación de la viabilidad celular en hemocitómetro

La viabilidad celular y la determinación de la densidad celular o recuento (número de células/mL) se realizaron paralelamente en los pases y mantenimientos de las líneas celulares.

Un pequeño volumen del pellet resuspendido (p. ej.: 50  $\mu$ L) se tiñó con el mismo volumen del colorante vital azul tripán (1:1) (Tripan Blue 0,4%, Sigma, San Luis, MO, EEUU). Las células vivas se visualizan blancas y brillantes bajo el microscopio óptico invertido con objetivo 10X de contraste de fases (Motic AE2000, Electronic Commerce Organization, S.L.); mientras que las muertas o inviables, debido a alteraciones en las membranas plasmáticas, internalizan el colorante y se ven azules. Se utilizó una cámara cuenta-glóbulos o hemocitómetro tipo Bürker para efectuar el contaje (**Anexo VII**). El porcentaje de viabilidad se estimó según las siguientes ecuaciones:

$$\text{N}^\circ \text{ células viables/mL} = \text{N}^\circ \text{ células vivas/mL contadas en la cámara} \times \text{factor de dilución con el colorante}$$

$$\text{N}^\circ \text{ células totales/mL} = (\text{N}^\circ \text{ células vivas} + \text{muertas}) / \text{mL contadas en la cámara} \times \text{factor de dilución con el colorante}$$

$$\% \text{ viabilidad} = (\text{N}^\circ \text{ células viables/mL}) / (\text{N}^\circ \text{ células totales/mL}) \times 100$$

### 1.5. Pases, mantenimiento y subcultivo de las líneas celulares adherentes

El mantenimiento de las líneas celulares adherentes permite aportar o re-emplazar nutrientes, eliminar productos de desecho y conferir superficie de crecimiento a en caso de necesidad. Para cultivos sub-confluentes (confluencia  $\leq 80\%$ ) el medio se renovó total o parcialmente con *medio completo* (**Anexo II- epígrafe 3.2.1.**) fresco. Para confluencias  $\geq 90\%$  (intentando evitar en la medida de lo posible la confluencia 100%) se procedió al pase del cultivo.

El subcultivo de cultivos primarios de CMLV se realizó generalmente a un ratio 1:2 por lo que el número de pase equivale, generalmente, al número de veces que la población se ha duplicado (valor de duplicación poblacional o PDL del acrónimo en inglés) desde que se inició el cultivo. Tras realizar la tripsinización, bloqueo de la tripsinización y contaje celular se preparó una dilución de células que contenga la densidad celular deseada y se incorporó a la botella o placa de siembra. Como durante la descongelación de células criopreservadas, la distribución de las células transferidas

---

se homogeneizó mediante la agitación de la botella o placa trazando una cruz. Por lo general, se renovaron los medios cada 3-4 días hasta que el cultivo alcanzase la confluencia. El remanente de células pasadas se criopreservó (ver más adelante).

### 1.6. Cálculo del tiempo de duplicación o “doubling time”

En este trabajo de Tesis se calculó el valor del tiempo de duplicación o “doubling time” (DT), para estimar el tiempo requerido por un cultivo para alcanzar el doble de su tamaño. Esta aproximación nos permitió planificar la disponibilidad de células para la realización de los diferentes ensayos:

$$DT = T \ln 2 / \ln (X_e / X_b)$$

Donde T es el tiempo de incubación; X<sub>b</sub>, el número de células sembradas; X<sub>e</sub>, el número de células al final de la incubación.

### 1.7. Detección rutinaria de contaminaciones

Rutinariamente se realizaron exámenes para descartar la presencia de contaminaciones. Estos exámenes incluyeron: 1) identificación de contaminantes por microscopia de contraste de fases (aumentos 10x y 20X) bajo microscopio óptico invertido, 2) reducción del uso de antibióticos, 3) utilización de testigos de medio fresco y medios condicionados, incubación en condiciones habituales y valoración del viraje de pH del rojo fenol contenido en el medio, y 4) detección de micoplasmas por *tinción de Hoechst* (**Anexo VIII**).

## 2. OSTEOINDUCCIÓN DE LA CMLV

El papel de la CMLV durante la calcificación vascular está claramente establecido (Shen J y cols., 2011) y ha sido el tipo celular utilizado en este trabajo de Tesis para el establecimiento de un modelo celular *in vitro* de calcificación vascular. Se utilizaron CMLV en pase 4-8. El protocolo desarrollado se basó en la adaptación de protocolos previamente descritos (Son BK y cols., 2006). La hiperfosfatemia (HPM), a base de fosfatos inorgánicos, es un agente osteoinductor bien caracterizado en la literatura y fue

el agente osteoinductor de elección en este trabajo (*medio osteogénico HPM*, Anexo II- epígrafes 2.13 y 3.2.4).

Se sembraron 30000 células/cm<sup>2</sup> en diferentes formatos de placa multipocillo, en medio completo y condiciones normales de incubación durante 24 h. Se deplecionaron de SBF, mediante la incubación con *medio de arresto* (Anexo II- epígrafe 3.2.3) durante otras 24 h. Transcurrido este tiempo se procedió a la osteoinducción u otros tratamientos (ver más adelante). Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces en triplicados o cuadruplicados (n = 9-12) por condición experimental y a diferentes tiempos de muestreo atendiendo a la finalidad del ensayo.

### 3. OTROS TRATAMIENTOS DE CMLV

Otros elementos se incorporaron al *medio osteogénico* (HPM) Las concentraciones finales se detallan en la **Tabla 10**. La HPM se empleó como control de calcificación y en los condicionamientos experimentales se suplementó con alguno de estos agentes a las concentraciones finales indicadas. Se utilizó la pequeña molécula BAPN como inhibidor específico de las actividades LOX. Además, el 2,2'-dipiridil fue empleado como inhibidor de la actividad PLOD.

Se utilizó la dosis sub-terapéutica más baja de warfarina descrita en la literatura (5 µM) para su utilización en cultivos celulares y se ajustó la concentración de acenocumarol atendiendo a las pautas utilizadas en la práctica clínica de la zona geográfica donde se ha desarrollado el estudio: 2,5 warfarina sódica equivale a 1 de acenocumarol.

**Tabla 10.** Tratamientos adicionados al medio HPM

Reactivo	Concentración stock	Concentración final
Warfarina sódica†	1 mg/mL (3,0 mM)	5 µM
Acenocumarol ‡†	0,5 mg/mL (0,5 mM)	2-5 µM
BAPN†	100 mM	500 µM
2,2'-dipiridil‡	30 mM	300 µM

†, preparado en agua ultra-pura; ‡, preparado en etanol y/o DMSO: agua 1:9; \*, preparado en PBS 1X. Acenocumarol (solubilidad en DMSO 17mg/mL)

La esterilización de los reactivos se realizó por filtración (0,2  $\mu\text{m}$ ). Sólo la warfarina sódica y el acenocumarol se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La warfarina sódica, acenocumarol, BAPN y 2,2'-dipiridil se adquirieron de Sigma-Aldrich (Sigma, San Luis, MO, EEUU).

#### **4. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE LÍNEAS CELULARES VASCULARES**

En el presente trabajo de Tesis se realizó transfección de células animales con diferentes tipos de material genético. Las transfecciones fueron transitorias y se realizaron con diferentes agentes liposomales producidos mediante la mezcla de lípidos catiónicos. Este tipo de transfección, al contrario de la estable, no inserta el material genético en el genoma nuclear, por lo que se pierde cuando la célula entra en mitosis y no requiere de la utilización de medios selectivos. De acuerdo con la finalidad de los experimentos, la expresión transitoria fue suficiente.

Se utilizó placas multipocillo y células entre los pases 4 y 6. Todos los agentes liposomales empleados en la presente Tesis se adquirieron de Invitrogen (Life technologies, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU) y se utilizaron según las recomendaciones del proveedor.

##### **4.1. EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN**

Las eficiencias de transfección de vectores plasmídicos se valoraron mediante co-transfección con pEGFP-C1 (4731 pb) y el control interno de luciferasa. Las eficiencias de transfección de vectores de expresión se realizaron en BAEC, HUVEC EA.hy926, HepG2 y CMLV humanas (**Anexo X**). En el caso de los ensayos miRNA mimic se realizaron transfecciones con diferentes concentraciones del agente de transfección, utilizando las dosis de miRNA recomendadas por la casa comercial.

##### **4.2. ENSAYO DE LUCIFERASA**

Se realizó co-transfección de las construcciones plasmídicas pU3-CALUa o pU3- y el plásmido p-RL Null de 3320 pb (Promega, Fitchburg, Wisconsin, EEUU), para estudiar la funcionalidad del polimorfismo rs1038550 (A29809G) y el efecto de los

miRNA sobre la regulación del 3'-UTR de *CALU*. El plásmido p-RL Null de 3320 pb (Promega, Fitchburg, Wisconsin, EEUU) contiene el gen de la luciferasa de *Renilla reniformis* y se utilizó como control interno de transfección para normalizar las lecturas de luminiscencia. Los complejos de transfección se prepararon en medio OPTIMEM (Gibco® Life technologies, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU). Transcurridas 24-48 h de la transfección, las células eran lisadas con 100 µL/pocillo 3,8cm<sup>2</sup> de tampón PLB (Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Promega, Fitchburg, Wisconsin, EEUU) durante 15 min. Los lisados celulares se centrifugaron en centrifuga de mesa a 13000 g, 1 min, 4°C y se descartó el pellet. Se cuantificó la actividad de las luciferasas (RLU, unidades de luminiscencia relativa) por luminometría (Lumat LB 9507, Berthold Technologies GmbH & Co.KG, Bad Wildbad, Alemania). Para ello, se utilizaron 20 µL de los lisados celulares y se realizó adición secuencial automatizada de 100 µL de los sustratos para cada luciferasa ('*Luciferase Substrate*' y '*Stop&Glo Substrate*', Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Promega, Fitchburg, Wisconsin, EEUU).

Las especificaciones de transfección para cada tipo celular se detallan brevemente en la **Tabla 11**.

#### 4.3. ENSAYOS DE EXPRESIÓN CON miRNA

Se realizó estudio *in silico* en diferentes bases de datos de libre acceso para estudiar los potenciales miRNAs uniéndose a la región 3'-UTR *CALU*. Para ello se introdujo la secuencia de 3'-UTR *CALU* (ENSG 0000012859; NM\_001219.2), el clon cDNA MGC Clone BC013383.2, principalmente en miRBase, TargetScany y Diana Micro-T. Se seleccionó los miRNA de interés y se estudió su efecto sobre las variantes alélicas silvestre y polimórfica de *CALU*. Se realizó co-transfección de los p3U-CALU y los pre-miRpre-miR-132-3p o pre-miR-218\* (-3p). Además de los controles negativos de transfección (para el agente vehiculizante y para la ausencia de transfección), se utilizó un miR-NCT como control negativo de miRNAs, según las recomendaciones del proveedor (Ambion, Life technologies, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU). Las transfecciones se optimizaron principalmente con lipofectamina LTX tanto en BAEC, HUVEC y CMLV. Se siguió el mismo protocolo de transfección que el

descrito en la **Tabla 11** y en los últimos 5 min de incubación del reactivo A se incorporaron los miRNA a una concentración final de 30 nM.

#### 4.4. ENSAYO DE SILENCIAMIENTO DE LOX

Se procedió al silenciamiento de la expresión endógena de *LOX* en CMLV humanas para estudiar el efecto sobre la mineralización de la MEC. Se realizó siembra de 10416 cell/cm<sup>2</sup> CMLV humanas en medio completo fresco sin antibióticos, generalmente en placas de 24 pocillos. Se transfectó 20 nM de siRNA LOX (siGENOME ON-TARGETplus SMARTpool Human LOX, GE Healthcare Dharmacon Inc, Lafayette, CO, EEUU) o 20 nM siRandom (Silencer Select Negative Control#1, Ambion, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA EEUU) por pocillo. Cada reacción de transfección se preparó en 250 µL de medio OPTIMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA EEUU), utilizando 7,5 µL/pocillo de RNAiMAX Reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA EEUU). Los complejos de transfección se incubaron durante 8 h, a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, tras lo cual se arrestaron durante 24 h y se inició el tratamiento osteogénico HPM.

#### 4.5. ENSAYOS miRNA MIMIC

La adición exógena de los miRNA de interés permitió determinar la funcionalidad de los miRNA en el sistema celular completo. Se diseñaron experimentos de corto plazo 48 h para estudiar el efecto de los miRNA-132 y miRNA-218 sobre la expresión génica de sus dianas, la expresión de proteína y la calcificación temprana en condiciones control y en BAEC, HUVEC y CMLV humanas tratadas con medio osteogénico HPM. El protocolo de transfección utilizado se incluye en la **Tabla 12** y es una adaptación de los anteriores.

### 5. ESTUDIO DE VIABILIDAD CELULAR

Se sembraron 6000 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Se ensayó la viabilidad mediante el método del cristal violeta que detecta la presencia de DNA. Tras retirar el medio sobrenadante y lavar con PBS 1X, las células se fijaron y tiñeron simultáneamente con la *solución cristal violeta* (**Anexo II- epígrafe 1.7**) durante 30

min, 15-25°C en oscuridad. Las células teñidas de color púrpura se lavaron y desecaron al aire durante  $\geq 72$ h. Se extrajo el colorante con HCl 0,1N e inmediatamente se valoró la OD a  $\lambda = 620$  nm (NanoQuant infinite M200PRO (Tecan, Männedorf, Suiza). Se asumió el 100% de viabilidad para los pocillos control.

Tabla 11. Especificaciones de transfección según línea celular y agente de lipotransfección.

Línea celular	Células/cm <sup>2</sup>	Agente de transfección	Reactivo A	Reactivo B (μL/rxn)	Mezcla AB
BAEC	26315	Lipofectamina 2000	50 μL OPTIMEM 1,6 μg pU3- CALU 0,032 μg pRL-Null (1:50)  10 min, 25°C	100 μL OPTIMEM 4 μL lipofectamina 2000  25 min, 25° C	Mezclar AB e incubar 20 min (complejos de transfección)  Renovar medios por 800 μL de OPTIMEM + 200 μL complejos de transfección. Incubar 5-6h y renovar por RPMI-1640 sin P/S ni SBF e incubar 24h más a 37°C
	21053	Lipofectamina LTX	200 μL OPTIMEM 1 μL Plus Reagent (1:1 con pDNA incorporado) 1 μg pU3- CALU 0,02 μg pRL-Null (1:50)  15 min, 25° C	Incorporar 2,5 μL lipofectamina LTX  25 min, 25° C	Renovar medios por 800 μL de RPMI-1640 completo sin P/S + 200 μL complejos de transfección (mezcla AB). Incubar 24h y lisar
HUVEC eahy-926	21053-26315	Lipofectamina LTX	200 μL OPTIMEM 1 μL Plus Reagent (1:1 con pDNA incorporado) 1 μg pU3- CALU 0,02 μg pRL-Null (1:50)  15 min, 25° C	Incorporar 3,0 μL lipofectamina LTX  25-30 min, 25° C	Renovar medios por 800 μL de DMEM 4,5g/L glucosa completo sin P/S + 200 μL complejos de transfección (mezcla AB). Incubar 24h-48h y lisar
HepG2	21053	Lipofectamina LTX	200 μL OPTIMEM 1 μL Plus Reagent (1:1 con pDNA incorporado) 1 μg pU3- CALU 0,02 μg pRL-Null (1:50)  15 min, 25° C	Incorporar 2,5 μL lipofectamina LTX  25 min, 25° C	Renovar medios por 800 μL de RPMI-1640 completo sin P/S + 200 μL complejos de transfección (mezcla AB). Incubar 24h y lisar
CMLV	21053	Lipofectamina LTX	100 μL OPTIMEM 0,5 μL Plus Reagent (1:1 con pDNA incorporado) 0,49–0,48 μg pU3- CALU 0,01–0,02 μg pRL-Null (1:25-1:50)  15 min, 25° C	Incorporar 1,25 μL lipofectamina LTX  30 min, 25° C	Renovar medios por 400 μL de RPMI-1640 completo sin P/S + 100 μL complejos de transfección (mezcla AB). Incubar 24h-48h y lisar

**Tabla 12.** Protocolo de transfección para los ensayos *miRNA mimic*

Línea celular	Células/cm <sup>2</sup>	Agente de transfección	Reactivo A	Reactivo B (μL/rxn)	Mezcla AB
BAEC	21053	Lipofectamina LTX	200 μL OPTIMEM 1 μL Plus Reagent (1:1 con pDNA incorporado) 1 μg pU3- CALU 0,02 μg pRL-Null (1:50)  15 min, 25° C En los últimos 5 min incorporar pre-miRNA (30nM finales)	Incorporar 2,5 μL lipofectamina LTX  25 min, 25° C	Renovar medios por 800 μL de RPMI-1640 completo sin P/S + 200 μL complejos de transfección (mezcla AB). Incubar 24h y lisar
HUVEC eahy-926	21053-26315	Lipofectamina LTX	200 μL OPTIMEM 1 μL Plus Reagent (1:1 con pDNA incorporado) 1 μg pU3- CALU 0,02 μg pRL-Null (1:50)  15 min, 25° C En los últimos 5 min incorporar pre-miRNA (30nM finales)	Incorporar 3,0 μL lipofectamina LTX  25-30 min, 25° C	Renovar medios por 800 μL de DMEM 4,5g/L glucosa completo sin P/S + 200 μL complejos de transfección (mezcla AB). Incubar 24h-48h y lisar
CMLV	21053	Lipofectamina LTX	100 μL OPTIMEM 0,5 μL Plus Reagent (1:1 con pDNA incorporado) 0,49–0,48 μg pU3- CALU 0,01–0,02 μg pRL-Null (1:25-1:50)  15 min, 25° C En los últimos 5 min incorporar pre-miRNA (30nM finales)	Incorporar 1,25 μL lipofectamina LTX  30 min, 25° C	Renovar medios por 400 μL de RPMI-1640 completo sin P/S + 100 μL complejos de transfección (mezcla AB). Incubar 24h-48h y lisar

---

## 6. INMUNOCITOQUÍMICA (ICQ) DE MONOCAPAS CELULARES

Se llevó a cabo técnicas inmunocitoquímicas en monocapas celulares tratadas con medio control y medio osteogénico HPM durante 3 y 15 días, para estudiar la localización de calumenina. El protocolo realizado es una adaptación de las técnicas IHQ (Bloque II- epígrafe 3.2) y el previamente descrito por *Guadall A y cols.* (Guadall A y cols., 2011). Las monocapas celulares se fijaron durante 10-12 min con *solución fijadora* (**Anexo II-epígrafe 1.1**) y se lavaron con *PBS IX* (**Anexo II- epígrafe 2.2**). Para la localización específica de calumenina sobre la MEC no se realizó permeabilización celular previa.

Se siguió con la permeabilización (opcional) mediante dos lavados consecutivos con *PBST IX* (**Anexo II- epígrafe 2.3**) durante 2 min. El bloqueo antigénico (*Solución de Bloqueo*, **Anexo II- epígrafe 1.5b**) se realizó durante 30 min a 15-25°C. Seguidamente se preparó el anticuerpo primario, en este caso anti-calumenina se tituló a 1:500, en la *solución diluyente de anticuerpo* (**Anexo II- epígrafe 1.6b**) y se incubó durante 1h a 15-25 °C o toda la noche a 4°C. Se incubó con *solución tamponada de peróxido de hidrógeno* (**Anexo II- epígrafe 1.4**) durante 10 min a 15-25°C para bloquear la peroxidasa endógena. El anticuerpo secundario anti-IgG anti-rabbit (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU) se preparó en la *solución diluyente de anticuerpo* (**Anexo II- epígrafe 1.6b**) a 1:2500 y se incubó durante 30 min, 15-25°C. Finalmente se reveló con DAB mediante incubación de 10 min con unas gotas de DAB (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU): 1 gota DAB Plus Chromogen en 1mL de Tampón del Substrato. La ICQ de células no permeabilizadas no incluyó ningún detergente aniónico en caso alguno.

## 7. CUANTIFICACIÓN DE CALCIO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

Se valoró cuantitativa y semicuantitativamente el contenido en calcio de las monocapas celulares mineralizadas como indicador de funcionalidad del proceso de diferenciación.

## 7.1. VALORACIÓN COLORIMÉTRICA DEL CONTENIDO DE CALCIO EN LA MEC

### 7.1.1. Extracción de calcio de monocapas celulares de CMLV

Se realizó extracción del calcio contenido en las monocapas celulares mineralizadas mediante el tratamiento de las mismas con la *solución descalcificadora* (**Anexo II, epígrafe 1.2.2**) tras consecutivos lavados de la monocapa celular con DPBS 1X (sin  $Mg^{2+}$  ni  $Ca^{2+}$ ). La incubación se realizó durante 24 h a 4°C. Los extractos de calcio se recogieron en tubos tipo Eppendorf y se eliminaron los restos celulares (“debris”) mediante centrifugación en centrifuga de mesa a 10000 g, 3 min, 4°C. Los sobrenadantes colectados se conservaron a -20°C hasta el ulterior análisis en batería. Las monocapas resultantes se lavaron y lisaron para la obtención de proteína total.

### 7.1.2. Método de la *o*-cresoftaleína

La cuantificación colorimétrica de calcio contenido en muestras biológicas, incluyendo los extractos de las monocapas celulares y los productos de descalcificación tisular, se realizó por el método de la *o*-cresoftaleína. El fundamento del método se basa en la formación de un complejo cromogénico de color púrpura ( $\lambda = 575$  nm) que resulta de la unión de la *o*-cresoftaleína complexona con el  $Ca^{2+}$ , en medio alcalino.



El rango de concentración del método utilizado (Calcium detection kit (colorimetric), ab102505, Abcam, Cambridge, Reino Unido) está entre los 0,4-100 mg/dL (0,1-25 mM). Reacciones cruzadas con  $Mg^{2+}$ , son inhibidas por la adición de 8-hidroxiquinolina a la reacción, por lo que es un método específico de valoración de calcio.

El estándar de calcio se encuentra preparado a una concentración de 500 mM. El stock de trabajo se preparó fresco a una concentración de 5 mM para la subsiguiente preparación de estándares 1 mM (2,0  $\mu$ g), 0,8 mM (1,6  $\mu$ g), 0,6 mM (1,2  $\mu$ g), 0,4 mM (0,8  $\mu$ g) y 0,2 mM (0,4  $\mu$ g).

En muestras poco calcificadas se utilizaron 50  $\mu\text{L}$  de extracto sin diluir. Sin embargo, muestras con calcificación muy evidente (días 6-18) se prepararon con  $\leq 10$   $\mu\text{L}$  de muestra completado con agua ultra-pura hasta los 50  $\mu\text{L}$  finales.

Se añadieron secuencialmente el Recativo Cromogénico (90  $\mu\text{L}$ ) y el tampón de ensayo (60  $\mu\text{L}$ ) a la muestra o estándar (50  $\mu\text{L}$  ambos). Se realizó incubación de 10 min a 15-25° C en oscuridad y se midió la densidad óptica a 575 nm en espectrofotómetro NanoQuant infinite M200PRO (Tecan, Männedorf, Suiza).

Las determinaciones se realizaron por duplicado. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de calcio en la muestra ensayada. Los resultados se ajustaron por el contenido en proteína total. La concentración neta de calcio ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) en los extractos se calculó atendiendo a la siguiente ecuación:

$$C = Sa/Sv$$

Donde Sa = muestra ensayada ( $\mu\text{g}$  calcio en la muestra) y Sv = volumen de muestra ( $\mu\text{L}$  de muestra añadida)

## **7.2. VALORACIÓN SEMICUANTITATIVA: TINCIÓN VON KOSSA**

Se adaptó la tinción von Kossa para la detección de depósitos de calcio depositados sobre las monocapas celulares. Se utilizó como colorante de contraste la safranina O (también 3,7-diamino-2,8-dimetil-5fenil-fenaziniumcloro dimetil safranina o rojo básico 2), cargada positivamente y con una afinidad especial por los glicosaminoglicanos (GAG). La safranina O se une a los GAG a través de sus grupos carboxilo y sulfato cargados negativamente, los cuales abundan en la MEC del tejido cartilaginoso del cartílago articular, permitiéndonos valorar la presencia de intermediarios condroblásticos en el modelo de calcificación celular desarrollado en esta Tesis (Kiviranta I y cols., 1985). La captura de imágenes se realizó en una lupa Leica Z6 APO (Leic Microsystems GmbH) a 0,57 aumentos e iluminación inferior. La valoración semicuantitativa del grado de mineralización se realizó con el programa Image J®, por análisis de imagen en escala de grises e imagen binaria.

Las monocapas celulares se fijaron con *solución fijadora* (**Anexo II- epígrafe 1.1**) durante 12-15 min, a 15-25 °C. Posteriormente se incubaron durante 30 min bajo luz UV, a 15-25 °C, con *solución de nitrato de plata* (**Anexo II- epígrafe 1.8**). El reactivo se retiró y se lavó 3-5 veces con agua destilada y se procedió a la eliminación de la plata sin reaccionar mediante la incubación con *solución de tiosulfato de sodio* (**Anexo II- epígrafe 1.9**) durante 5 min, a 15-25 °C. El exceso se eliminó con lavados consecutivos de agua destilada. Finalmente, se contrastó (opcionalmente) con la *solución de safranina* (**Anexo II-epígrafe 1.10**), durante 5 min, a 15-25 °C. El resultado esperado para este procedimiento es: depósitos de calcio, negro/ marrón oscuro; Células, rosa; GAG, rojo-anaranjados.

## **8. ESTUDIO DEL CONTENIDO PROTEICO**

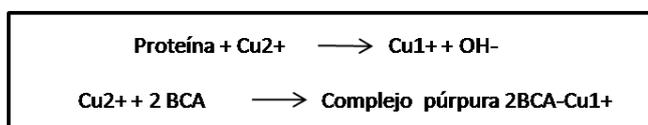
### **8.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL**

Todo el proceso se realizó en baño de hielo, para evitar la degradación de los inhibidores de proteasas con los que se suplementa el tampón de lisis, así como para ralentizar la acción proteolítica inherente de la muestra.

En el presente trabajo de Tesis se combinó la disrupción química y mecánica de las monocapas celulares. Las monocapas celulares se lisaron y homogeneizaron con *tampones de lisis* específicos dependiendo del propósito del ensayo (**Anexo II- epígrafe 2.14**), si bien en esta Tesis se utilizó más ampliamente el *Tampón I* (**Anexo II- epígrafe 2.14**). El tampón siempre se usó pre-enfriado y en baño de hielo. Todos los tampones de lisis fueron suplementados con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM preparado en metanol absoluto y cocktail inhibidor de proteasas para células de mamífero, ambos adquiridos de Sigma-Aldrich (Sigma, San Luis, MO, EEUU). Tras 5 min de incubación en hielo, se procedió a la disrupción mecánica utilizando rascadores (o *scrappers*). Los lisados se recogieron sobre tubos tipo eppendorf y se incubaron durante 30 min en baño de hielo, realizando agitación con vórtex cada 5 min. Finalmente, los lisados se centrifugaron en centrifuga de mesa a 15000 g, 15 min, 4°C. Se descartó el pellet y se conservó el lisado a -20°C o -80°C hasta su utilización.

### **8.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DEL ÁCIDO BICINCONÍNICO**

Se eligió el método colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA) por presentar menos incompatibilidades que otros métodos de valoración proteica, con la composición de los tampones de lisis utilizados en este trabajo (**Anexo II- epígrafe 2.14**). El fundamento se basa en el poder reductor de las proteínas. Los enlaces peptídicos reducen los iones  $\text{Cu}^{2+}$  del  $\text{CuSO}_4$  a  $\text{Cu}^{1+}$  (reacción dependiente de temperatura). El contenido de  $\text{Cu}^{2+}$  reducido es proporcional al contenido de proteína total en la muestra o solución. Posteriormente, 2 moléculas de BCA, que es una sal disódica capaz de acomplejarse con iones  $\text{Cu}^{1+}$ , quelan 1 molécula de  $\text{Cu}^{1+}$  y forman el complejo púrpura con un máximo de absorción a  $\lambda = 562\text{nm}$ , en medio alcalino (reacción de Biuret). La formación del complejo  $2\text{BCA-Cu}^{1+}$  tiene lugar por la presencia de aminoácidos aromáticos (Tirosina Tyr o Triptófano Trp), cistina y cisteína Cys. A la temperatura de incubación de la reacción,  $37^\circ\text{C}$ , los enlaces peptídicos asisten la formación del producto de reacción, incrementando la sensibilidad del ensayo y minimizando las variaciones debidas a una composición no equivalente de aminoácidos. El enfriamiento de la muestra resulta en un incremento de la absorbancia de  $\approx 2,3\%$  cada 10 min.



Se utilizó concentraciones conocidas (0, 10, 30, 50, 75 y 100  $\mu\text{g/mL}$ ) de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma, San Luis, MO, EEUU) como estándar de referencia para la elaboración de la recta patrón. El volumen final por cada reacción fue de 100  $\mu\text{L}$ , de los que 10  $\mu\text{L}$  eran muestra diluida o estándar y los 90  $\mu\text{L}$  restantes *reactivo de trabajo* (19,6  $\mu\text{L}$  A + 0,4  $\mu\text{L}$  B y completar con agua bidestilada) (**Anexo II- epígrafes 1.13 y 1.14**). Las reacciones se incubaron durante 30 min a  $37^\circ\text{C}$  en termobloque y las lecturas colorimétricas se realizaron en espectrofotómetro NanoQuant infinite M200PRO (Tecan, Männedorf, Suiza) a  $\lambda = 562 \text{ nm}$ .

### 8.3. GELES DE POLIACRILAMIDA, ELECTROFORESIS ANALÍTICA, TRANSFERENCIA Y WESTERN BLOT

Se empleó el sistema discontinuo de dos geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) descrito por Laemmli (Laemmli Reino Unido, 1970) en condiciones desnaturalizantes y reductoras para separar electroforéticamente las proteínas según su peso molecular.

### **8.3.1. Preparación de geles de poliacrilamida**

#### **8.3.1.1. Preparación de la muestra**

Se prepararon 10-30  $\mu\text{g}$  de proteína total en *Tampón Laemmli de carga 6X* (**Anexo II- epígrafe 2.10**) a una concentración final de 1X, en un volumen final máximo de 20  $\mu\text{L}$ . Las muestras se incubaron durante 10 min a 100° C antes de ser cargadas en el gel. Se utilizó un marcador de peso molecular pre-teñido de rango 200-4 KDa (SeeBlue Plus, Invitrogen, Life technologies, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU) para calcular el tamaño de las bandas separadas electroforéticamente.

#### **8.3.1.2. Preparación de los geles de poliacrilamida**

Los geles se prepararon generalmente a partir de una disolución de acrilamida/bisacrilamida al 30% (30% Acrilamida/bisacrilamida 37,5:1 Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU). La concentración final o porcentaje de acrilamida/bisacrilamida se determinó atendiendo al tamaño esperado para la proteína de interés (**Anexo X**)

La preparación del gel hacinador o concentrador se realizó rutinariamente al 4%, con una longitud aproximada de 2 cm. El gel separador se preparó en porcentajes variables de acrilamida (**Anexo X** para referir preparación de geles). Los geles se prepararon con un espesor de 1,0 mm y ocasionalmente 1,5 mm con peines de 10 a 15 pocillos, respectivamente. Los cristales encastrados se sumergieron en *tampón de recorrido 1X* (**Anexo II- epígrafe 2.11**)

### **8.3.2. Electroforesis analítica**

La electroforesis se desarrolló en cubetas MiniProtean II y fuente de alimentación PowerPac Basic (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU). El protocolo de electroforesis fue de 30 min a 60 V, seguido de 1 h 40 min a 120 V. La electroforesis finalizó cuando el

frente de avance salió del gel. Una vez finalizada la electroforesis se procedió a la recuperación del gel para someterlo a transferencia y/o tinción.

### 8.3.3. Transferencia de geles de acrilamida

Las proteínas separadas electroforéticamente se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) mediante transferencia semi-seca. La transferencia semi-seca es idónea para la separación de proteínas con rangos de tamaño inferiores o iguales a los 90 KDa. Se utilizaron membranas con tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  (GE Healthcare Amersham Hybond PVDF Membranes, Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU) o 0,2  $\mu\text{m}$  (Immun-Blot® PVDF membrane, 0.2  $\mu\text{m}$  pore size, Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU) para transferir proteínas de  $> 15$  KDa o de  $< 15$  KDa, respectivamente. Las membranas se activaron durante 1 min en metanol absoluto. Se lavaron durante 5 min en agua ultra-pura y finalmente se mantuvieron durante  $\geq 10$  min en *tampón de transferencia IX* (**Anexo II- epígrafe 2.12**) pre-enfriado, al igual que los filtros (Extra Thick Blot Paper, Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU). Los geles se desencastraron de los soportes de vidrio y se equilibraron en tampón de transferencia pre-enfriado durante 1 min a 15-25° C, para retirar el exceso de SDS. El sándwich de filtros, membrana y gel se preparó atendiendo a las especificaciones del aparato de transferencia (SemiDry TransBlot, Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU). La transferencia de dos geles (6 cm x 8,5 cm cada gel/membrana) se realizó a 22V, 1 h utilizando una fuente de alimentación Power Pac HC (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU).

### 8.3.4. Tinción de geles en azul coomasie

Se realizó tinción inespecífica de proteínas con Azul Coomasie. El gel desencastrado se sumergió en una disolución hidroalcohólica filtrada de *azul Coomasie R-250* al 0,05% (**Anexo II- epígrafe 1.11**) e incubó generalmente durante  $\approx 16$  h, 4°C o durante 2 h en agitación a 15-25 °C. Tras el periodo de tinción se realizaron repetidos lavados con una *solución de decoloración* (**Anexo II- epígrafe 1.12**) durante un tiempo total de 15-60 min a temperatura ambiente. Este procedimiento se realizó durante la optimización de SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes y reductoras

### 8.3.5. Western blot y revelado de las membranas

#### 8.3.5.1. *Bloqueo antigénico de membranas*

Las membranas PVDF unen proteínas de forma inespecífica y, dada la naturaleza proteica de los anticuerpos, se requiere de bloqueo antigénico antes de iniciar el *immublotting*. Las membranas transferidas se lavaron 5 min con TBST 1X o PBST 1X y 5 min con TBS 1X o PBS 1X. Posteriormente se bloquearon con diferentes tipos de *solución de bloqueo* (**Anexo II- epígrafe 1.5c**) 1-2 h, 15-25 °C en agitación (150 rpm), dependiendo del anticuerpo primario a incubar.

#### 8.3.5.2. *Western blot*

Los anticuerpos primarios (**Anexo II- epígrafe 5.1**) se incubaron 1 h a 15-25 °C en agitación (150 rpm) o durante ≈16h a 4 °C en agitación (150 rpm). Los anticuerpos secundarios (**Anexo II- epígrafe 5.2**) se incubaron 1 h a 15-25 °C en agitación (150 rpm). Entre incubaciones se realizó protocolo de lavado de: 2 x 5 min TBST 1X o PBST 1X seguidos de 2 x 5 min TBS 1x o PBS 1X (ver preparación de los tampones en **Anexo II- epígrafes 2.2-2.5**).

#### 8.3.5.3. *Revelado de las membranas*

El revelado de las membranas se realizó por método ECL, incubándolas 5 min con la mezcla 1:1 del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y luminol (ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare, Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU). La visualización y captura de imágenes se realizó en fotodocumentador ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU). El análisis densiométrico de las bandas se realizó con el programa informático gratuito Image J®. El contenido de una determinada proteína problema se normalizó por el contenido del control interno de β-actina.

## 9. VALORACIÓN CUALITATIVA DE LA FOSFATASA ALCALINA (ALP)

Adicionalmente se evaluó la localización de ALP en las monocapas celulares mediante una valoración colorimétrica *in situ* de la actividad ALP. El método utilizado combina la utilización de NBT (*Nitro Blue tetrazolium* o nitroazul de tetrazolio) y BCIP (5-bromo-4-cloro-3'-indolfosfato). Por un lado, el NBT es un potente agente oxidante en medio acuoso y su reducción da lugar a la formación de formazán, un compuesto

insoluble en agua y de color azul muy intenso o negro azulado. Por otro lado, la actividad enzimática ALP defosforila el sustrato orgánico fosfatado BCIP liberando bromo-cloro indolil (BCI). La tautomerización y oxidación del BCI por el NBT resulta en la formación del producto 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro indigo White (DDIW), un tinte también insoluble y de intenso color púrpura. El acoplamiento de ambas reacciones permite aumentar la definición y sensibilidad de la técnica.

Las monocapas celulares se fijaron con Metanol absoluto pre-enfriado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , durante 5 min a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El reactivo BCIP/NBT (**Anexo II- epígrafe 1.15**) (Sigma Fast BCIP/NBT Tablets, Sigma, San Luis, MO, EEUU) se incubó durante 10 min,  $15-25^{\circ}\text{C}$ . Los lavados se hicieron con agua ultra-pura.

## 10. VALORACIÓN DEL COLÁGENO SOLUBLE EN SOBRENADANTES CELULARES

El colorante Rojo Picrosirio, se es un colorante de fibras colagénicas. Clásicamente se ha utilizado en asociación con la microscopía de luz polarizada para discernir fibras colagénicas rojas y verdes/amarillas descritas como colágeno tipo I y tipo III, respectivamente. Sin embargo, publicaciones recientes sugieren que la técnica no es capaz de distinguir las fibras de colágeno tipo III de fibras de colágeno tipo I que estén siendo ensambladas. Por ello, en este trabajo de Tesis se valoró la formación *de novo* de colágeno en medios condicionados mediante una adaptación de la tinción Rojo Picrosirio (SIRCOL). Este método no es capaz de discriminar los tipos de colágeno, ya que se une a las secuencias  $[\text{Gly-X-Y}]_n$  de la estructura helicoidal presente en todos los colágenos. En cultivos con  $\geq 3$  días la porción de MEC se torna ácido-insoluble, debido al proceso de estabilización y maduración incipiente.

A 1 mL de muestra (medios condicionados), agua (control negativo) o medio control fresco (blanco) se le añadió 100  $\mu\text{L}$  de Reactivo Neutralizador (Acid Neutralizing Reagent), 200  $\mu\text{L}$  del Reactivo de aislamiento y purificación (Isolation and Concentration Reagent) pre-enfriado y se mezcló por inversión. Tras una incubación de  $\geq 16$  h a  $4^{\circ}\text{C}$ , se centrifugó la muestra a 14000 g, 10 min y se descartó el sobrenadante. El pellet de colágeno se tiñó con 1 mL de Rojo Picrosirio preparado en ácido pícrico (Sircol Dye Reagent), se mezcló por inversión y se incubó durante 30 min a  $15-25^{\circ}\text{C}$ , con vórtex cada 5 min. Para finalizar la precipitación del colágeno, se centrifugó en

centrifuga de mesa a 14000 g, 10 min y se descartó el sobrenadante. El botón de colágeno teñido se lavó suavemente, sin llegar a ser resuspendido, adicionando 750  $\mu$ L de solución de lavado (Acid-Salt Wash Reagent) pre-enfriado en hielo, y se volvió a centrifugar a 14000 g, 10 min y descartar sobrenadante. La valoración se realizó añadiendo 250  $\mu$ L de la solución alcalina (Alkali Reagent) y realizando lecturas colorimétricas en espectrofotómetro NanoQuant infinite M200PRO (Tecan, Männedorf, Suiza) a  $\lambda = 550$  nm.

Los estándares de colágeno (5, 10 y 15  $\mu$ g) a partir del stock (0,5 mg/mL) se prepararon en medio control fresco y se siguió el mismo procedimiento de aislamiento que en las muestras.

Se confirmó la presencia de colágeno en estándares tras su procesamiento mediante separación electroforética en geles SDS-PAGE y tinción Azul de Coomassie.

## 11. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA

### 11.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RNA TOTAL

Se sembraron 26000 CMLV/cm<sup>2</sup> en diferentes formatos (placa de 12 pocillos o de 6 pocillos) y se iniciaron los tratamientos al alcanzar la confluencia. Cada ensayo se repitió, al menos, tres veces con triplicados o cuadruplicados biológicos. Se utilizó una adaptación del método del tiocianato de guanidino-fenol-cloroformo (también AGPC del acrónimo en inglés *Acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*), que utiliza como agente caotrópico las sales de guanidino y la urea.

Las monocapas celulares, en baño de hielo, se solubilizaron y homogeneizaron con 500-700  $\mu$ L/pocillo del reactivo TriReagent®, (Sigma, San Luis, MO, EEUU) en combinación con disrupción mecánica mediante espátula, rascador o *scraper*. El material insoluble de la MEC mineralizada se retiró por centrifugación en centrifuga de mesa a 12000 g, 10 min, 4°C y se recuperó el sobrenadante. Se añadió cloroformo (0,2 veces el volumen de Trizol añadido) y la mezcla se incubó 3 min a 15-25°C, tras lo cual se centrifugó a 12000 g, 15 min, 4°C. Se recuperó la fase acuosa, descartando las fases intermedia (DNA) y orgánica (fenol y proteína), y se adicionó etanol absoluto a un volumen 1,5 veces el volumen de fase acuosa recuperado. La purificación del RNA

total, incluyendo RNAs menores de 200 nucleótidos, se realizó por columnas (miRNeasy Mini kit, Qiagen, Hilden Alemania) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Las centrifugaciones se realizaron a 10000 g, 15s, 15°C. El RNA fue normalmente eluido en 32 µL de agua libre de RNAsas. Los RNA purificados se conservaron a -80°C hasta su utilización.

### 11.2. VALORACIÓN DE LA PUREZA DEL RNA TOTAL

Se utilizaron 1-2 µL de RNA total eluido para la valoración de la concentración y pureza de las muestras (Nanodrop, Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU). Se consideraron los ratios de absorbancia 260/280 y 260/230, que debían ser de 1,7-2,20, para descartar la presencia de contaminantes orgánicos e inorgánicos, respectivamente. Adicionalmente, se confirmó la pureza de los RNA mediante separación electroforética en geles de agarosa 1,6%.

### 11.3. TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT)

Se retrotranscribió entre 100-500 ng RNA total (miScript RT kit, Qiagen, Hilden Alemania) siguiendo las indicaciones de la casa comercial en 20 µL de volumen final (**Tabla 13**). Las condiciones de RT fueron 1 ciclo de 37°C, 60 min en termociclador (Techne TC-412, Bibby Scientific, Staffordshire, Reino Unido)

**Tabla 13. Preparación de la reacción de RT**

Reactivo	RT general
5x miScript HiFlex (µL)	4
10x miScript Nucleics Mix (µL)	2
miScript Reverse Transcriptase Mix (µL)	2
RNA/agua (0,1-0,5 RNA total)	12

### 11.4. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (qPCR)

Se empleó el sistema SYBR Green de qPCR (miScript SYBR Green PCR kit, Qiagen, Hilden Alemania), que incluye una Taq DNA polimerasa Hot start, y los cebadores específicos para cada reacción con *QuantiTect Primer Assay* (**Anexo II-**

**epígrafe 6)** (GeneGlobe, Qiagen, Hilden Alemania). Los cebadores pre-diseñados están confirmados en bases internacionales y son altamente específicos. La longitud de los amplicones resultantes es, por lo general,  $\geq 100$  pb. Se realizaron triplicados técnicos de cada réplica biológica. Las reacciones se prepararon generalmente en placas de 384 pocillos, con un volumen final por pocillo de 5  $\mu\text{L}$  como se indica a continuación:

Reactivo	RNA	miRNA
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix ( $\mu\text{L}$ )	2,5	2,5
10X QuantiTect Primer Assay ( $\mu\text{L}$ )	0,5	0,5
10X miScript Universal Primer ( $\mu\text{L}$ )	-	0,5
Agua ultra-pura libre de RNAsas ( $\mu\text{L}$ )	1,5	1,0
cDNA (0,1-0,5 RNA total) ( $\mu\text{L}$ )	0,5	0,5
$V_F$ ( $\mu\text{L}$ )	5	5

Generalmente, se utilizaron muestras de cDNA diluidas en agua ultra-pura libre de RNAsas y DNAsas a razón de 1/10 y las qPCRs se desarrollaron en Light Cycler LC480 (Roche, Basel, Suiza) siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial (Qiagen, Hilden Alemania) (**Tabla 14**). Los resultados de expresión génica se analizaron por el método del  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ .

**Tabla 14.** Protocolo de qPCR-SYBR Green utilizado en el presente trabajo de tesis.

Fase	Ciclos	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo
Activación inicial	1	95	15 min
Desnaturalización		94	15 s
Alineamiento	40	55	30 s
Extensión		70	30 s
Curva de melting		1 ciclo	

## BLOQUE V. ANALISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Se estudió la normalidad de las variables continuas mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Las variables continuas se expresan como media  $\pm$  desviación estándar o como medianas (rango intercuartílico, RIC) en caso de no seguir una distribución normal. Las variables categóricas se presentan como frecuencias (porcentajes). Las comparaciones entre grupos para variables continuas siguiendo una

---

distribución normal se realizó mediante test t-Student para muestras independientes no apareadas; si las variables continuas no seguían una distribución normal, las comparaciones se realizaron con el test no paramétrico U de Mann-Whitney. Para comparaciones incluyendo más de dos grupos o factores se emplearon tests ANOVA y tests posthoc Tuckey o T3-Dunnet según la equivalencia o no de varianzas valorada por el test de Levene. La comparación de variables discretas se realizó por los test Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) o de Fisher en caso necesario. Los estudios de correlación entre dos o más variables continuas se realizaron utilizando el test de Pearson o de Spearman dependiendo de la normalidad de las variables.

Para el estudio del calcio coronario valorado por TCCM, los valores por encima del 4º cuartil se consideraron puntuación alta de calcio. Se realizó modelo de regresión logística binaria para determinar la asociación entre los factores clínicos, biológicos y demográficos con la presencia de calcio coronario elevado o de lesión coronaria severa. Sólo las variables con valor de  $p < 0,150$  en el análisis univariado fueron incluidas en el modelo multivariado con el que se estudió la asociación entre el genotipo polimórfico (29809G) y el calcio elevado, ajustando por los factores clínicos y demográficos.

Se llevó a cabo el cálculo de curvas ROC (*Receiver-operator characteristic curve*) para estudiar el valor predictivo y discriminador de la adiponectina en el contexto de la calcificación coronaria o de lesiones coronarias severas. El punto con mayor sensibilidad y especificidad en cada caso fue utilizado para determinar los puntos de corte. Además, se calculó el índice de mejora de discriminación integrada (IDI), para estudiar el valor de la adiponectina en un modelo estadístico predictivo para la puntuación de calcio y las lesiones angiográficas.

Se consideró significación estadística para valores de  $p < 0,05$ . El análisis estadístico de los resultados desprendidos del presente trabajo se realizó con el paquete estadístico SPSS 19.0 para Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, EEUU).



---

## **Sección VII. Resultados**



A continuación se describen los resultados derivados del presente trabajo de Tesis Doctoral, atendiendo a los objetivos planteados en la *Sección V*. Los resultados se presentan en 4 grandes bloques.

## **1. RELEVANCIA DEL POLIMORFISMO rs1043550 AFECTANDO LA REGIÓN 3'-UTR DEL GEN CALU Y EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE CALUMENINA EN EL PROCESO DE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR**

### **1.1. IMPACTO CLÍNICO DEL POLIMORFISMO CALU rs1043550**

#### **1.1.1. Impacto clínico del polimorfismo CALU rs1043550 (A29809G) en una población de bajo riesgo sobre el grado de calcificación coronaria**

##### *❖ Descripción de la población de estudio seleccionada*

Se reclutaron prospectivamente 139 pacientes (46,8% varones, edad media 58,5  $\pm$  11,4 años), estables y de bajo riesgo, sin cambios ECG, ni valores circulantes de TnT sugestivos de necrosis cardiaca por infarto agudo de miocardio. Estos pacientes se sometieron a estudio del árbol coronario por TCCM de 64 cortes y angiograma coronario para evidenciar calcio coronario y lesión coronaria que confirmara el posible origen coronario del dolor torácico. Los datos demográficos y clínicos basales de la cohorte se recogen en la **Tabla 15** e incluyen como parte de la caracterización de la población de estudio el genotipo para el SNP CALU rs1043550 (A29809G) así como los valores circulantes de adiponectina de elevado peso molecular y testosterona. Se utilizaron técnicas de electroquimioluminiscencia y enzimoimmunoensayos tipo sándwich para las valoraciones séricas de troponina T ultrasensible, adiponectina y testosterona .

Un 25,5% de los pacientes presentó puntuaciones elevadas de calcio coronario (puntuación Agatston  $\geq$  400 UH) y un 18,7% tenía lesiones coronarias severas (estenosis  $\geq$  70% en una de las arterias principales). Las frecuencias alélicas fueron 0,61 para el alelo A y 0,39 para el alelo G, semejantes a las publicadas previamente por *Hernández-Romero D y cols* (*Hernández-Romero D y cols., 2010*) para una población seleccionada en la misma área geográfica.

Tabla 15. Características basales y demográficas de la cohorte de estudio.

<i>Características basales</i>	<b>Cribado (n = 139)</b>
Edad, media ( $\pm$ DS)	58,5 $\pm$ 11,4
Varones, n (%)	65 (46,8)
Hipertensión, n (%)	102 (73,5)
Diabetes mellitus, n (%)	31 (22,7)
Hipercolesterolemia, n (%)	68 (50,0)
Tabaquismo, n (%)	28 (21,2)
Índice de masa corporal (kg/m <sup>2</sup> ), mediana (RIC)	28,27 (26,0-31,9)
Aclaramiento de creatinina (mL/min), mediana (RIC)	95,98 (77,7-121,4)
HDL (mg/dL), media ( $\pm$ DS)	49,5 $\pm$ 18,6
LDL (mg/dL), media ( $\pm$ DS)	117,6 $\pm$ 37,7
TAG (mg/dL), mediana (RIC)	117,0 (85,5-156,5)
Puntuación de calcio coronario (Agatston), mediana (RIC)	23 (0-197)
Calcio coronario elevado, n (%)	35 (25,20)
Lesiones coronarias severas, n (%)	26 (18,70)
Adiponectina ( $\mu$ g/ml), mediana (RIC)	9,445 (5,441-17,587)
Testosterona (ng/ml), mediana (RIC)	0,97 (0,17-3,28)
Genotipo SNP CALU rs1043550	
Silvestre homocigoto (AA), n (%)	50 (35,50)
Polimórfico homocigoto (GG), n (%)	18 (13,10)
Heterocigoto (AG), n (%)	71 (51,40)

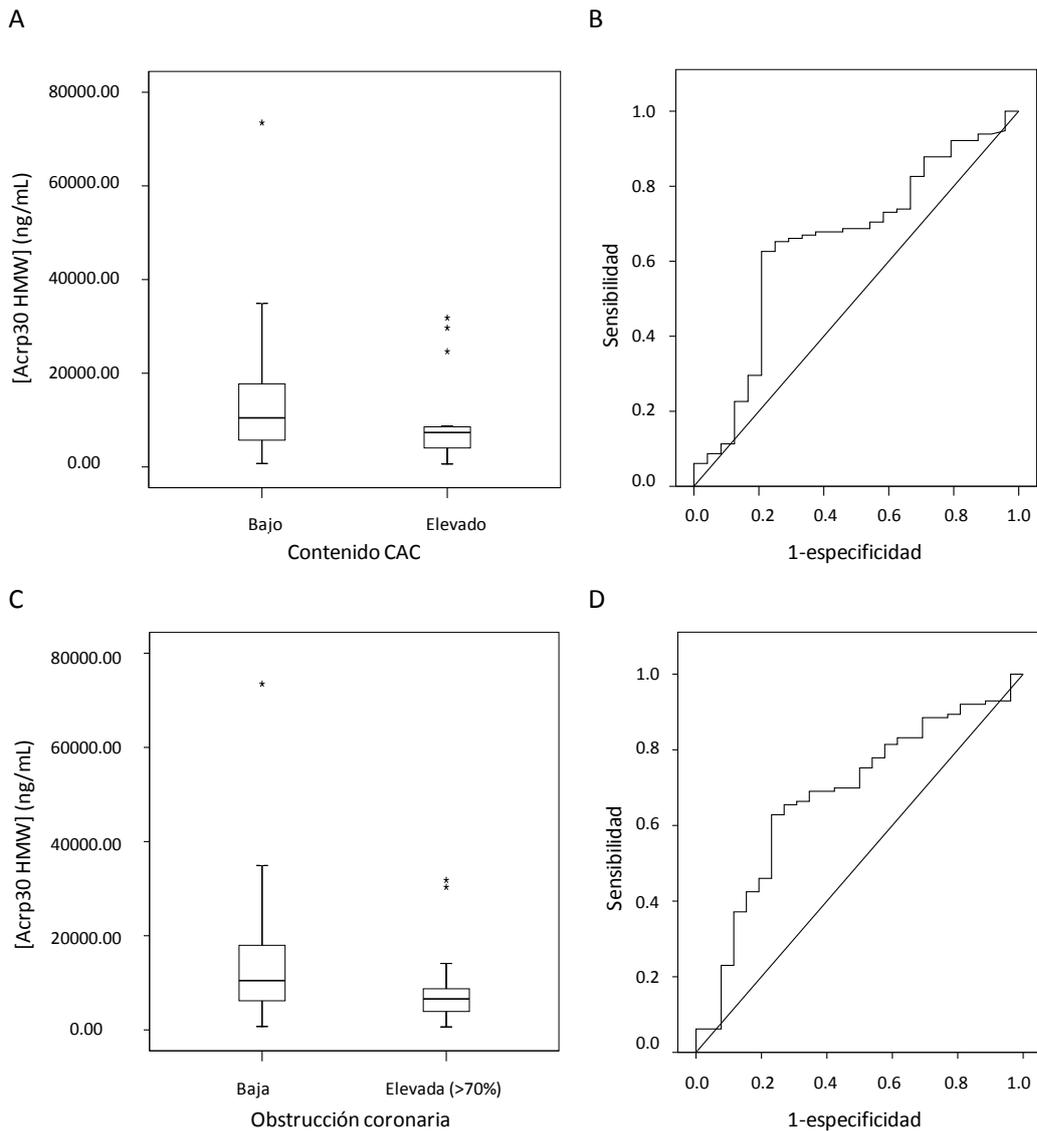
HDL, colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; LDL, colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; TAG, triacilglicéridos; SNP, polimorfismo (del acrónimo en inglés “Single Nucleotide Polymorphism”). Hipertensión, presión arterial sistólica  $\geq$  140 y diastólica  $\geq$  90; Diabetes mellitus, hemoglobina glicosilada  $>$  6,5; Calcio coronario elevado, puntuación Agatston  $\geq$  400 UH; lesiones coronarias severas, obstrucción  $>$  70%. Los valores expresan n (%), media  $\pm$  desviación estándar (DS) o mediana (rango intercuartílico, RIC).

Como parte de la valoración y caracterización de los pacientes reclutados, se realizó determinación de adiponectina de elevado peso molecular y testosterona en muestras de sangre venosa colectadas inmediatamente antes de la realización de la TCCM. Las concentraciones séricas de adiponectina (límite de detección, 0,195 ng/ml; variación interanalítica, 8,60 %) y de testosterona (límite de detección, 0,025 ng/ml; variación interanalítica, 8,40 %) se asociaron con la presencia de calcio coronario y de

---

lesiones coronarias significativas. El cálculo de curvas ROC (del acrónimo en inglés *Receiver Operating Characteristic*) demostró una relación inversamente proporcional entre los valores de adiponectina y la puntuación de Agatston para el contenido de calcio coronario y la obstrucción coronaria. Así, las puntuaciones altas de calcio ( $\geq 400$  UH) se asociaron a valores circulantes bajos de adiponectina de alto peso molecular (**Figura 26 A**), si bien el valor predictivo de ésta fue modesto (estadístico  $c = 0,65$ ; intervalo de confianza del 95% [IC95%], 0,53-0,77;  $p = 0,021$ ), con un valor de corte óptimo de 8,418  $\mu\text{g/ml}$ , un valor predictivo positivo del 31% y un valor predictivo negativo del 93% (**Figura 26 B**). Como era esperable, el análisis univariable mostró una asociación significativa entre el calcio coronario y la edad y diabetes. Sin embargo, tras realizar el análisis multivariante ajustando por las variables de confusión (factores con  $p < 0,15$  en el análisis univariable); la edad, los valores bajos de adiponectina y los de testosterona altos mostraron una asociación independiente con la puntuación de calcificación.

Adicionalmente, bajos valores circulantes de adiponectina (8,005  $\mu\text{g/mL}$ ) se asociaron negativamente con la obstrucción coronaria  $> 70\%$  (**Figura 26 C**) e igualmente predijeron moderadamente la lesión coronaria severa en las curvas ROC (estadístico  $c = 0,68$ ; IC95% 0,57-0,79;  $p = 0,004$ ) (**Figura 26 D**), con un valor de corte óptimo de 8,005  $\mu\text{g/ml}$ , un valor predictivo positivo del 32% y un valor predictivo negativo del 90%. Además de los factores de riesgo aterosclerótico, como el tabaquismo y la diabetes, la concentración elevada de testosterona, el sexo masculino y el calcio coronario elevada mostraron también una asociación significativa con las lesiones coronarias severas en el análisis univariable. Pero sólo adiponectina baja, testosterona elevada y calcio coronario elevado fueron factores predictores de la presencia de lesión coronaria severa tras realizar análisis multivariable (**Tabla 16**). Incluso, tras ajustar por sexo masculino, la testosterona elevada fue predictor independiente de lesión coronaria severa y se correlacionó negativamente con los valores circulantes de adiponectina.



**Figura 26. Asociación de los valores circulantes de adiponectina de elevado peso molecular y la presencia de calcio coronario elevado (> 400 UH) y lesión coronaria severa (con obstrucción superior al 70%).** Valores de adiponectina sérica en pacientes con diferente puntuación Agatston para calcio coronario ( $p = 0,021$ ), A. Curva ROC para calcio coronario elevado, B. Asociación de los valores de adiponectina sérica con lesión coronaria severa (obstrucción > 70% en alguna de las coronarias principales) ( $p = 0,004$ ), C. Curva ROC para los valores de adiponectina sérica y la presencia de lesión coronaria severa. Los datos se representaron en diagramas de cajas y bigotes incluyendo la mediana y el rango intercuartílico, para una representación más fidedigna dada la naturaleza de los datos. En las curvas ROC, las líneas diagonales representan líneas de referencia sobre las que se desvían los datos observados para el ulterior cálculo de áreas bajo la curva y determinación del *estadístico c.* \*, valores fuera de rango u 'outliers'.

**Tabla 16. Asociación de la puntuación de calcificación (análisis de regresión lineal) con las lesiones coronarias graves (estenosis > 70% en una de las arterias coronarias principales; análisis logístico) con manifestaciones clínicas**

Variable	Puntuación de calcificación						Lesiones coronarias graves			
	Análisis univariable			Análisis multivariable			Análisis univariable		Análisis multivariable	
	B	IC 95%	p	B	IC95%	p	OR (IC95%)	p	OR (IC95%)	p
Edad	9,16	2,48 a 15,84	<b>0,008</b>	10,49	3,39 a 17,60	<b>0,004</b>	1,01 (0,97-1,05)	0,567		
Sexo masculino	124,18	-278,99 a 30,63	0,115	9,08	-157,01 a 215,17	0,758	6,59 (2,31-18,75)	<b>0,001</b>	2,77 (0,48-16,15)	0,111
Hipertensión arterial	39,02	-37,29 a 315,34	0,121	7,24	-182,24 a 196,71	0,94	1,70 (0,59-4,90)	0,325		
Diabetes mellitus	213,89	28,66 a 399,11	<b>0,024</b>	130,25	-57,34 a 317,83	0,172	2,68 (1,07-4,73)	<b>0,036</b>	3,71 (0,94-14,67)	0,084
Dislipemia	2,84	-84,68 a 230,36	0,362				1,55 (0,65-3,67)	0,321		
Tabaquismo	43,70	-176,16 a 88,77	0,515				2,29 (1,21-4,32)	<b>0,011</b>	1,74 (0,66-4,45)	0,219
Testosterona cuarto cuartil <sup>a</sup>	47,78	-46,31 a 341,876	0,134	91,31	4,58 a 378,05	<b>0,045</b>	3,60 (1,41-9,20)	<b>0,008</b>	10,44 (2,42-45,05)	<b>0,002</b>
Adiponectina baja <sup>b</sup>	244,25	-396,849 a -91,659	<b>0,002</b>	284,90	-475,58 a -94,21	<b>0,004</b>	4,04 (1,64-9,93)	<b>0,002</b>	6,98 (1,84-26,50)	<b>0,004</b>
Puntuación de calcificación alta <sup>c</sup>							21,00 (7,22-61,11)	<b>0,001</b>	28,67 (7,33-112,19)	<b>0,001</b>

(*Continuación Tabla 16*) Adiponectina baja ( $< 8,418 \mu\text{g/mL}$ ); B: coeficiente sin estandarizar; DLP: dislipemia (colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad  $> 130 \text{ mg/dL}$  o tratamiento hipolipemiente); diabetes mellitus (Hemoglobina glicosilada  $> 6,5\%$ ); Hipertensión arterial (Presión arterial sistólica  $\geq 140$ ; presión arterial diastólica  $\geq 90$ ); IC95%: intervalo de confianza del 95%; OR: *odds ratio*.

<sup>a</sup> El estudio de asociación se realizó incluyendo la concentración de testosterona como variable cualitativa: se comparó el cuarto cuartil con los otros tres en cada sexo. Los valores de adiponectina bajos son una variable cualitativa. El estudio de asociación se realizó comparando los valores superiores e inferiores al de corte para la calcificación ( $< 8,418 \mu\text{g/mL}$ ) o la lesión coronaria grave ( $< 8,005 \mu\text{g/mL}$ ) en cada caso. La puntuación de calcificación alta es una variable cualitativa. El estudio de asociación se realizó comparando los valores superiores e inferiores al punto de corte para una puntuación cuantitativa de calcio elevada ( $\geq 400 \text{ UH}$  en la puntuación Agatston).

Sin embargo, la inclusión de la adiponectina en el índice IDI y los cálculos de la curva ROC no aportó al modelo una mejora estadística para la puntuación de calcio ( $p = 0,061$ ) ni para las lesiones angiográficas graves ( $p = 0,056$ ), aunque en ambos casos se observó una clara tendencia que no llegó a alcanzar la significación estadística.

❖ ***El polimorfismo CALU rs1043550 se asocia con bajos valores de calcio coronario***

En este trabajo de Tesis se seleccionó una cohorte de pacientes ambulatorios y estables, y se ha utilizado un método de valoración del calcio coronario cuantitativo y más preciso (*Agatston AS y cols., 1990*). Para ello, en un análisis de regresión logística multivariante se incluyeron las variables clínicas o factores de riesgo cardiovascular (hipertensión arterial, *diabetes mellitus*, dislipemia, tabaquismo, aclaramiento de creatinina y el índice de masa corporal), demográficas (edad, sexo) y genéticas (genotipado para el polimorfismo *CALU rs1043550 (A29809G)*). Tras ajustar por las variables clínicas y demográficas, únicamente el genotipo silvestre (29809AA), la edad y el sexo masculino se asociaron con un mayor grado de calcificación coronaria [OR: 6,19; 95% CI: 1,07-35,85;  $p = 0,042$ ] [OR: 1,13; 95% CI: 1,01-1,26;  $p = 0,027$ ] [OR: 10,23; 95% CI: 1,57-66,82;  $p = 0,015$ ], respectivamente (**Tabla 17**). Estos datos sugieren, nuevamente, un efecto protector del polimorfismo *CALU rs1043550* frente a la calcificación coronaria.

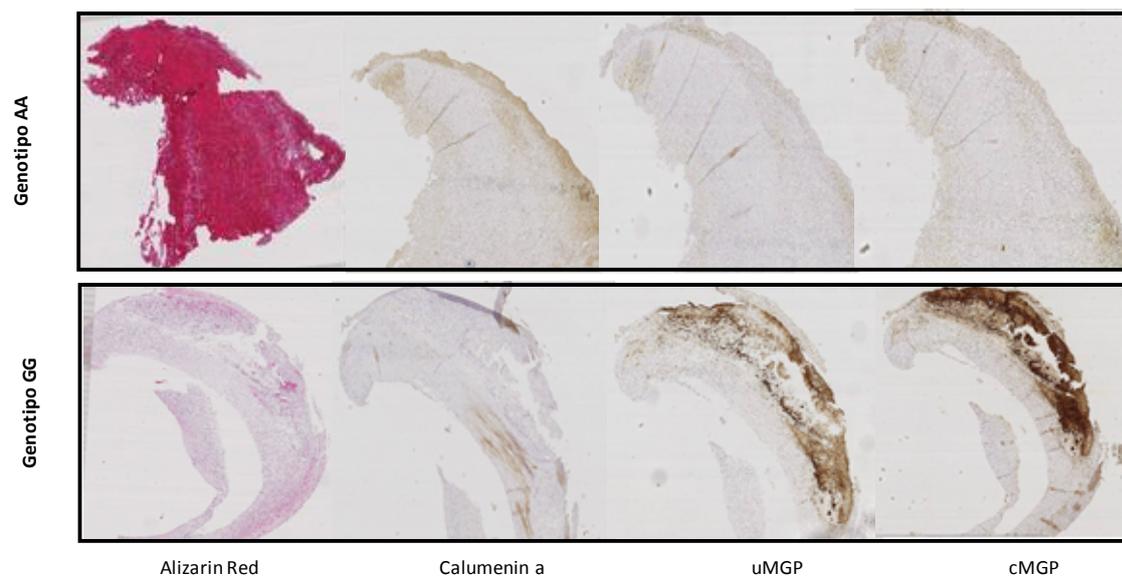
**Tabla 17. Asociación del grado de calcificación elevado con las características clínicas, demográficas y genéticas (Regresión logística).** En negrita se resaltan las variables que, tras el análisis multivariado, demostraron una asociación estadísticamente significativa.

Condición	Grado de calcificación > 4° cuartil			
	B	OR	95% IC	P
<b>CALU 29809 AA vs. G/-</b>	<b>1,82</b>	<b>6,19</b>	<b>1,07-35,85</b>	<b>0,042</b>
<b>Edad</b>	<b>0,12</b>	<b>1,13</b>	<b>1,01-1,26</b>	<b>0,027</b>
<b>Sexo masculino</b>	<b>2,33</b>	<b>10,23</b>	<b>1,57-66,82</b>	<b>0,015</b>
Hipertensión arterial	0,58	1,79	0,31-10,50	0,519
Diabetes mellitus	0,19	1,21	0,22-6,59	0,823
Dislipemia	0,37	1,45	0,33-6,46	0,626
Tabaquismo	0,41	1,50	0,39-5,77	0,554
ACr	0,005	1,00	0,98-1,04	0,765
IMC	-0,027	0,97	0,83-1,14	0,744

IC, intervalo de confianza; OR, odds ratio; P, valor p. ACr: aclaramiento de creatinina; IMC: índice de masa corporal.

### 1.1.2. El polimorfismo rs1043550 se asocia con una menor expresión tisular de calumenina y con la calcificación vascular

Tras el genotipado de los donantes de tejido vascular (muestras calcificadas de arteria femoral o poplítea), las muestras de tejido (n = 6) fueron procesadas mediante técnicas convencionales de histología, para estudiar las diferencias locales en el grado de calcificación vascular, la expresión de calumenina y la de MGP en asociación con el genotipo de *CALU* para el polimorfismo rs1043550 (A29809G). La comparación se realizó entre 3 muestras de donantes ‘AA’ y 3 muestras de donantes ‘GG’. Las muestras de pacientes homocigóticos para el alelo silvestre ‘AA’ mostraron valores residuales de calcio mayores, una mayor expresión de calumenina y una menor expresión o disponibilidad tisular de MGP, en comparación con los homocigotos polimórficos ‘GG’ (**Figura 27**).



**Figura 27.** La variante alélica polimórfica 29809G es funcional y afecta la expresión local de calumenina y la disponibilidad de MGP. Secciones seriadas consecutivas de tejido arterial femoral, procedentes de pacientes homocigotos silvestres (AA) o polimórficos (GG) para el polimorfismo CALU rs1043550 (A29809G), fueron procesadas para inmunohistoquímica de calumenina, uMGP (MGP no gamma-carboxilada), cMGP (MGP gamma-carboxilada) y para la detección de depósitos de calcio residuals mediante tinción Alizarin Red.

## 1.2. FUNCIONALIDAD DEL POLIMORFISMO *CALU* rs1043550 (A29809G) MEDIANTE VECTORES DE EXPRESIÓN DE LUCIFERASA

Para confirmar la funcionalidad del polimorfismo *CALU* rs1043550 se generaron dos constructos plasmídicos conteniendo el gen de luciferasa como gen reportero. La localización del polimorfismo afectando el cambio de nucleótido 29809 A>G se localiza a 4 nucleótidos del codón de finalización de la secuencia codificante o CDS. Por ello los constructos silvestre p3U-CALUa y polimórfico p3U-CALUg se prepararon insertando la región 3'-UTR del gen *CALU* (cDNA BC013383) y una pequeña porción de la secuencia CDS. La secuencia 3'-UTR *CALU* se insertó aguas abajo del gen de la luciferasa del vector de expresión dando lugar al p3U-CALUa (**Figura 28**) que posteriormente fue sometido a mutagénesis dirigida para la obtención de la variedad polimórfica (p3U-CALUg) (para más información ver *Sección V. Materiales y métodos. Bloque III*). Las condiciones y eficiencias de transfección se ensayaron en diferentes líneas celulares incluyendo BAEC, HUVEC, CMLV y HepG2 (ver material suplementario en el **Anexo VIII**). Se seleccionaron HUVEC y CMLV para los ulteriores experimentos, al mostrar unas buenas eficiencias de transfección (**Figura 29** y

**Anexo IX**) y ser los dos tipos celulares mayoritarios residentes en la vasculatura. Así, los constructos plasmídicos se transfectaron en HUVEC y CMLV (**Figura 30**) y paralelamente en BAEC para demostrar la funcionalidad de los constructos plasmídicos en diferentes células (ver material suplementario en el **Anexo IX**).

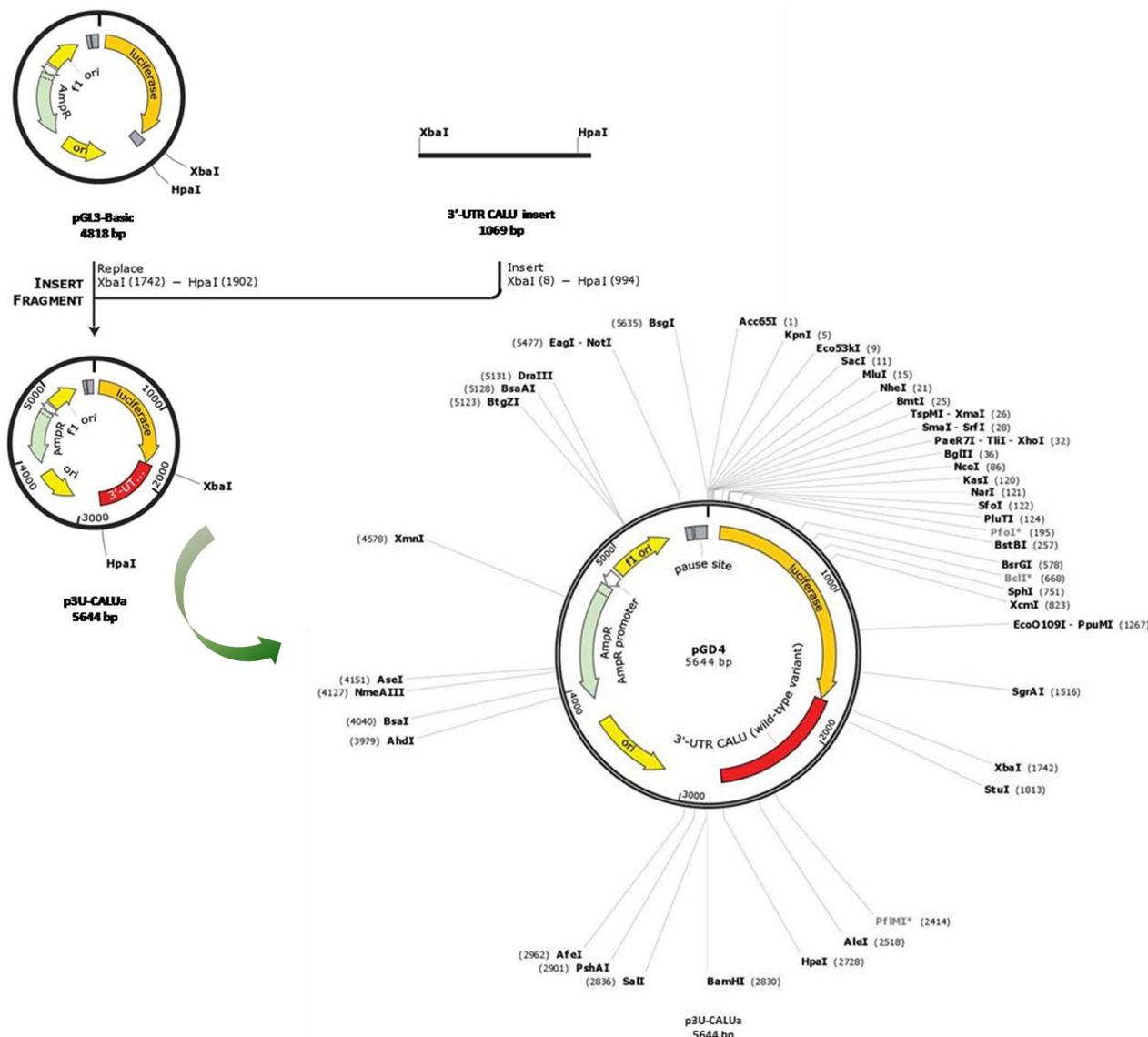
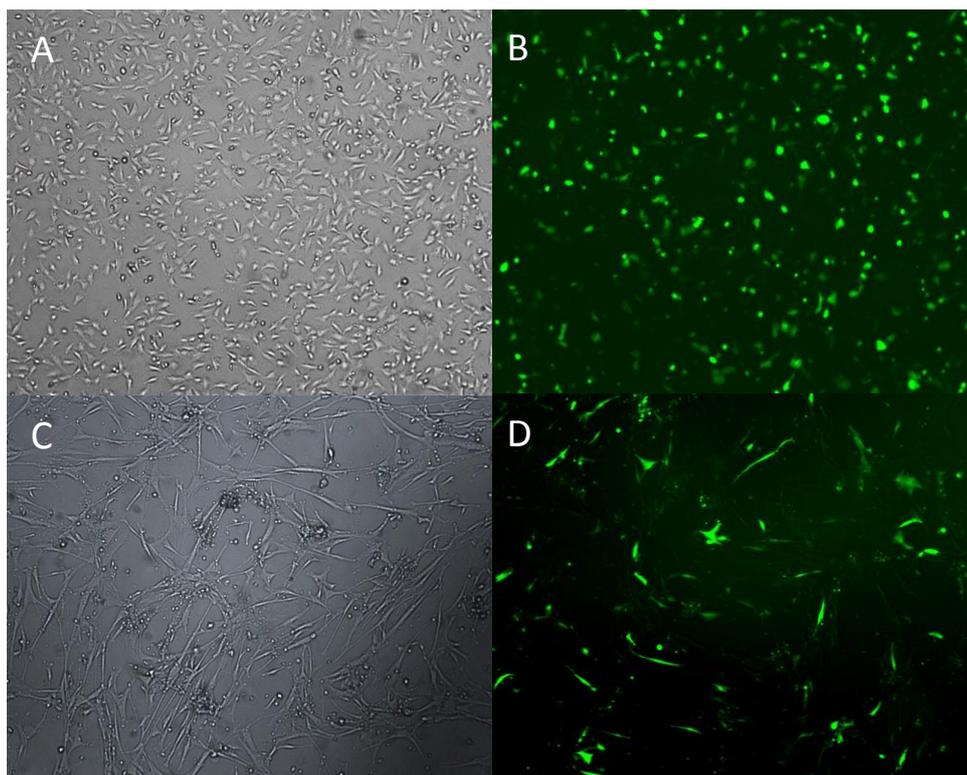
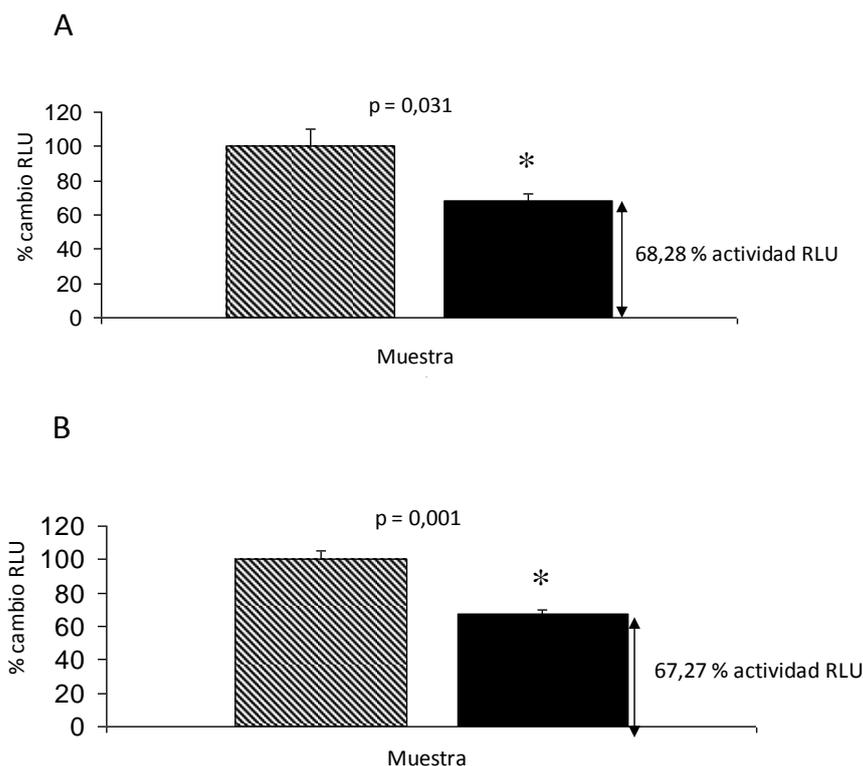


Figura 28. Diseño del plásmido p3U-CALUa. La secuencia silvestre de 3'-UTR *CALU* correspondiente a la secuencia de cDNA BC013383 se insertó en un vector de expresión pGL3-Basic, concretamente en la región plasmídica comprendida entre el sitio de restricción para *XbaI* (1742 pb) y *HpaI* (2728 pb), aguas abajo del gen reportero luciferasa. Imagen obtenida con el software SnapGene® ([www.snapgene.com](http://www.snapgene.com)) y adaptada para el presente trabajo de Tesis.



**Figura 29. Eficiencia de transfección para el método de transfección transitoria.** Los dos tipos celulares mayoritarios vasculares: célula endotelial HUVEC (A, campo claro; B, fluorescencia GFP) y CMLV (C, campo claro; D, fluorescencia GFP), se transfectaron mediante la utilización de pEGFP-c1 y lipofectamina LTX (ver Sección IV Material y Métodos).

La actividad luciferasa de los constructos plasmídicos se redujo en aproximadamente un 32% en ambos tipos celulares: 31,60% ( $51,90 \pm 9,40$  vs.  $35,90 \pm 4,80$  RLU;  $p = 0,031$ ) en HUVEC (**Figura 30 A**) y un 32,08% ( $896,70 \pm 88,90$  vs.  $609,00 \pm 46,70$  RLU;  $p = 0,001$ ) en CMLV (**Figura 30 B**). Estos datos sugieren que la variante alélica polimórfica G29809 (p3U-CALUg), comparado con la variante silvestre A29809 (p3U-CALUa), es capaz de desestabilizar los transcritos de mRNA *CALU*.



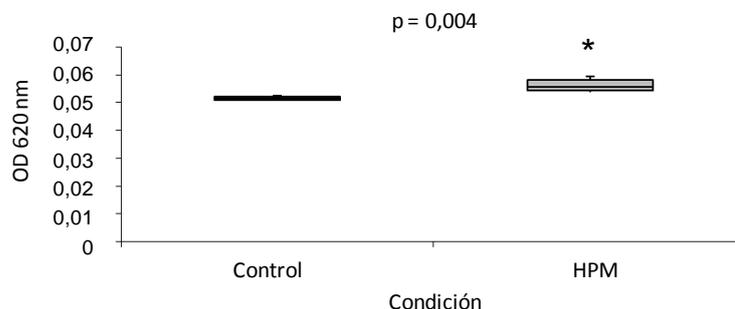
**Figura 30. El polimorfismo *CALU* rs1043550 es funcional y resulta en la producción de transcritos de mRNA *CALU* menos estables.** La variante polimórfica 29809G (p3UCALUg) se asoció con una menor actividad luciferasa en célula endotelial HUVEC (A) y en CMLV (B). Las columnas de líneas diagonales representan células transfectadas con el constructo p3U-CALUa; las columnas negras representan células transfectadas con p3U-CALUg. Cada transfección se repitió tres veces (n = 3) con triplicados o cuadruplicados técnicos. Se utilizó la lectura de *Renilla* para la normalización de los datos. El porcentaje de cambio en las unidades relativas de luminiscencia (RLU) se compararon con las RLU de los constructos silvestres (100% actividad RLU). P, valor-p de significación estadística; \*, significación estadística  $p < 0,05$ .

### 1.3. MODELO CELULAR DE CALCIFICACIÓN EN CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULA DE MÚSCULO LISO VASCULAR HUMANA (CMLVH)

#### 1.3.1. Inducción de mineralización progresiva y diferenciación osteoblástica de la CMLV sometida a hiperfosfatemia (HPM)

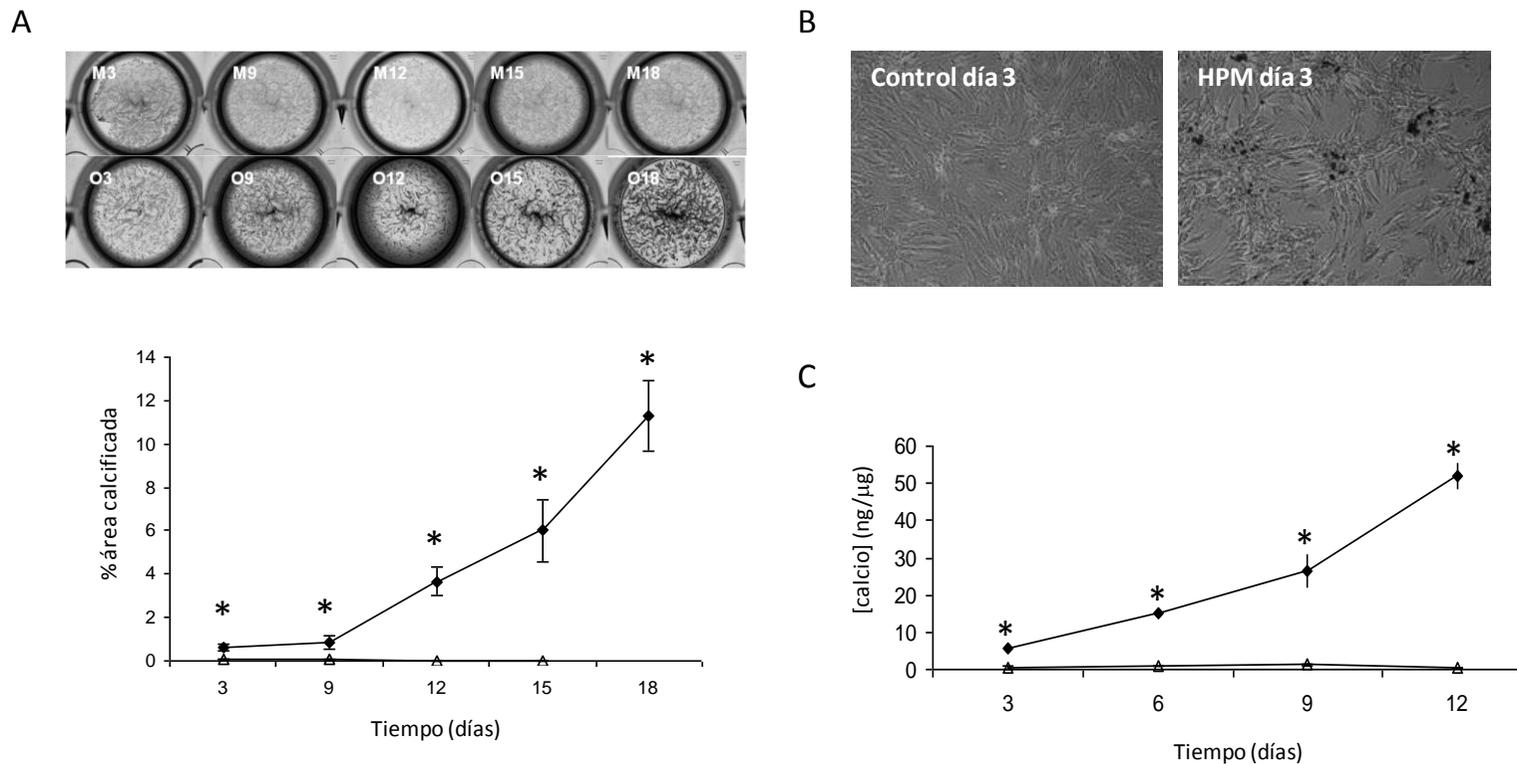
Los resultados del presente trabajo de Tesis sugieren que, al menos a corto plazo, la HPM no indujo muerte celular en el modelo de calcificación de la CMLV (**Figura 31**), por lo que los depósitos minerales observados y evidenciados no resultan

de la apoptosis de la CMLV durante las fases iniciales en este modelo de calcificación vascular *in vitro*.



**Figura 31. La HPM inducida con 2.6 mM de fosfato inorgánico no induce muerte de la CMLV durante etapas iniciales.** La valoración de viabilidad por cristal violeta se realizó tras 3 días después de iniciar el condicionamiento control o HPM. OD, densidad óptica; p, valor-p; asterisco, significación estadística ( $p < 0,05$ )

Se evidenció y confirmó el incremento progresivo y significativo de mineralización mediante tinción von Kossa y análisis de imagen semi-cuantitativo (**Figuras 32 A y B**). Adicionalmente, se obtuvieron extractos de calcio recogidos sobre ácido clorhídrico y se valoraron cuantitativamente mediante el método de la *o*-cresoftaleina. El contenido bruto de calcio ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) fue normalizado por el contenido de proteína total en las monocapas celulares ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) para calcular el contenido neto de calcio en los depósitos minerales ( $\text{ng calcio}/\mu\text{g proteína total}$ ) (**Figura 32 C**). Ambos métodos de valoración y análisis demostraron que HPM induce mineralización progresiva y significativa, si bien la valoración de los extractos de calcio resultó más sensible al mostrar diferencias significativas incluso tras 2-3 días de osteoinducción por HPM ( $5,59 \pm 0,26$  vs.  $0,62 \pm 0,06$ ;  $p=0,001$ ).



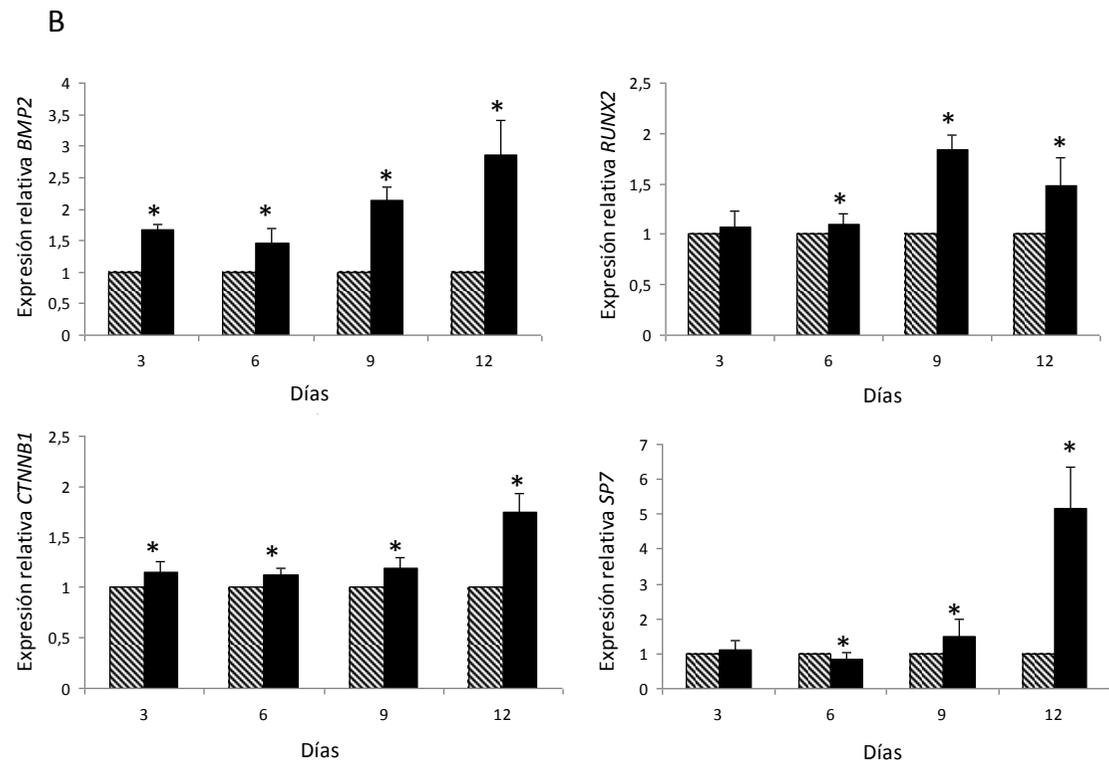
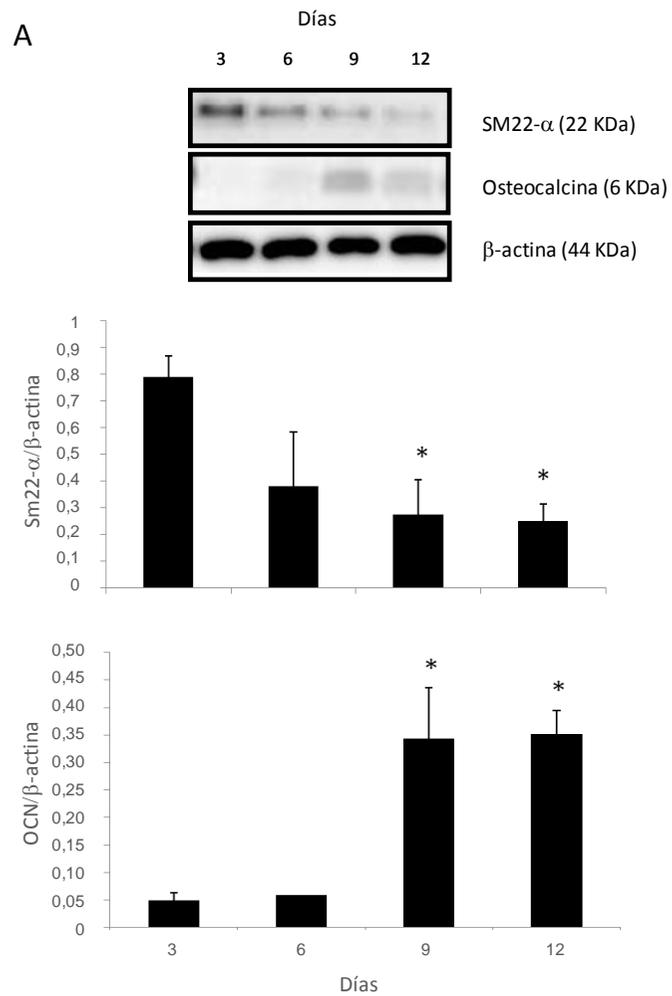
**Figura 32. La HPM induce formación de depósitos minerales en la CMLV.** Análisis semi-cuantitativo de la calcificación progresiva de la CMLV osteoinducida con HPM durante 18 días (O3-O18) comparada con control negativo (M3-M18), mediante tinción von Kossa y análisis de imagen por Image J (A). Los depósitos de calcio se podían identificar incluso tras 3 días de condicionamiento osteogénico HPM (B). La valoración cuantitativa del contenido de calcio en extractos de HCl, mediante el método de la *o*-cresoftaleína, evidenció un incremento progresivo de la calcificación (C). Cada ensayo se realizó, al menos 3 veces (n =3) en triplicados o cuadruplicados técnicos por condición experimental. \*, Significación estadística (p < 0,05)

Adicionalmente se estudió el cambio fenotípico de la CMLV como resultado de la HPM. La diferenciación osteoblástica implica una serie de eventos transcripcionales dependientes de *Runx2/Cbfa1*, el efector aguas abajo de *BMP2* y promotor de la diferenciación osteoblástica a través de la regulación positiva de *Osterix*,  $\beta$ -catenina y osteocalcina (Lian JB y cols., 2006; Komori T. 2010; Cai J y cols. 2012). Por ello, se seleccionaron los genes *BMP2*, *RUNX2*, *SP7* y *CTNNB1* como marcadores de diferenciación osteoblástica. La HPM se asoció con una diferenciación osteoblástica progresiva. La regulación negativa de la expresión de *SM22- $\alpha$*  (marcador de fenotipo de la CMLV contráctil) acompañada de una regulación positiva de osteocalcina (marcador definitivo de fenotipo osteoblástico) temporal-dependiente demuestra tal osteodiferenciación (**Figura 33 A**). Además, se evidenció la activación del programa genético osteoblástico mediante la sobreexpresión génica de *BMP2*, *RUNX2*, *SP7* y *CTNNB1* (**Figura 33 B**).

El modelo propuesto de calcificación vascular en CMLV, sin embargo, fue negativo para la expresión de *ALP* (datos no mostrados), así como para la funcionalidad de *ALP* valorada mediante tinción de monocapas celulares fijadas utilizando el método del NBT/BCIP (**Anexo XI**). La actividad *ALP* genera una hiperfosfatemia local mediante la liberación de fosfato inorgánico a partir de compuestos orgánicos como el PPI o el  $\beta$ -glicerolfosfato utilizado en algunos modelos de diferenciación osteoblástica. Este modelo utiliza directamente formas inorgánicas de fosfato, por lo que la expresión de *ALP* podría ser innecesaria en estas condiciones, o posponerse, al menos durante los puntos temporales estudiados en este trabajo de investigación.

Proteínas de la vía del Wnt (*Wnt3a*, *Wnt5*) regulan la diferenciación celular y la expresión de  $\beta$ -catenina ha sido descrita como un importante factor específico de diferenciación osteogénica durante la calcificación vascular (Beazley KE y cols., 2012). Entre los marcadores del programa de activación osteogénica clásicos, también se incluyó la  $\beta$ -catenina (*CTNNB1*). En este modelo, los valores más elevados de expresión de *CTNNB1* se obtuvieron tras 12 días de condicionamiento con HPM, siendo 1,75 veces la expresión de la condición control ( $p < 0,001$ ). Esta sobreexpresión coincidió con la máxima expresión de *BMP2* (2,87 veces superior,  $p < 0,001$ ) y *SP7* (5,15 veces superior,  $p = 0,037$ ), y una reducción de la expresión de *RUNX2* de 1,84 (día 9,  $p < 0,001$ ) a 1,48 (día 12,  $p = 0,002$ ) (**Figura 33 B**). En el modelo, la expresión progresiva de osteocalcina (**Figura 33 A**) no fue aparentemente dependiente de *CTNNB1*, al menos

durante el inicio de expresión de la misma. Estos resultados son concordantes con otras publicaciones previas que demuestran una inducción de *Osx/SP7* dependiente de  $\beta$ -catenina (*Hruska KA y cols., 2005*) y que, por tanto, debe potenciar la expresión y síntesis de osteocalcina.

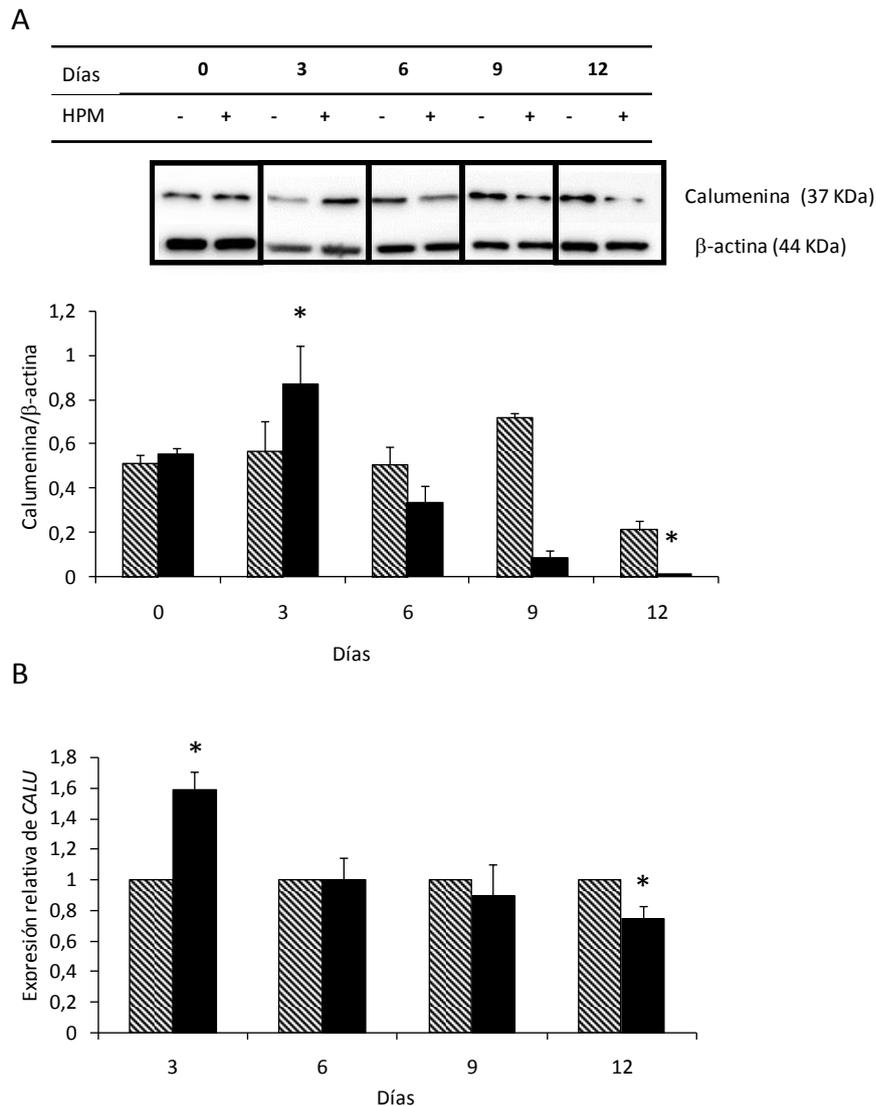


**Figura 33. La HPM induce la diferenciación osteoblástica de la CMLV.** Los marcadores de fenotipo para CMLV (SM22- $\alpha$ ) y de osteoblastos (osteocalcina) se estudiaron por western blot en extractos celulares descalcificados (A). Estudio de la expresión génica de los FEO, incluyendo BMP2, RUNX2 (Runx2/Cbfa1), CTNNB1 ( $\beta$ -catenina), y SP7 (osterix) (B). Cada ensayo se realizó, al menos 3 veces ( $n = 3$ ) en triplicados o cuadruplicados técnicos por condición experimental. Las columnas negras representan la condición experimental HPM; las columnas de líneas diagonales representan la condición experimental control. En los gráficos de barras de la expresión génica de los FEO (B) los asteriscos indican significación estadística ( $p < 0,05$ ) para cada punto (día) entre la condición HPM y la condición control.

### 1.3.2. Análisis del patrón temporal y espacial de expresión de calumenina en asociación con la calcificación *in vitro* de la CMLVh en condiciones de hiperfosfatemia

#### ❖ *La expresión de calumenina está regulada durante la calcificación dependiente de HPM de forma temporal dependiente*

Tras extraer el calcio contenido en los depósitos minerales, las monocapas celulares fueron homogeneizadas adaptando protocolos previamente publicados (*Son BK y cols., 2006*). Estos extractos fueron utilizados para estudiar la síntesis de calumenina. Los puntos temporales evaluados en este trabajo fueron 3, 6, 9 y 12 días. La CMLV calcificante expresó 1,53 veces más calumenina tras 3 días bajo condicionamiento HPM, en comparación con la condición control ( $0,87 \pm 0,26$  vs.  $0,57 \pm 0,13$ ;  $p = 0,015$ ). Esta sobreexpresión se redujo progresivamente en los posteriores días 6, 9 y 12. Tras 12 días la expresión de calumenina en la condición experimental HPM se redujo un 95% ( $0,03 \pm 0,02$  vs.  $0,60 \pm 0,22$ ;  $p = 0,010$ ) (**Figura 34 A**). Además, paralelamente se obtuvieron muestras de RNA total utilizadas para el estudio de la expresión génica de *CALU* mediante el análisis de las expresiones relativas. También *CALU* se sobreexpresó durante las fases tempranas del condicionamiento HPM, siendo  $1,59 \pm 0,11$  veces en el día 3 ( $p = 0,017$ ) y  $0,75 \pm 0,08$  veces en el día 12 ( $p < 0,001$ ) (**Figura 34 B**). Sin embargo, la regulación negativa de *CALU* temporal dependiente no fue tan intensa como la observada para la síntesis de calumenina en los días 6 y 9.

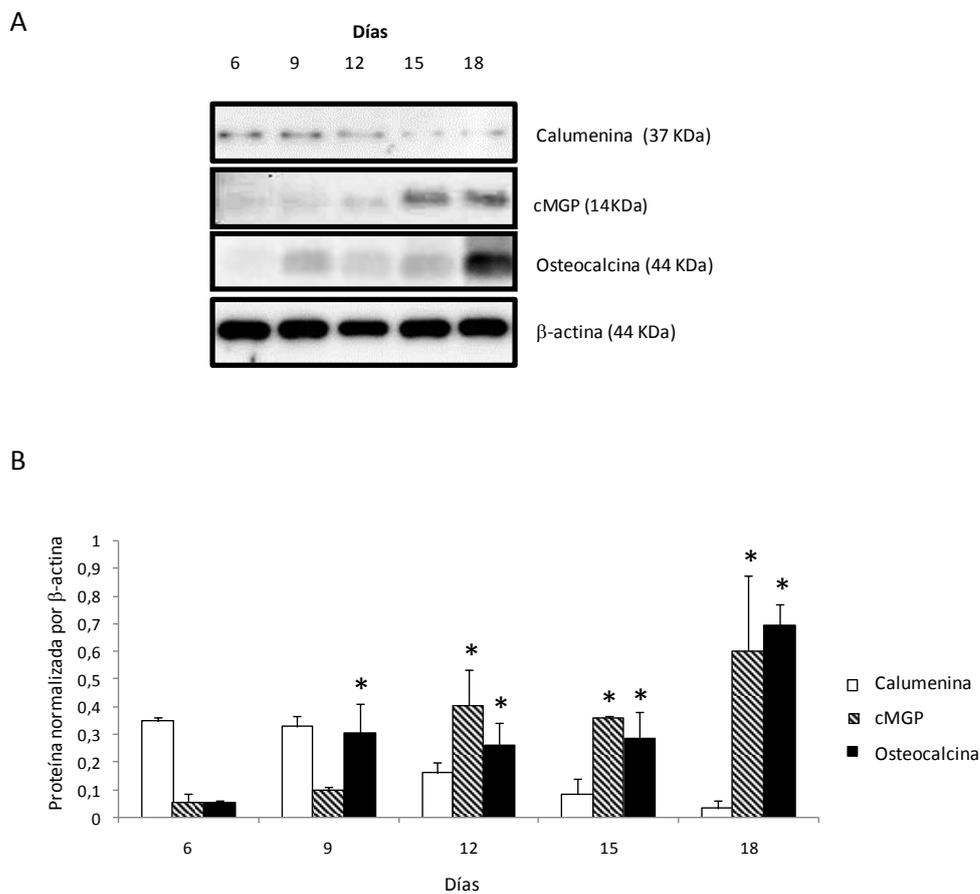


**Figura 34. Regulación temporal dependiente de la expresión de calumenina en células condicionadas con HPM.** La expresión de calumenina se estudió mediante western blot y cuantificación densitométrica de las bandas (A) y mediante expresión de mRNA por qPCR (B). En los gráficos de barras, las barras con líneas diagonales representan la condición control, las barras negras representan la condición experimental HPM. En cada punto temporal (días) se compara la condición experimental HPM con su respectivo control y la significación estadística se indica con \* ( $p < 0,05$ )

❖ *La gamma-carboxilación es dependiente de calumenina y se restaura durante las etapas tardías de la diferenciación de la CMLV en osteoblasto*

Calumenina se ha descrito como el inhibidor fisiológico de la gamma-carboxilación y, por tanto afecta a la activación de las PVKD incluyendo la MGP en la CMLV y la osteocalcina en el osteoblasto. Es por ello que se estudió el efecto de la regulación temporal dependiente de calumenina en el modelo *in vitro* de calcificación

de la CMLV sobre la gamma-carboxilación. Mediante *immunobloting* se observó un progresivo incremento de la expresión de cMGP y osteocalcina en células condicionadas con HPM, en paralelo con la disminución progresiva de calumenina (Figura 35 y Tabla 18). Así pues, a menor calumenina inhibiendo la gamma-carboxilación, mayor mineralización, mayor diferenciación osteoblástica (evidenciada por osteocalcina) y mayores valores de cMGP. Todo ello sugiere, que calumenina regula la actividad de gamma-carboxilación y que la restauración de la misma en fases tardías debe ser necesaria para completar el fenotipo osteoblástico y la maduración de la MEC mineralizada, de forma semejante a la descrita durante la formación fisiológica de hueso.



**Figura 35. La expresión de calumenina durante la calcificación de la CMLV se asocia con la regulación de la gamma-carboxilación además de la diferenciación osteoblástica.** La expresión de calumenina (barras blancas), cMGP (barras líneas diagonales) y osteocalcina (barras negras) fue valorada mediante Western blot en extractos celulares condicionados con HPM y previamente descalcificados. Cada punto temporal ha sido comparado con la expresión observada en el día 6 (significación estadística expresada como \*) y con el punto temporal inmediatamente anterior (significación estadística expresada como \*)

como †). Ver Tabla 4 para información numérica. Los experimentos se realizaron tres veces en triplicados para cada condición (n = 9) y punto temporal. Significancia estadística,  $p < 0,05$

**Tabla 18. Expresión de Calumenina, cMGP y osteocalcina en CMLV osteoinducida (HPM).** Resultados numéricos del análisis densitométrico de los Western blot.

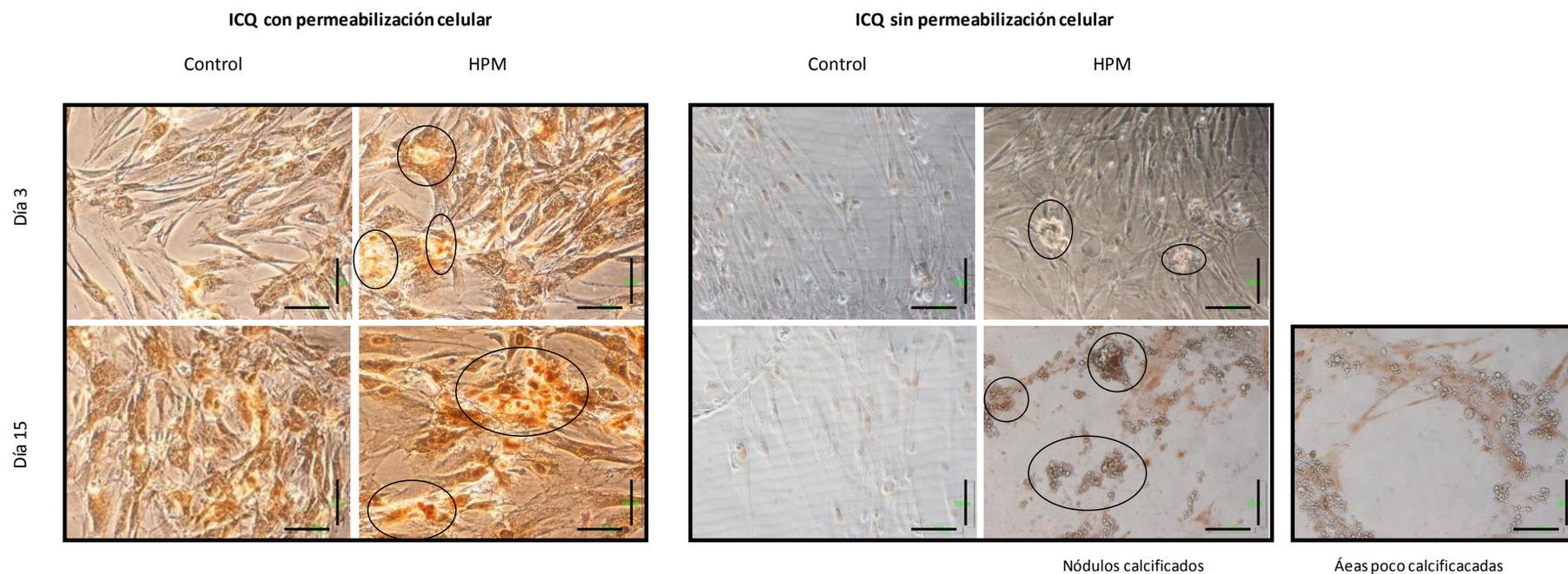
	Día 6	Día 9	Día 12	Día 15	Día 18
<b>Calumenina</b>					
Media $\pm$ DS	0,35 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,04	0,16 $\pm$ 0,04	0,09 $\pm$ 0,06	0,03 $\pm$ 0,03
Valor-p*		0,477	<b>0,003</b>	<b>0,004</b>	<b>&lt;0,001</b>
Valor-p‡		0,477	<b>0,046</b>	0,247	0,373
<b>cMGP</b>					
Media $\pm$ DS	0,06 $\pm$ 0,03	0,10 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,13	0,36 $\pm$ 0,01	0,61 $\pm$ 0,27
Valor-p*		0,094	<b>0,017</b>	<b>0,001</b>	<b>0,026</b>
Valor-p‡		0,094	<b>0,022</b>	0,678	0,314
<b>Osteocalcina</b>					
Media $\pm$ DS	0,05 $\pm$ 0,01	0,30 $\pm$ 0,11	0,26 $\pm$ 0,09	0,29 $\pm$ 0,10	0,69 $\pm$ 0,08
Valor-p*		<b>0,003</b>	<b>0,003</b>	<b>0,005</b>	<b>&lt;0,001</b>
Valor-p‡		<b>0,003</b>	0,544	0,731	<b>0,017</b>

Cada punto temporal ha sido comparado con la expresión reportada en el día 6 (significación estadística expresada como \*) y con el punto temporal inmediatamente anterior (significación estadística expresada como ‡). DS, desviación estándar; p, valor p de probabilidad o significancia estadística. Significancia estadística,  $p < 0,05$

❖ *La diferenciación osteoblástica de la CMLV dependiente de HPM debe activar las vías secretoras de la calumenina: regulación espacial de calumenina*

Se han descrito vías secretoras de la calumenina de función desconocida y, además, calumenina contiene dominios de unión a calcio, por lo que podría participar en la estabilización de la matriz mineralizada. Por ello, se estudió por inmunocitoquímica la presencia de calumenina en las monocapas celulares sin descalcificar y así evitar retirar la calumenina unida a los depósitos de calcio. Se observó una mayor intensidad de calumenina en CMLV tratadas con HPM en el día 15 (**Figura 36, ICQ con permeabilización celular**). Adicionalmente, se realizó inmunocitoquímica sin permeabilización de membranas para detectar específicamente si la secreción de calumenina resultaba en una acumulación de la misma sobre la MEC mineralizada. Se

comparó la acumulación de calumenina en estadios tempranos de calcificación de la CMLV (día 3) y tardíos (día 15). Calumenina fue principalmente detectada en áreas mineralizadas, siendo mayor cuanto mayor era el grado de mineralización (**Figura 36**, *ICQ sin permeabilización celular*).



**Figura 36. Calumenina se secreta durante la calcificación de la CMLV y se deposita sobre la MEC mineralizada y la superficie celular en estados tardíos.** Las figuras muestran la inmunodetección positiva de calumenina como depósitos color marrón, en monocapas celulares de CMLV con y sin permeabilización de membrana. El análisis se realizó tras 3 y 15 días de condicionamiento HPM, para comparar fases tempranas con tardías, respectivamente. La inmunodetección de calumenina se co-localiza con los depósitos de calcio; las mineralizaciones positivas para calumenina más evidentes *de visu* se han delimitado dentro de círculos. Cada ensayo se realizó 3 veces en cuadruplicados ( $n = 12$ ) para ICQ con permeabilización y dos veces en cuadruplicados para ICQ sin permeabilización ( $n = 8$ ). Las imágenes fueron capturadas usando objetivo 20X. Las barras equivalen a 100  $\mu\text{m}$ .

### 1.3.3. Modelo de acción de calumenina en la calcificación vascular propuesto

La hiperfosfatemia induce una rápida sobreexpresión de calumenina durante las etapas iniciales de calcificación, como indica su co-expresión con *BMP2* (marcador más temprano de diferenciación osteo/condroblástica). Calumenina sobreexpresada reprime la actividad GCCX y, por tanto, la gamma-carboxilación de las PVKD, incluida la MGP. MGP es sintetizada por la CMLV, entre otros tipos celulares, y sólo su forma carboxilada (cMGP) inhibe eficientemente el crecimiento de cristales de hidroxiapatita y la actividad BMP-2. Una vez iniciada la diferenciación osteoblástica de la CMLV, los valores intracelulares de calumenina se reducen como resultado de una pequeña reducción de la expresión génica y de la activación de vías secretoras de la calumenina. Esta reducción de los valores de calumenina permite la restauración de la gamma-carboxilación, en paralelo con la progresiva sobreexpresión génica de *RUNX2*, *CTNNB1* y *SP7*, así como del marcador fenotípico osteoblástico osteocalcina. En la CMLV fenotípicamente osteoblástica, la restauración de la gamma-carboxilación debe facilitar la activación de osteocalcina, en pro de la maduración de la MEC mineralizada. Las formas gamma-carboxiladas de osteocalcina han demostrado ser necesarias para la estabilización de la MEC mineralizada producida por el osteoblasto incluso co-expresando cMGP. Por tanto, en el territorio vascular ‘osificado’ la cMGP no debe ejercer más como inhibidor fisiológico de la calcificación en los estadios tardíos. A partir de ese momento, *SP7* y *CTNNB1* se sobreexpresan mucho más retroalimentando positivamente la expresión de osteocalcina y la mineralización (**Figura 37**).

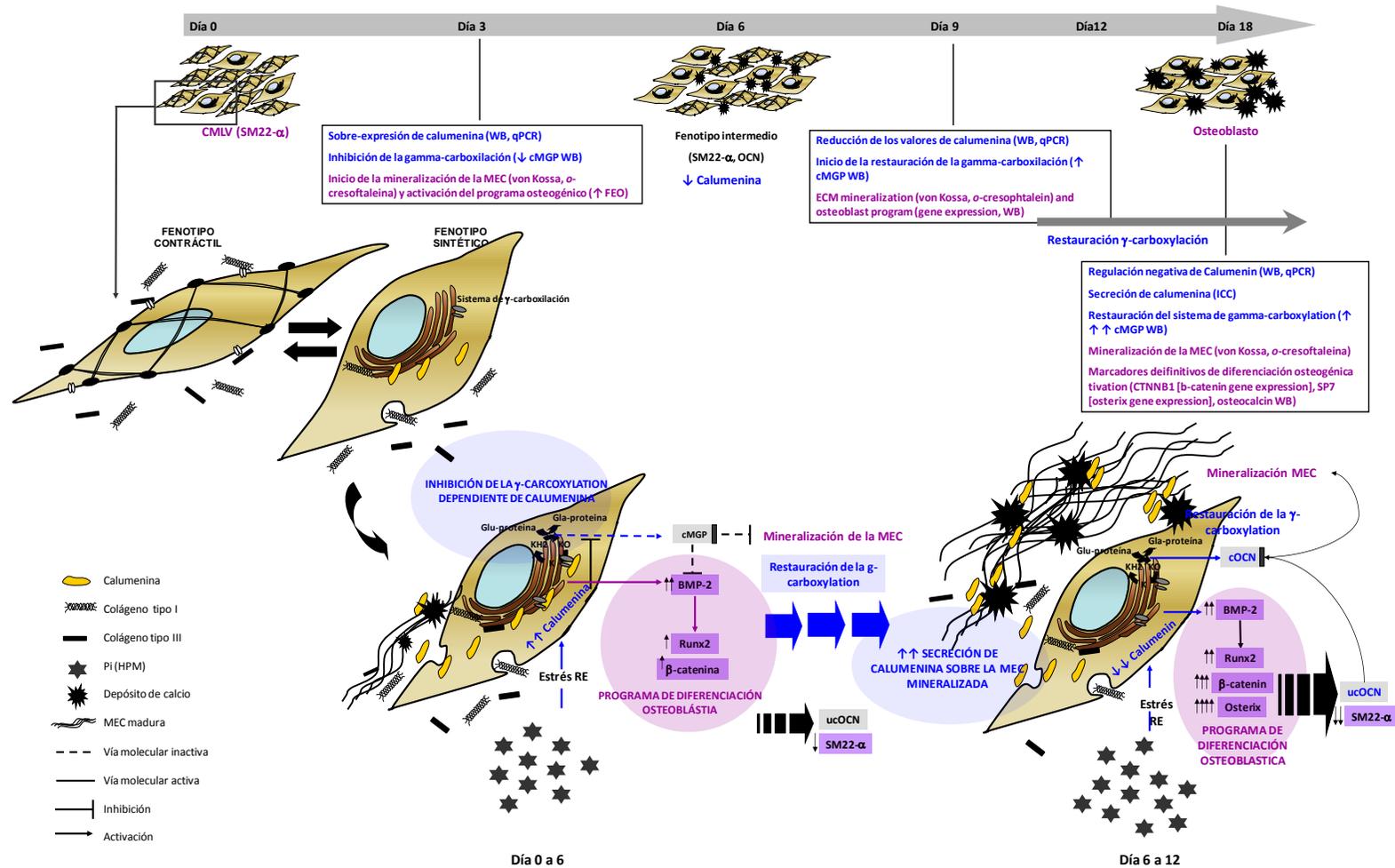


Figura 37. Modelo propuesto para la función de Calumenina en la calcificación vascular.

## 2. REGULACIÓN EPIGENÉTICA POR miRNAs DE LA EXPRESIÓN DE CALUMENINA EN LA CMLV

### 2.1. IDENTIFICACIÓN *IN SILICO* DE miRNAs CON DIANA PREDICHA EN LA SECUENCIA 3'-UTR DEL GEN *CALU*

En este trabajo se realizaron predicciones *in silico* bioinformáticas mediante la utilización de las herramientas en línea PITA, Diana microT, TargetScan y miRWalk 2.0. Los resultados de la búsqueda bioinformática predijeron, al menos, la unión de 29 miRNAs en la secuencia 3'-UTR de *CALU* introducida en las construcciones plasmídicas (p3U-CALUa y p3U-CALUg) y basada en la secuencia de la variante 2 o isoforma b del mRNA *CALU* (BC013383) (Locus NM\_001130674, UCSC Genome Bioinformatics). La posterior revisión bibliográfica de las dianas descritas para los potenciales miRNA regulando la expresión de *CALU* hizo que se seleccionaran los miR-132 y miR-218 para este trabajo.

Todos los sistemas empleados, predijeron la unión de miR-132 a la región 3'UTR de *CALU*. Sin embargo, sólo Diana microT y PITA fueron capaces de predecir la unión de hsa-miR-218 en la región 3'UTR de *CALU* (**Figura 38 A-C**). Además, se realizó el análisis computacional introduciendo específicamente las secuencias del mRNA *CALU* (incluyendo 5'UTR, CDS y 3'-UTR) y de los miRNA elegidos (miR-132-3p y miR-218-5p). Para ello se utilizó el sistema PITA que predijo 12 sitios de unión de miR-132 en el mRNA *CALU* con una energía global de -7,75, mientras que para miR-218-5p se predijeron 4 sitios de unión con una energía global de unión de -6,20 (**Figura 38 D**).

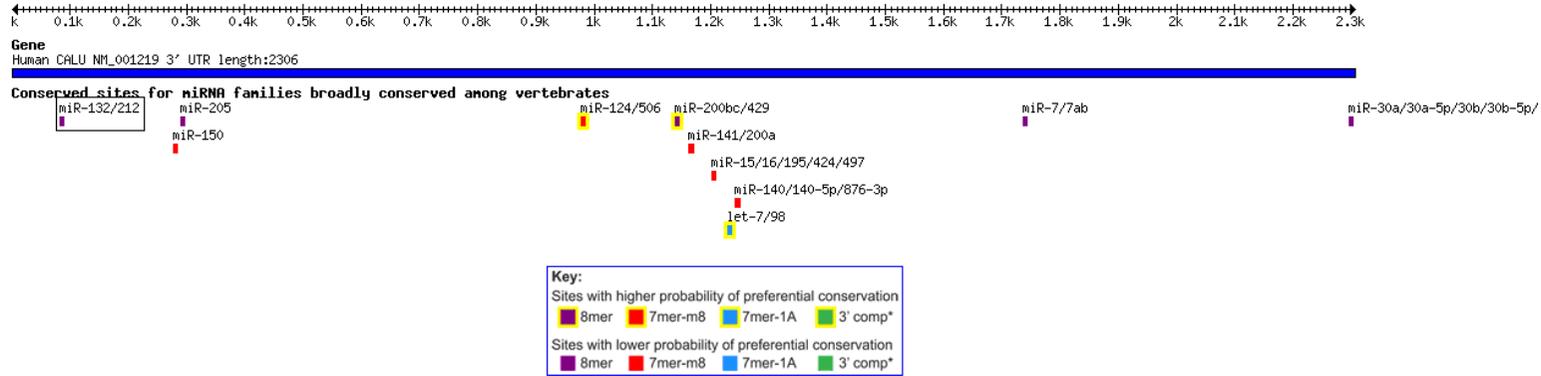
De acuerdo con los programas informáticos utilizados, hsa-miR-132-3p debería unirse con mayor probabilidad en las posiciones 274 (localizada dentro de la región CDS) y 1079 (localizada en la región 3'-UTR) de la secuencia de mRNA *CALU* BC013383. Únicamente la segunda predicción podía ser estudiada en las construcciones plasmídicas p3U-CALUa y p3U-CALUg. La posición 154 de la secuencia insertada en las construcciones plasmídicas, a 77 pb del sitio de cambio nucleotídico descrito para el polimorfismo rs1089950, sería la diana de hsa-miR-132-3p. Esta predicción debiera ser más favorable que la más energética ( $\Delta\Delta G = -7,39$ ; 8:0:0 versus  $\Delta\Delta G = -8,09$ ; 8:1:1), dada la ausencia de *mistaches* y de *bundles*. Del mismo modo, el sitio de unión más

---

energético predicho para hsa-miR-218-5p en la secuencia de *CALU* se localizó en la región 3'-UTR, en la posición 1669 de la secuencia de mRNA *CALU* BC013383, muy próximo a un sitio de unión poco energético de hsa-miR-132-3p (1649 pb;  $\Delta\Delta G = -0,95$ ; 8:1:0). El tamaño de la secuencia de unión del miR-218 a la región 3'-UTR de *CALU* fue también de 8-mer y ausente de *mismatches* y *bundles*, con una energía libre de unión de -7,65 (1669 pb;  $\Delta\Delta G = -7,65$ ; 8:0:0).

A

Human CALU 3' UTR



Conserved

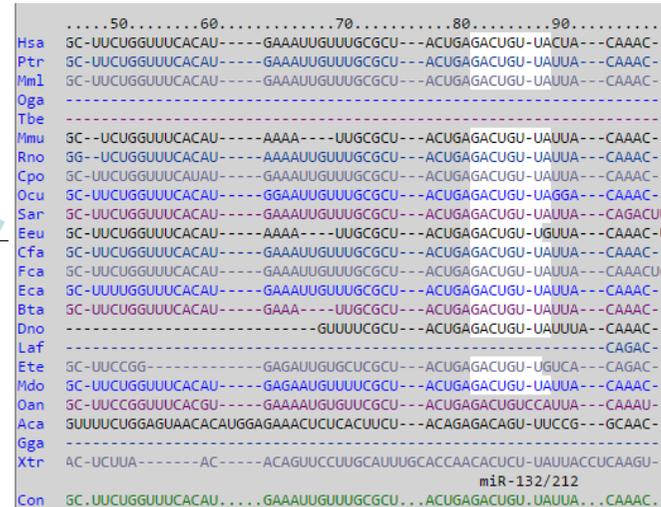
	predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	seed match	site-type contri- bution	3' pairing contri- bution	local AU contri- bution	position contri- bution	context score	context score percentile	conserved branch length	P <sub>CT</sub>
Position 82-88 of CALU 3' UTR	5' ...UGUUUGCGUACUGAGACUGUUA... hsa-miR-132 3' GCUUGUACCGACAUUCUGACAAU	8mer	-0.310	0.001	-0.057	-0.056	-0.42	97	1.441	0.57
Position 82-88 of CALU 3' UTR	5' ...UGUUUGCGUACUGA-GACUGUUA... hsa-miR-212 3' CCGGACUGACCUUCUGACAAU	8mer	-0.310	-0.001	-0.057	-0.056	-0.42	97	1.441	0.57

Context score and features that contribute to the context score are evaluated as in Grimson et al., 2007. Conserved branch lengths and P<sub>CT</sub> are evaluated as in Friedman et al., 2008.

Poorly conserved

	predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	seed match	site-type contri- bution	3' pairing contri- bution	local AU contri- bution	position contri- bution	context score	context score percentile	conserved branch length	P <sub>CT</sub>
Position 652-658 of CALU 3' UTR	5' ...UCCCCUAGGAGACU---GACUGUUG... hsa-miR-212 3' CCGGACUGACCUUCUGACAAU	7mer-m8	-0.161	-0.026	0.008	0.022	-0.15	51	0.032	< 0.1
Position 652-658 of CALU 3' UTR	5' ...UCCCCUAGGAGACUGUUG... hsa-miR-132 3' GCUUGUACCGACAUUCUGACAAU	7mer-m8	-0.161	0.005	0.008	0.022	-0.12	36	0.032	< 0.1

Context score and features that contribute to the context score are evaluated as in Grimson et al., 2007. Conserved branch lengths and P<sub>CT</sub> are evaluated as in Friedman et al., 2008.



**B**

Rank	miRNA name	miTG score	Precision	SNR
1	hsa-miR-212	21.18	0.65	2.46
2	hsa-miR-132	21.16	0.66	2.48

PubMed Links: [gene](#) | [miRNA](#) | [both](#)

Binding Type	UTR position	Score	Conservation	Also predicted by
9mer(pos 1)	60 - 88	5	7	pictar targetscan
<b>Position on Chromosome</b> 7: 128196518 - 128196546		3'UTR: 5' C C C C C C C 3'		
<b>Conservation Info</b> rn4, mm8, oryCun1, bosTau2, canFam2, dasNov1, monDom4		GCUA CUG AGACUGUUA . . .                  UGGU GAC UCUGACAAU miRNA: 3' GC ACC A 5'		
7mer(pos 2)	630 - 658	1	0	pictar targetscan
<b>Position on Chromosome</b> 7: 128197088 - 128197116		3'UTR: 5' C C C C C C C 3'		
<b>Conservation Info</b> Not Conserved		CC CUGUA GACUGUUG                      GG GACAU CUGACAAU miRNA: 3' GCU UACC 5'		

Rank	Gene name	miRNA name	miTG score	Precision	SNR
277	CALU	hsa-miR-218	14.06	0.55	2.85

PubMed Links: [miRNA](#) | [gene](#) | [both](#)

Binding Type	UTR position	Score	Conservation	Also predicted by
8mer(pos 2)	650 - 678	5	6	
<b>Position on Chromosome</b> 7: 128197108 - 128197136		3'UTR: 5' G U C U A A U U U U G 3'		
<b>Conservation Info</b> rn4, oryCun1, bosTau2, loxAfr1, echTel1, monDom4		AC GUUGG GUCAAGCACA                      UG CAUUC UAGUUCGUGU miRNA: 3' UAC U 5'		

C

D

```
GcggccacggcatcctgtgctgtggggctacaggaaagatcctaattatcATGGACCTGGCAGCAGTTTC
TTATGTGCCTGTCCCTGTGCACAGCCCTTTGCCTTGAGCAAAACCCACAGAAAAGAGGCCGGTACATCAT
GAGCCTCAGCTCAGTGACAAGTTTCACAATGATGCTCAGAGTTTGTATTATGACCATGATGCCTTCTTGG
GTGCTGAAGAAAGCAAAGCCTTTGATCAGCTGACACCAGAGAGAGCAAGGAAAGCCTTGGAAAGATTGT
AAGTAAAATAGATGGCGACAAGGACGGTTTGTCACTGTGGATGAGCTCAAAGATGGATTAAATTTGCA
CAAAGCCGTGGATTTACGAGGATGTAGAGCCAGCTGGAAGGGGCATGACCTCAATGAGGACGGCTCG
TTTCTGGGAGGAGTATAAAAATGCCACCTACGGCTACGTTTATAGATGATCCAGATTCCTGATGATGATT
TAACTATAAACAGATGATGGTTAGAGATGAGCGGAGGTTTAAAAAGGACAGCAAGGATGGAGACCTCATT
GCCACCAAGGAGGAGTTCACAGCTTCCCTGCACCCCTGAGGAGTATGACTACATGAAAGATATAGTAGTAC
AGGAACAATGGAAGATATAGATAAGAAATGCTGATGGTTTTCATTGATCTAGAAGAGTATATGGTGACAT
GTACAGCCATGATGGGAATACTGATGAGCCAGAATGGGTAAAGACAGAGCGAGAGCAGTTTGTGAGTTT
CGGATAAGAACCGTATGGGAAGATGGACAAGGAAGAGACCAAGACTGGATCCCTCCCTCAGACTATG
ATCATGACAGAGGCAGAAGCCAGGCCCTGGTCTATGAATCAGACCAAAAACAGGATGGCAAGCTTACCAA
GGAGGAGATCGTTGACAAGTATGACTTATTTGTTGGCAGCCAGGCCACAGATTTGGGGAGCCCTTAGTA
CGGCATGATGAGTTCAGCgctacgggaggaacccctcatttctcctcaaaagtattttttacagctctctg
gtttccatgaaattgtttgctactgactgttactacaaacttttaagacatgaaaaggcgtaat
gaaaaccatcccctcccattctcctcctctctgagggaactggagggaagcgtgctctgaggaaaca
ctctaattagtagacacttggtttgtagatttacactttgtattatgtatataacatggcgtgtttatttt
gtattttctcctggttgggagtagatgtagaagatcaagatcctcaactcacacatgtagacaacaact
agctcttactctttctcaaccctttatgatatttaaatctcactcaactaattttgttagcctga
gatcacaataagaaatgttcaggagagagaaagaaaaaataatgctccacaatttatatttagagaga
gaaacttagctctgctgcaaaaagtcacaatttcataggtagtaggggccaatattacattcag
tgcataaggtccagcaactgaaacctgccattacctgggcaaggaaaagatccctttgctcaggaagact
ggcccaaatgatttcttcttttcccccctgtaggactgactgttggtcaattttgtcaagcagctg
tgggtggaagagttagggccagtgcttgaatacaatcaagtagtgaatgtgatctctttgcagagcta
tagatagaaacagctgaaaaactaaagaaaaatacaaggttttggggcacaatctttttctgggt
gtgcaatctgtgaaatgctcaagacttaattttgcttttgaatacaactgtaaatgcccccaatccggt
tctctctctcccaggtgtgcaaggaattaatctgttttcaactcaatataaattcaactctctccaa
tc
```

Secuencia mRNA CALU BC013383. Minúsculas, regiones UTR; mayúsculas, región CDS; subrayado negro, sitios de unión más energéticos predichos para miR-132; subrayado gris, secuencia del inserto en p3U-CALU; rojo, sitio de unión más energético predicho para miR-218-5p

Prediccion de has-miR-132-3p

Gene	microRNA	Position	Seed	dGduplex	dGopen	ddG
Seq1	Seq1	274	8:1:1	-14.93	-6.83	-8.09
Seq1	Seq1	1079	8:0:0	-14.9	-7.50	-7.39
Seq1	Seq1	916	8:1:1	-13.31	-10.69	-2.61
Seq1	Seq1	1649	8:1:0	-13.75	-12.79	-0.95
Seq1	Seq1	757	8:1:1	-8.1	-8.53	0.43
Seq1	Seq1	1061	8:1:1	-6.02	-8.87	2.85

Predicted Targets

Gene	microRNA	Sites	Score
Seq1	Seq1	6	-8.49

Prediccion de has-miR-218-5p

Gene	microRNA	Position	Seed	dGduplex	dGopen	ddG
Seq1	Seq1	1669	8:0:0	-16.9	-9.24	-7.65
Seq1	Seq1	299	8:1:1	-11.3	-7.62	-3.67
Seq1	Seq1	860	8:1:1	-13.8	-10.24	-3.55
Seq1	Seq1	899	8:1:1	-11.1	-7.95	-3.14
Seq1	Seq1	698	8:1:1	-10.6	-8.56	-2.03

Predicted Targets

Gene	microRNA	Sites	Score
Seq1	Seq1	5	-7.69

Localizacion en la region CDS. No detectable con nuestros constructos plasmidicos

Sitio de union localizado a unas 77 pb del cambio nucleotidico del polimorfismo rs1034550. Concretamente en la posicion 81 de la region 3'UTR y, por tanto, en el inserto de nuestros constructos plasmidicos

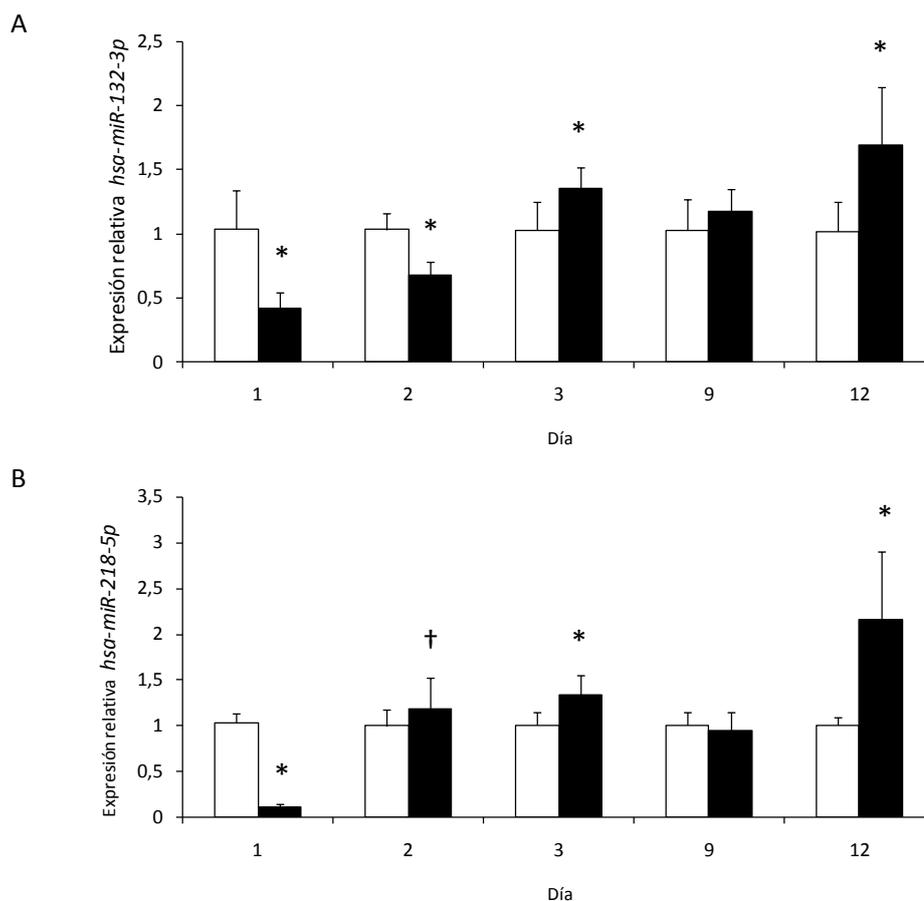
Sitio de union localizado en la posicion 744 de la region 3'UTR CALU, cerca de un Segundo sitio de union predicho para has-miR-132-3p poco energetico (pos 651, 8:1:0, -0.95)

---

**Figura 38. Predicción bioinformática de sitios de unión de miRNAs en la secuencia 3'UTR de *CALU*.** Predicción mediante TargetScan (A), Diana microT (B) y PITA (C). Análisis adicional utilizando el sistema PITA y las secuencias específicas de hsa-miR-132-3p y hsa-miR-218-5p sobre la secuencia completa (5'UTR, CDS y 3'UTR del mRNA *CALU*) y localización de los sitios de unión (D).

## **2.2. EXPRESIÓN DE LOS miRNA miR-132 Y miR-218 EN LA CMLVH EN CONDICIONES DE HPM A DIFERENTES PUNTOS TEMPORALES**

Son múltiples las plataformas posibles para estudiar la expresión de miRNAs, tales como northern blot, PCR cuantitativa en tiempo real, extensión de cebadores y microarrays. En este trabajo de Tesis se escogió el estudio mediante qPCR por ser una técnica asequible, sencilla, reproducible y optimizada en el laboratorio donde se ha desarrollado este trabajo. Se estudió la expresión génica de miR-132-3p y miR-218-5p a diferentes puntos temporales durante la calcificación de la CMLV (**Figura 39 A y B**). Los resultados demuestran una regulación de la expresión de estos miRNA en el modelo de la CMLV inducida por HPM. La expresión de miR-132-3p y miR-218-5p está regulada negativamente, de acuerdo con la sobreexpresión temprana de calumenina. De forma interesante, la expresión de ambos miRNA durante la mineralización de la CMLV se reguló positivamente. Estos resultados de expresión son concordantes con la menor expresión de *CALU* en el tiempo y la máxima expresión de *CTNNA1* mostradas en las **Figuras 33-35**.



**Figura 39. Expresión de miR-132-3p y miR-218 durante la calcificación dependiente de HPM de la CMLV.** Se analizó la expresión relativa de *hsa-miR-132-3p* (A) y *hsa-miR-218-5p* (B) durante la calcificación de la CMLV inducida por HPM. Cada experimento se repitió, al menos, 3 veces (n = 3) en triplicados técnicos por condición. La condición experimental HPM (barras negras) se comparó para cada punto temporal con su respectivo control (barras blancas). El análisis de la expresión génica se realizó por qPCR y normalización por expresión de snRNA U6. \*, Significación estadística p < 0,05.

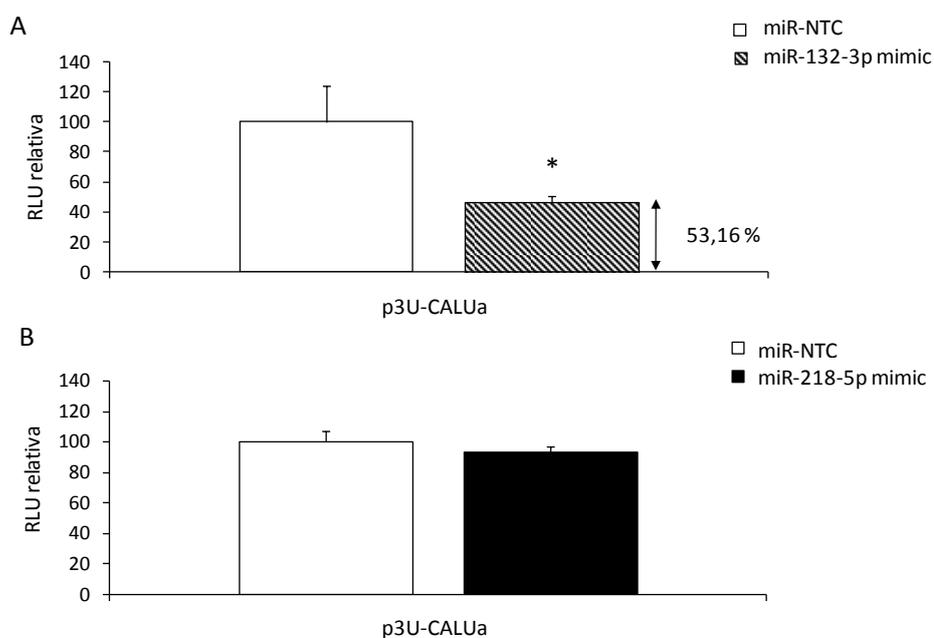
### 2.3. ESTUDIO DE FUNCIONALIDAD DE LOS miRNA miR-132 Y miR-218 EN LA ESTABILIDAD DE LOS TRANSCRITOS DE CALU

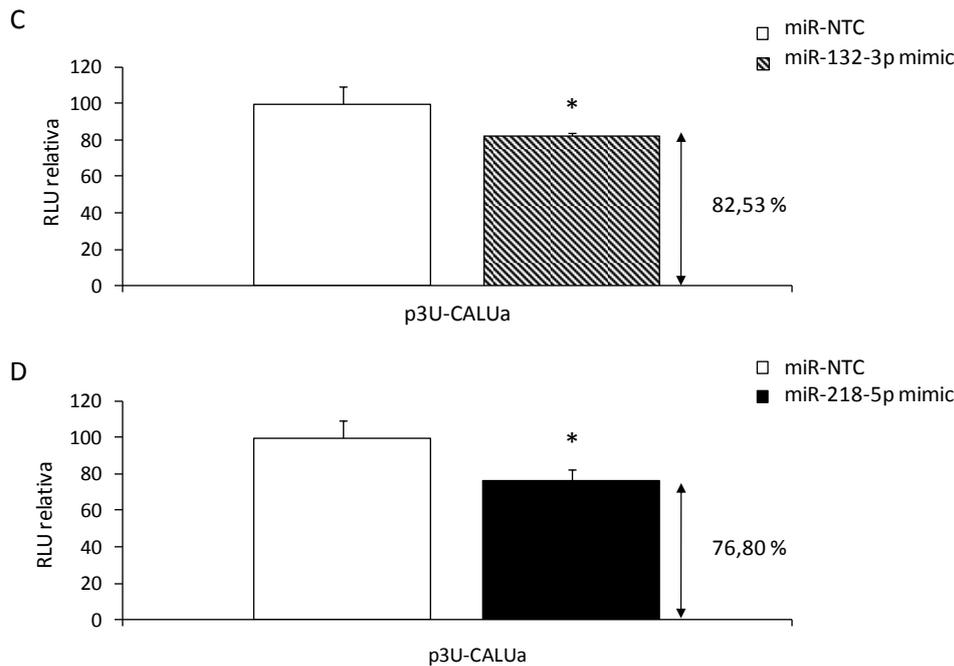
Los algoritmos predictivos no son perfectos y existe la posibilidad de obtener falsos positivos en un sistema biológico dado. Por ello, tras la predicción y revisión bibliográfica relativa a los miRNA-132 y miRNA-218, se verificó experimentalmente la interacción de los miRNA con la diana predicha. La utilización de vectores de expresión génica es el método más sencillo y directo de verificación experimental de la interacción directa de un miRNA y su secuencia diana. Así pues, se co-transfectaron los vectores de expresión luciferina/luciferasa previamente descritos (p3U-CALUa y p3U-CALUg), *Renilla* como control interno junto con los miRNA-132-3p o miR-218-5p

comerciales. En este trabajo se utilizaron células endoteliales HUVEC EaHy.926 y CMVL que fueron co-transfectadas con plásmido *Renilla*, plásmido p3U-CALUa, y miR-132-3p/miR-218-5p. Además, se utilizó un control comercial (miR-NTC) como control negativo.

En la célula endotelial se observó una reducción de la actividad luciferasa de un 53,16 % como resultado de miR-132-3p únicamente en las construcciones plasmídicas conteniendo la región 3'-UTR *CALU* silvestre p3U-CALUa (RLU relativa:  $46,83 \pm 3,84$  vs.  $100 \pm 23,90$ ;  $p = 0,003$ ) (**Figura 40 A**). Sin embargo, miR-218-5p no redujo la actividad en la construcción plasmídica p3U-CALUa (RLU relativa:  $93,12 \pm 3,80$  vs.  $100 \pm 6,80$ ;  $p = 0,128$ ) (**Figura 40 B**).

En la CMLV también se observó una reducción del 17,47 % (RLU relativas:  $82,53 \pm 1,36$  vs.  $100 \pm 9,45$ ;  $p = 0,027$ ) y del 23,20 % (RLU relativas:  $76,80 \pm 6,21$  vs.  $100 \pm 9,45$ ;  $p = 0,015$ ) en las lecturas de luciferasa al co-transfectar el plásmido p3U-CALUa con miR-132-3p y con miR-218, respectivamente (**Figura 40 C y D**). Si bien, la actividad del miR-132 fue significativamente menor en la CMLV que en HUVEC, ésta mantuvo la significación estadística, por lo que en la CMLV tanto miR-132 como miR-218 son capaces de desestabilizar el mRNA *CALU* mediante la actividad putativa de los miRNA.





**Figura 40. Efecto de miR-132-3p y miR-218-5p sobre la estabilidad del mRNA CALU utilizando plásmidos p3U-CALUa en las células vasculares.** Efecto de miR-132-3p sobre p3U-CALUa en la célula endotelial (A) y en la CMLV (C). Efecto de miR-218-5p sobre p3U-CALUa en la célula endotelial (B) y en la CMLV (D). Cada ensayo se realizó, al menos 3 veces (n =3) en cuadruplicados técnicos por condición experimental. Cada condición fue comparada con su respectivo control a las 24h de la transfección. \*, Significación estadística (p < 0,05).

Además, en el caso de miR-132 se realizaron ensayos de co-transfección utilizando la contrucción plasmídica p3U-CALUg (datos no mostrados). Si bien, en las bases de datos del NCBI el SNP CALU rs1043550 predice un cambio nucleotídico en la posición c.\*4A>T, en ‘MGARD db gene’ se refleja que tal SNP también se asocia con cambio nucleotídico en c.\*77A>T muy cercano a la zona de unión más energética predicha para miR-132 (8:0:0,  $-\Delta\Delta G = -7,39$ ) y sita a unas 77 pb del cambio nucleotídico más aceptado (c.\*4A>T). La co-transfección de miR-132 no añadió una mayor desestabilización del mRNA CALU en los ensayo luciferasa.

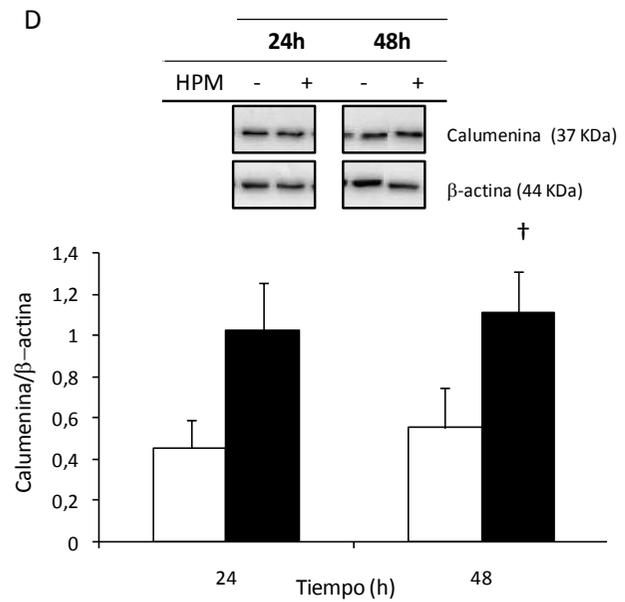
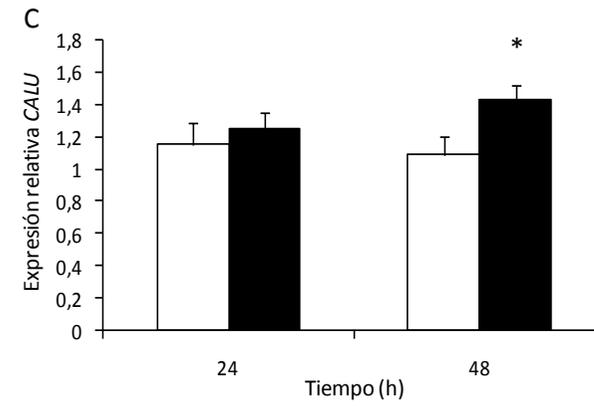
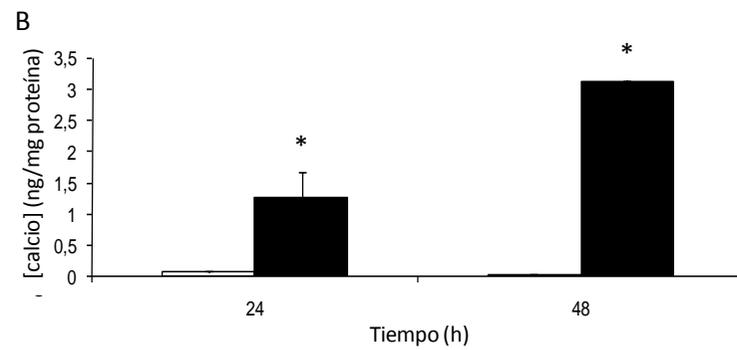
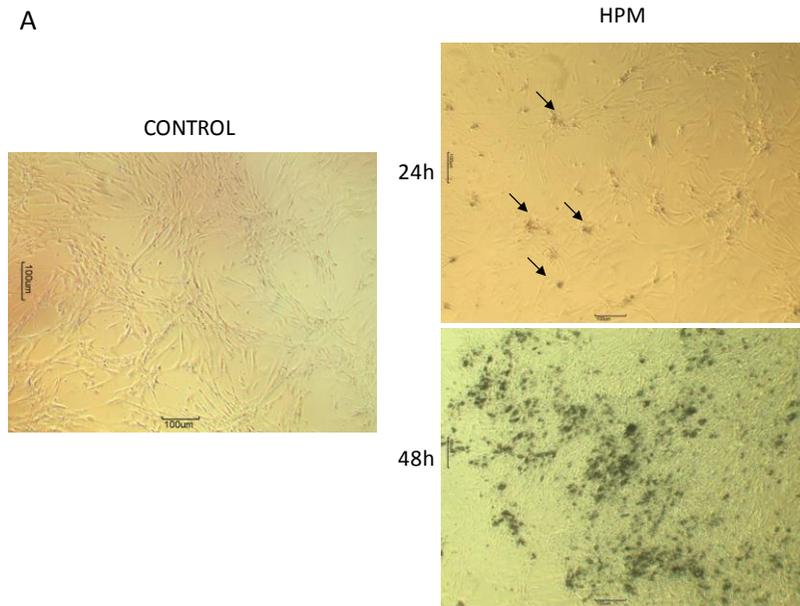
#### 2.4. LA SOBREENPRESIÓN TRANSITORIA DE LOS miR-132 Y miR-218 REDUCE LA CALCIFICACIÓN *IN VITRO* DE LA CMLV

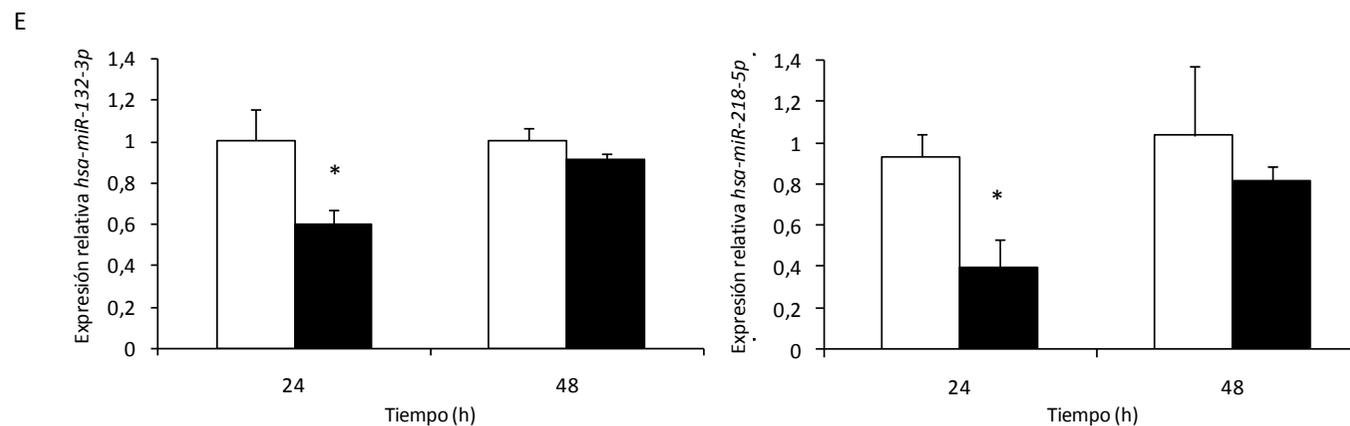
Para este trabajo se utilizó CMLV transfectadas transitoriamente con lipofectamina y un control negativo de miRNA (miR-NTC). Con tal de comprobar que

miR-NTC no alteraba la respuesta de la CMLV a la HPM, se compararon las condiciones experimentales control e HPM tras 24 h y 48 h. La regulación negativa de los miRNA durante las primeras 24h de osteoinducción por HPM y la posibilidad de valorar mineralización a las 24 h y 48 h, justifica la elección de las transfecciones transitorias para sobreexpresar miR-132 y miR-218. Tras 24 h la diferencia en la mineralización demostrada por análisis cuantitativo ya demostró ser significativa ( $0,05 \pm 0,02$  vs.  $1,26 \pm 0,39$ ;  $p = 0,049$ ), siendo casi dos veces más a las 48 h ( $0,01 \pm 0,01$  vs.  $3,12 \pm 0,40$ ;  $p = 0,009$ ) (**Figura 41 A y B**). Además, también se produjo una sobreexpresión de *CALU* y una regulación negativa significativa de miR-132-3p y miR-218-5p en las primeras 24 h de CMLV miR-NTC sometidas a tratamiento control o HPM, de acuerdo con lo descrito para CMLV no sometidas a procedimientos de transfección (**Figura 41 C-E**). Por otro lado se estudió si la transfección con miR-NTC afectaba a la síntesis de calumenina en el modelo de calcificación de la CMLV. Los resultados de western blot y su valoración densitométrica sugieren una tendencia estadística para una sobreexpresión de calumenina de 1,79 veces al comparar la condición control con la HPM tras 48 h. Así, en CMLV transfectadas con miR-NTC y sometidas a HPM la síntesis de calumenina fue de  $1,02 \pm 0,23$  vs.  $0,46 \pm 0,14$  ( $p = 0,097$ ) y de  $1,11 \pm 0,20$  vs.  $0,55 \pm 0,19$  ( $p = 0,055$ ) a las 24h y 48h respectivamente (**Figura 41 D**)

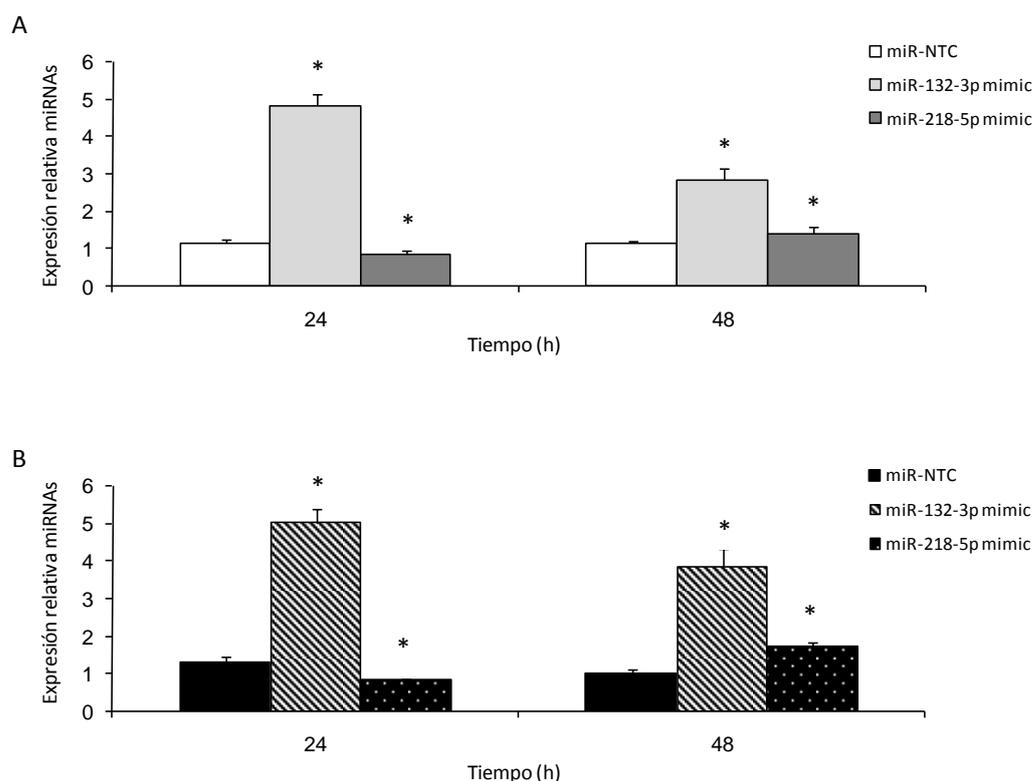
#### **2.4.1. La sobreexpresión transitoria de miR-132 y miR-218 durante las etapas tempranas de la calcificación de la CMLV reduce la deposición mineral**

Evidenciado esto, se procedió a valorar el efecto de la sobreexpresión de miR-132 y miR-218 durante las fases tempranas de calcificación de la CMLV, tras confirmar la sobreexpresión de miR-132-3 y miR-218-5p a las 24 h y 48 h después de realizar las transfecciones (**Figura 42**). La eficiencia de las transfecciones siempre fue mayor para miR-132-3p que para miR-218, lo que debe sugerir una regulación más estricta de la expresión de miR-218-5p que de miR-132-3p, aunque ambos se encuentren regulados negativamente durante las etapas iniciales de la calcificación (**Tabla 19**). La sobreexpresión de miR-218-5p sólo fue estadísticamente significativa a las 48 h de la transfección, lo que podría explicar, al menos en parte, los resultados de los ensayos con vectores reporteros.





**Figura 41. Efecto de la transfección transitoria de miR-NTC en la CMLV sobre el grado de mineralización inducida por HPM y el perfil de expresión génica de CALU y miRNAs.** La CMLV fue transfectada con 30nM de miR-NTC y condicionada durante 24 y 48h con HPM para estudiar el efecto sobre la mineralización, la expresión de CALU y de miR-132-3p y miR-218-5p. Imagen captada a las 24h y 48h por microscopia de luz convencional a 4X; las flechas señalan puntos de calcificación incipiente reconocida *de visu* (A). Valoración del contenido de calcio en CMLV transfectadas con 30nM miR-NTC y sometidas a condición control o HPM (B). Expresión génica de CALU normalizada por GAPDH (C) y síntesis de calumenina (D). Expresión de los miR-132-3p y miR-218-5p normalizados por la expresión de snRNA U6 en CMLV transfectadas con miR-NTC (E). Cada ensayo se realizó, al menos 3 veces (n =3) en duplicados o triplicados técnicos. Cada condición experimental fue comparada con su respectiva condición experimental control (normofosfatemia) para cada punto temporal. Barras blancas, condición control; barras negras, condición de HPM. \*, Significación estadística ( $p < 0,05$ ); †, tendencia estadística.



**Figura 42. Confirmación de la sobreexpresión de los miRNA transfectados.** Sobreexpresión de miR-132-3p y miR-218-5p tras 24h y 48h después de realizar transfección transitoria con lipofectamina en CMLV sometidas a condiciones control (A) y condiciones de HPM (B). Se transfectaron 30nM de cada uno de los miR. Cada ensayo se realizó, al menos 3 veces (n =3) en triplicados o cuadruplicados técnicos. Cada ensayo miR mimic fue comparado con su respectivo control miR-NTC para cada punto temporal. \*, Significación estadística (p < 0,05).

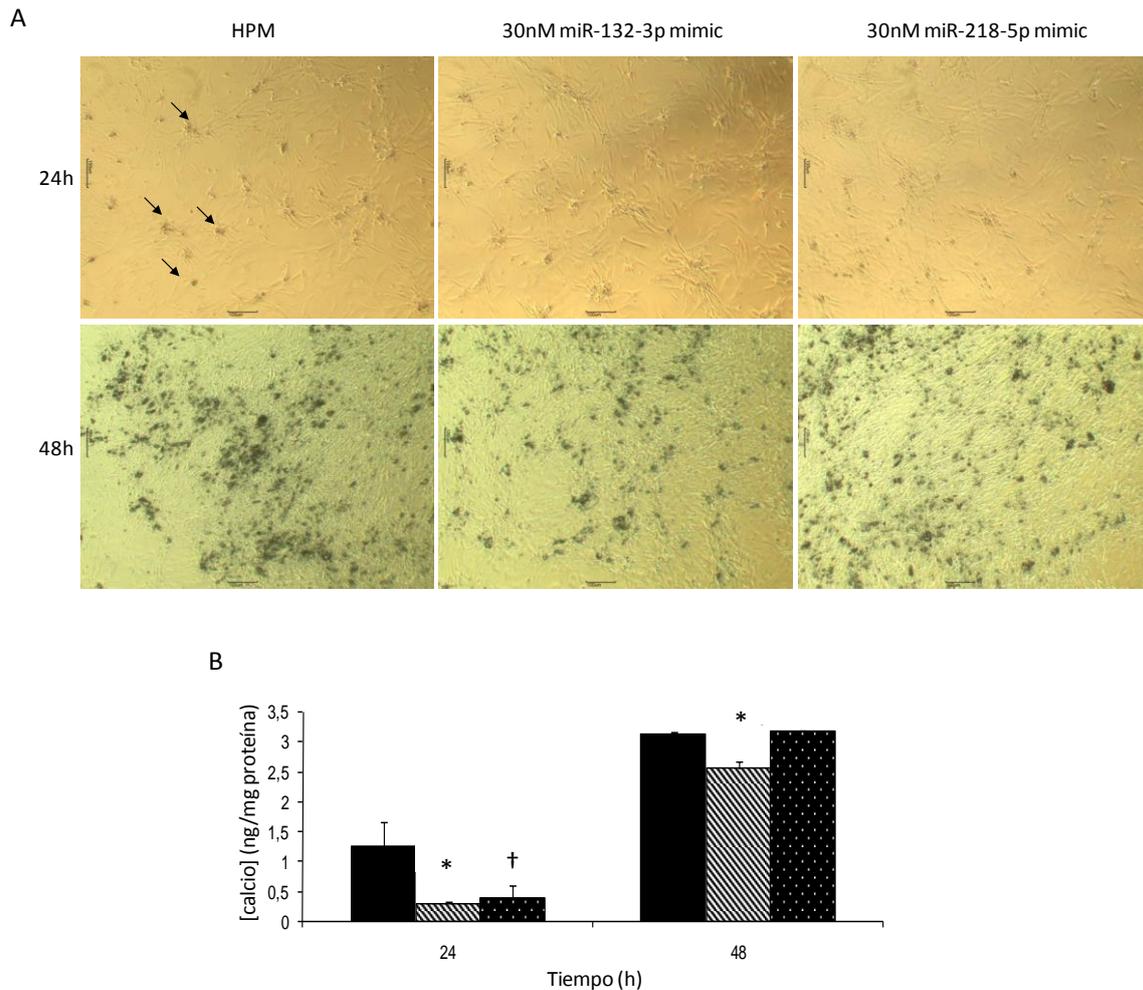
**Tabla 19. Sobreexpresión obtenida en los ensayos miR mimic utilizando miR-132-3p y miR-218-5p en diferentes condiciones.** Ver representación gráfica en Figura 17.

miRNA (30 nM)	Condición experimental	Tiempo (h)	Expresión ( $\bar{y} \pm DS$ )	Valor P
<i>hsa-miR-132-3p</i>	Control	24h	4,80 ± 0,26	0,000
		48h	2,82 ± 0,31	0,001
	HPM	24h	5,00 ± 0,38	0,000
		48h	3,84 ± 0,46	0,000
<i>hsa-miR-218-5p</i>	Control	24h	0,85 ± 0,06	0,010
		48h	1,41 ± 0,14	0,008
	HPM	24h	0,84 ± 0,01	0,016
		48h	1,71 ± 0,10	0,000

---

Cada ensayo miR mimic fue comparado con su propio control miR-NTC para cada punto temporal. Significación estadística cuando  $p < 0,05$ . X, media; DS, desviación estándar.

Adicionalmente se estudió la participación de estos miRNA sobreexpresados en la calcificación vascular durante las fases tempranas, ya que las transfecciones no se prolongaron por más de 48-72 h. Se estudió la funcionalidad mediante la valoración de la mineralización y la expresión de calumenina, así como sobre la diferenciación osteoblástica mediante el estudio de expresión génica de dianas de miR-132-3p y miR-218-5p relevantes durante la calcificación. La sobreexpresión de ambos miRNA (miR-132 + HPM y miR-218 + HPM) demostró proteger significativamente frente a la calcificación temprana respecto de la condición control (miR-NTC + HPM). A las 24 h, el miR-132 redujo en un 77,39% el grado de calcificación ( $0,29 \pm 0,03$  vs.  $1,26 \pm 0,39$ ;  $p = 0,007$ ) y miR-218 en un 69,31% ( $0,39 \pm 0,20$  vs.  $1,26 \pm 0,39$ ;  $p = 0,069$ ), aunque no llegó a ser significativo dada la variabilidad entre ensayos en este último. A las 48 h sólo miR-132 redujo significativamente la deposición de calcio en un 18,49% ( $2,54 \pm 0,13$  vs.  $3,12 \pm 0,04$ ;  $p = 0,009$ ) (**Figura 43**).

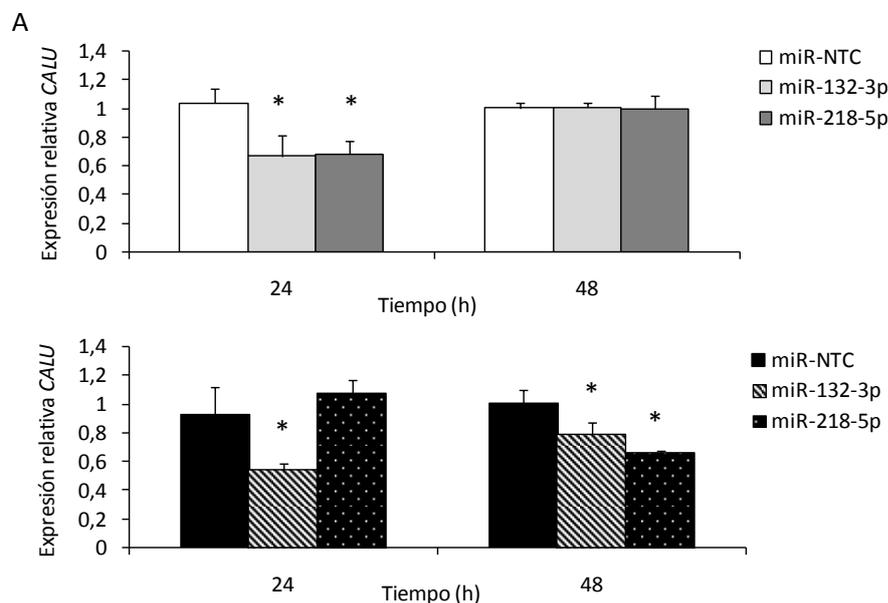


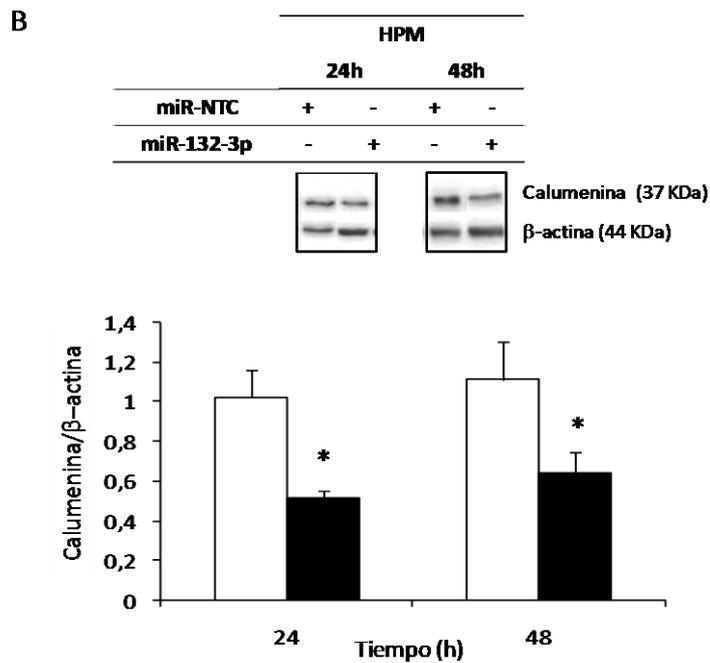
**Figura 43. Efecto de la sobreexpresión de miR-132-3p y miR-218-5p sobre la mineralización en las fases tempranas de calcificación de la CMLV dependiente de HPM.** CMLV fueron transfectadas transitoriamente con 30nM miR-NTC, miR-132-3p o miR-218-5p y fueron sometidas durante 24 y 48h a HPM. Se realizó fotografía de microscopía de luz a 4X (A) y los resultados fueron validados definitivamente mediante valoración del contenido de calcio por método de la *o*-cresoftaleína y normalizado por el contenido de proteína total (B). Cada ensayo se realizó, al menos 3 veces (n =3) en triplicados o cuadruplicados técnicos. \*, Significación estadística (p < 0,05); †, tendencia estadística (no significativa).

#### 2.4.2. MiR-132 y miR-218 regulan la expresión y síntesis de calumenina en condiciones control y de HPM en la CMLV

Se confirmó la regulación de calumenina dependiente de miR-132 o miR-218 en el particular sistema biológico desarrollado en esta Tesis mediante ensayos miRNA mimic de sobreexpresión, así como mediante técnicas de estudio de la expresión génica. Sólo miR-132 fue capaz de regular la expresión génica de *CALU* en los dos puntos

temporales estudiados para la HPM (**Figura 44 A**). Se confirmó el efecto mantenido de la regulación de miR-132 sobre *CALU* analizando la regulación de la síntesis de calumenina ejercida por miR-132. Se utilizaron extractos de proteína total homogeneizados de monocapas celulares previamente descalcificadas a las 24 h y 48 h del inicio de la HPM. Las CMLV habían sido previamente transfectadas con 30 nM miR-132-3p o miR-NTC, como para el estudio de expresión génica. La síntesis relativa de calumenina se calculó en tanto por uno, considerando los valores de la densitometría de bandas de las CMLV miR-NTC+HPM como 1. Después de 24 h y 48 h, miR-132-3p redujo la síntesis de calumenina a aproximadamente 0,50 veces ( $0,51 \pm 0,04$  vs.  $1,02 \pm 0,23$ ;  $p = 0,027$ ) y 0,64 veces ( $0,64 \pm 0,10$  vs.  $0,99 \pm 0,05$ ;  $p = 0,046$ ) (**Figura 44 B**). Es decir, la sobreexpresión de miR-132 redujo en un 50,1% y 36% la síntesis de calumenina en CMLV sometida a HPM durante 24h y 48h, respectivamente. Las CMLV transfectadas con miR-218-5p sólo regularon la expresión de *CALU* tras 24 h y posteriormente se perdió el efecto. Sin embargo, en el punto temporal de 24 h, las transfecciones con miR-218-5p todavía no habían resultado efectivas, probablemente por una estricta regulación de este miRNA en la CMLV sometida a condiciones de HPM.

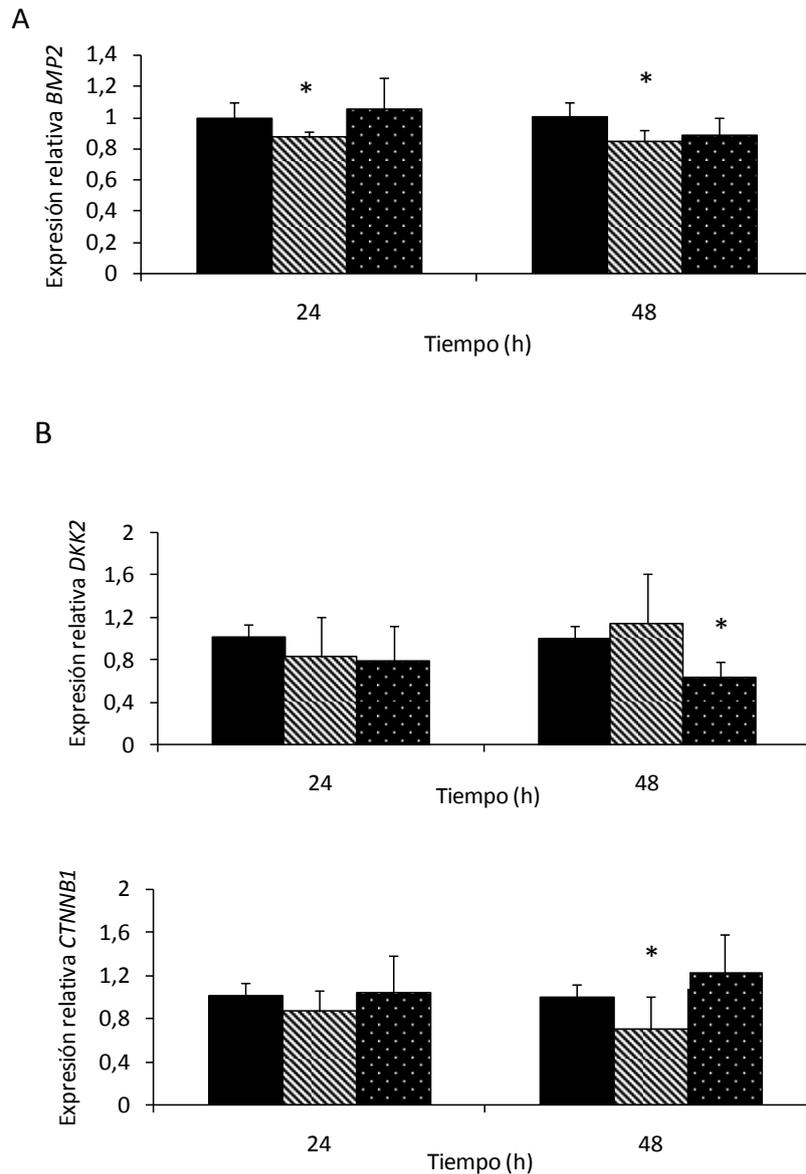




**Figura 44: Efecto de miR-132-3p y miR-218-5p sobre la expresión y síntesis de calumenina en las etapas tempranas de calcificación de la CMLV.** Efecto de la sobreexpresión de miR-132-3p y miR-218-5p sobre la expresión de *CALU* en CMLV en condición control o HPM (A). Regulación de la síntesis de calumenina por miR-132-3p, analizado por western blot y densitometría de bandas (Image J) (B). Cada ensayo se realizó, al menos 3 veces (n =3) en triplicados o cuadruplicados técnicos. Cada condición fue comparada con su respectivo control para cada punto temporal. \*, Significación estadística (p < 0,05).

### 2.4.3. La sobreexpresión de miR-132 y miR-218 regula la expresión de BMP2 y el eje DKK2/CTNNB1 en CMLV sometidas a HPM

Los miRNA miR-132 y miR-218, además de *CALU*, tienen otras potenciales dianas de interés para este trabajo de Tesis, incluidas *BMP2* para miR-132; o *DKK2/CTNNB1* para miR-218 (Hassan MQ y cols., 2012; Xie J y cols., 2015; Zhang Y y cols., 2011; Li Y y cols., 2013). Es por ello que finalmente se estudió la expresión de marcadores génicos de diferenciación osteoblástica temprana y de potenciales dianas alternativas a *CALU* para los miR-132-3p (**Figura 45 A**) y miR-218-5p (**Figura 45 B**).



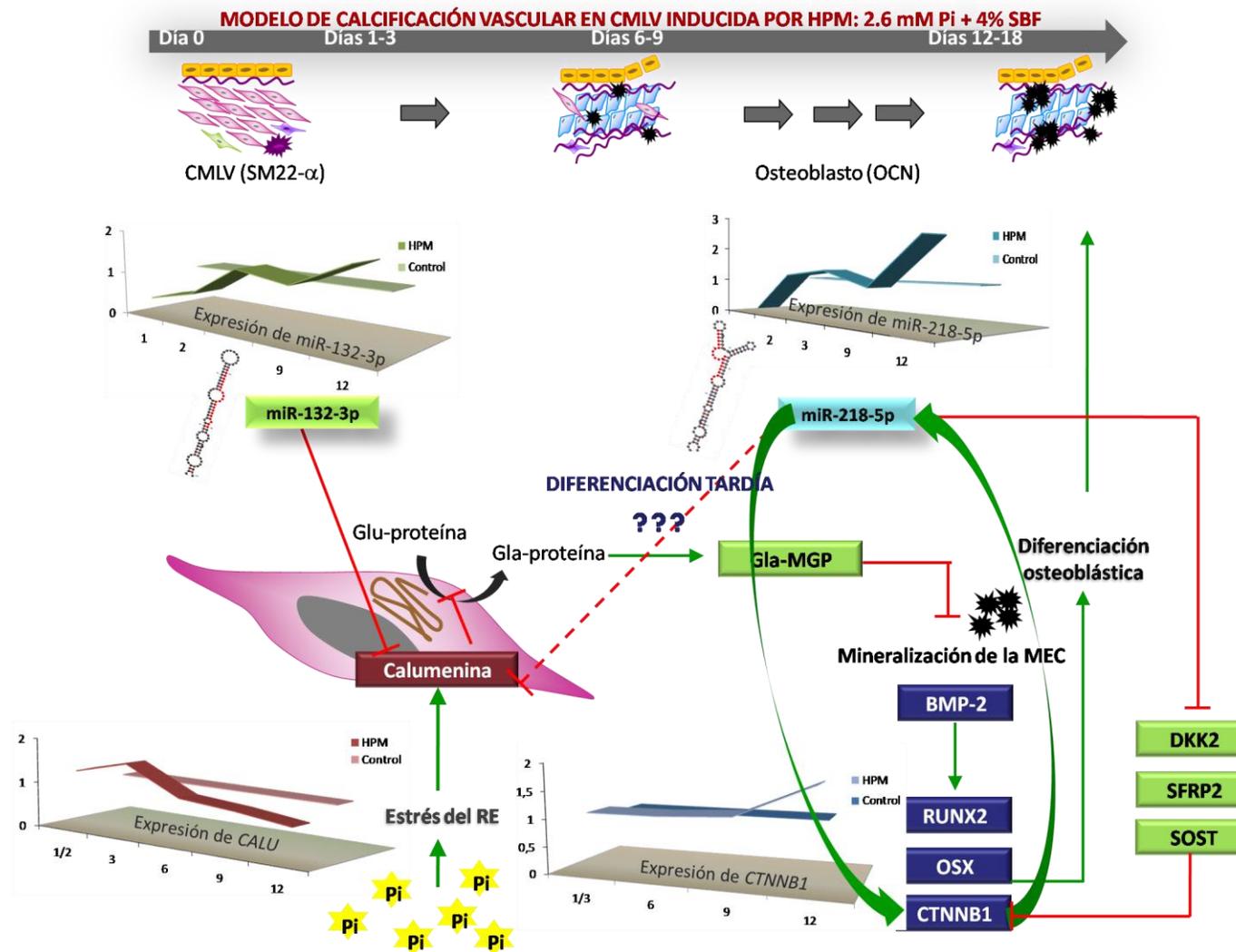
**Figura 45: Dianas alternativas de miR-132-3p y miR-218-5p implicadas en la osteodiferenciación de la CMVL.** Efecto de miR-132-3p y miR-218-5p sobre la diferenciación osteoblástica temprana de la CMLV (expresión de BMP2) (A). Efecto de miR-132-3p y miR-218-5p sobre la expresión de las potenciales dianas de miR-218-5p (*DKK2* y *CTNMB1*) (B). Cada ensayo se realizó, al menos 3 veces ( $n = 3$ ) en triplicados o cuadruplicados técnicos. Cada condición fue comparada con su respectivo control para cada punto temporal. \*, Significación estadística ( $p < 0,05$ ).

## 2.5. MODELO DE ACCIÓN PROPUESTO PARA LOS miRNA miR-132-3P Y miR-218-5P EN LA CALCIFICACIÓN *IN VITRO* DE LA CMLV INDUCIDA CON HPM

En la **Figura 46** se modela el posible mecanismo de acción de miR-132 y miR-218 estudiado en la presente Tesis. El mecanismo de acción propuesto se basa en los

hallazgos de este trabajo de investigación así como de la revisión bibliográfica de las publicaciones más recientes referentes a miR-218-5p.

La regulación exógena de miR-132-3p en fases tempranas, cuando la diferenciación y mineralización es incipiente, puede tener un efecto protector, si bien esto no ocurre en la evolución natural de la calcificación de la CMLV inducida por HPM. MiR-218, si bien parece inhibir la calcificación incipiente y la expresión de *CALU*, debe actuar como un osteomiR debido a la inhibición de múltiples inhibidores de la vía del Wnt/ $\beta$ -catenina. Su sobreexpresión en fases tardías de diferenciación podría explicar la simultánea regulación negativa de *CALU* y positiva de *CTNNB1*.



**Figura 46: Mecanismo de acción propuesto para miR-132-3p y miR-218-5p en la calcificación vascular.** El mecanismo propuesto basado en los hallazgos de este trabajo de Tesis así como en las publicaciones recientes referentes a miR-218-5p. Flechas verdes, activación de vías; en rojo se indica la represión de vías. La represión fisiológica temprana de miR-132-3p debe facilitar la sobreexpresión de calumenina dificultando la disponibilidad de cMGP. La progresiva regulación positiva de miR-132-3p junto con la activación de vías secretoras, depleciona el contenido celular de calumenina. La sobreexpresión simultánea de miR-132-3p y miR-218-5p debe favorecer la regulación de la expresión de calumenina en las formas osteoblásticas derivadas de la transdiferenciación de la CMLV. MiR-218-5p, debe regular progresivamente la vía de la β-catenina mediante la represión de *DKK2*, *SFRP2* y *SOST*.

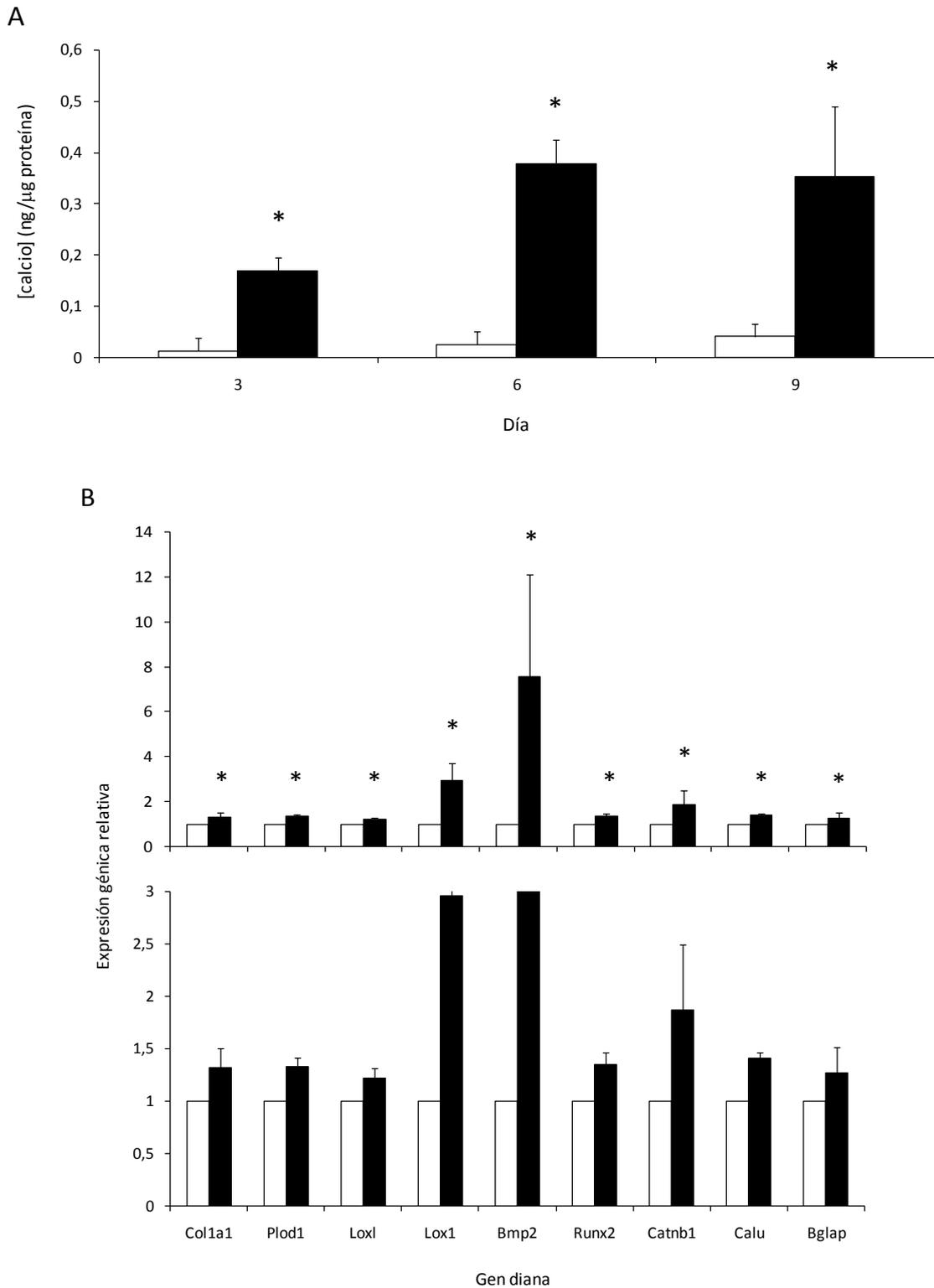
### **3. PAPEL DE LA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC) EN UN MODELO CELULAR DE CALCIFICACIÓN VASCULAR EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULA DE MÚSCULO LISO VASCULAR DE RATÓN (CMLVr) Y HUMANA (CMLVh)**

En este trabajo de Tesis se ha caracterizado la regulación dependiente de HPM de las enzimas PLOD1 y LOX. Para ello se utilizó un modelo murino de CMLV en el que se adaptó el modelo de calcificación *in vitro* en CMLV humanas (CMLVh). Las CMLV de ratón (CMLVr) utilizadas fueron silvestres (CMLVr-WT) para la expresión de LOX y transgénicas sobreexpresando LOX (CMLVr-LOX). Adicionalmente, se inhibieron químicamente las actividades PLOD en CMLVr. Finalmente, los resultados obtenidos en CMLVr fueron evidenciados en el modelo de calcificación de CMLVh donde se emplearon inhibidores tanto de las actividades LOX como PLOD.

#### **3.1. REGULACIÓN DE LOX Y PLOD DURANTE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR DE LA CMLV DE RATÓN**

##### **3.1.1. Hiperfosfatemia como osteoinductor de la CMLVr silvestre**

Inicialmente, se evidenció la mineralización de la MEC y la transdiferenciación en células osteoblásticas de la CMLVr silvestre (CMLVr-WT) (**Figura 47 A y B**). La sobreexpresión génica de *Bmp2*, *Catnb1* y *Bglap* tras 3 días de condicionamiento HPM acompañada de una mineralización progresiva demostró una activación del programa de diferenciación osteoblástica. Además, se incluyó *Calu* como marcador de calcificación dependiente de HPM, de acuerdo con los resultados previos. La expresión génica de *Calu* en CMLVr se sobreexpresó durante la calcificación dependiente de HPM (**Figura 47 A**), en concordancia con los resultados de CMLVh osteodiferenciadas con HPM.



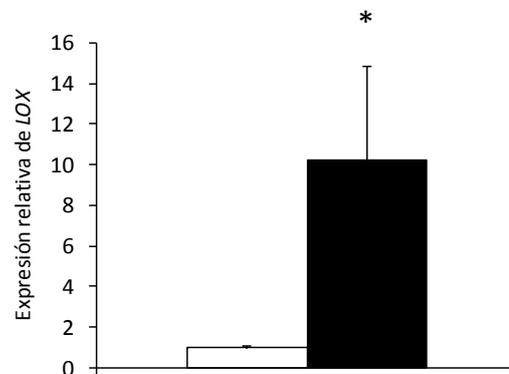
**Figura 47. Mineralización y diferenciación osteoblástica de la CMLVr dependiente de HPM.** Valoración cuantitativa de la mineralización por *o*-cresoftalina (A) y expresión génica de diferentes FEO por qPCR (B). Cada ensayo se realizó, al menos 3 veces ( $n = 3$ ) en duplicados o triplicados técnicos. Cada condición experimental fue comparada con su respectivo control. Barras blancas, condición control; barras negras, condición HPM. Asteriscos, significación estadística ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.2. Regulación dependiente de hiperfosfatemia de las enzimas hidroxilasas *Plod1* y *Loxl1*, en cultivos de CMLVr-WT

Además, se estudió el efecto de la hiperfosfatemia sobre la regulación génica de las hidroxilasas relacionadas con la maduración del colágeno (*Lox*, *Loxl* y *Plod1*) en la CMLVr-WT (**Figura 47 B**). La expresión de factores osteogénicos y la calcificación de la MEC resultado del condicionamiento con HPM se asoció con una sobreexpresión génica de *Lox*, *Plod1* y *Loxl*, en paralelo con la sobreexpresión temprana de *Colla1* (**Figura 47**). Estos resultados sugieren que la síntesis de MEC, tanto en cantidad como calidad, debe estar estrictamente regulada durante la calcificación extracelular.

### 3.2. MODELO DE CALCIFICACIÓN VASCULAR EN CMLV DE RATÓN TRANSGÉNICA SOBREENPRESANDO LOX

Se compararon los patrones de expresión y de mineralización de CMLVr transgénicas CMLVr-LOX con CMLVr-WT. Se confirmó la sobreexpresión de *LOX* mediante qPCR, comparando la expresión de *LOX* en CMLVr-WT y CMLVr-LOX en condiciones control ( $1,01 \pm 0,14$  vs.  $10,20 \pm 4,70$ ;  $p = 0,01$ ) (**Figura 48**).



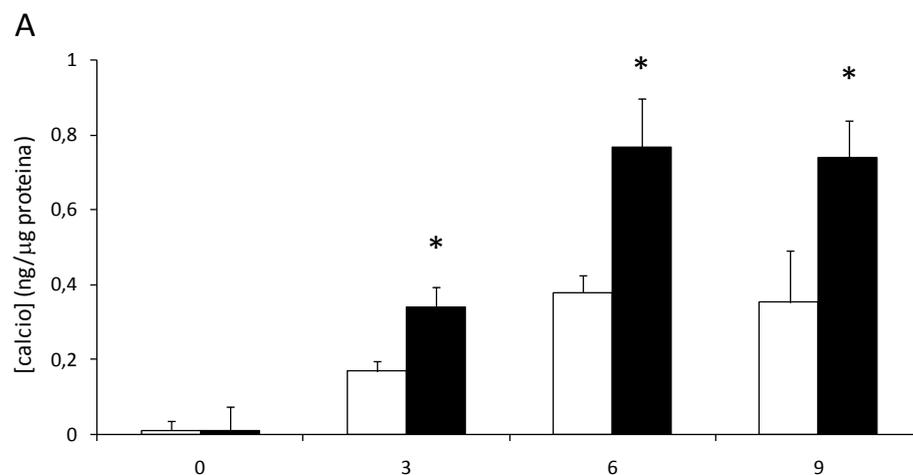
**Figura 48. Sobreexpresión de LOX evidenciada por qPCR en CMLVr.** Se utilizaron CMLVr procedentes de ratones silvestres o transgénicos sobreexpresando LOX. El estudio de la expresión génica se valoró por qPCR utilizando *Tbp-1* como housekeeping para la normalización de los resultados en tres experimentos independientes ( $n = 3$ ). Barra blanca, CMLVr-WT; barra negra, CMLVr-LOX. \*, Significación estadística ( $p < 0,05$ ).

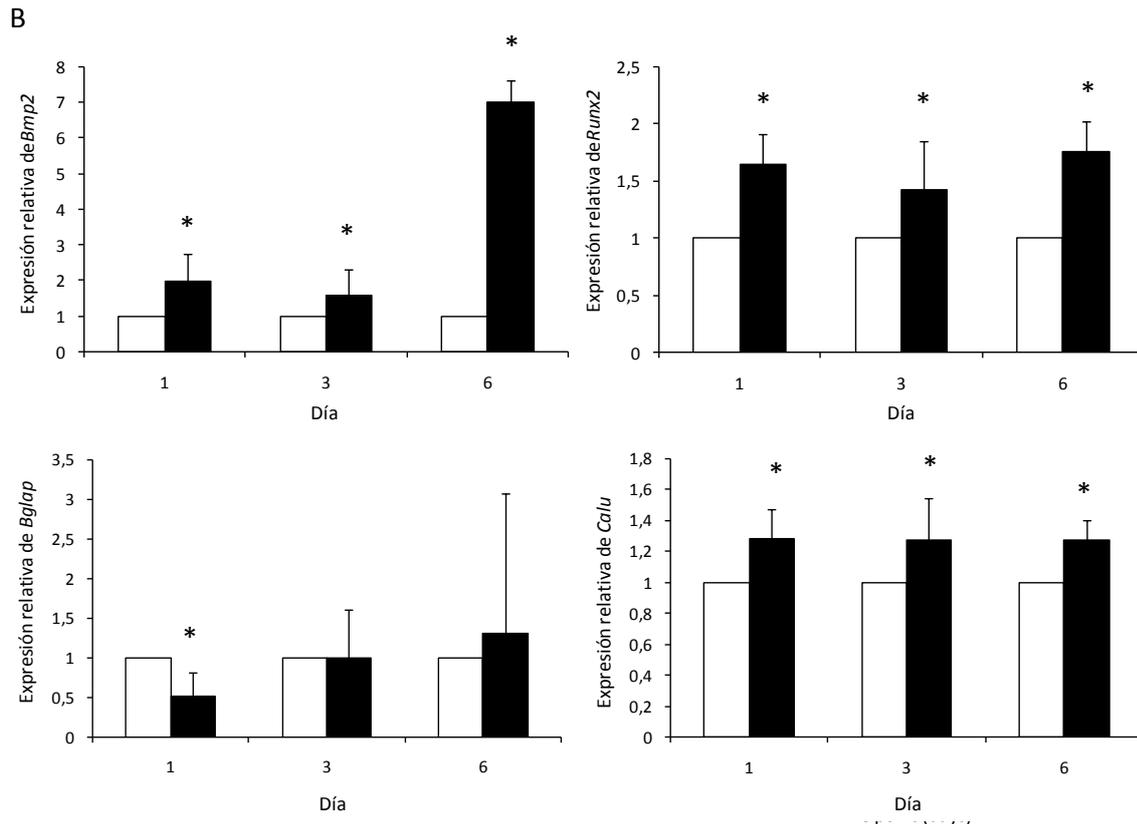
#### 3.2.1. La sobreexpresión de LOX en la CMLVr transgénicos (CMLVr-LOX) se asocia con un mayor grado de calcificación de la MEC y de diferenciación osteoblástica

La HPM indujo un incremento progresivo de la mineralización tanto en CMLVr-WT como en CMLVr-LOX. Se llevó a cabo la valoración cuantitativa sobre extractos de HCl recogidos a 3, 6 y 9 días (método de la *o*-cresoftaleína). Se utilizó la mineralización y expresión génica de las CMLVr-WT como control de las CMLVr-LOX, para cada punto temporal (días 1, 3 y 6). La calcificación de las CMLVr-LOX fue significativamente mayor que en las CMLVr-WT incluso en el día 3 ( $0,34 \pm 0,05$  vs.  $0,17 \pm 0,03$ ;  $p = 0,001$ ) (**Figura 49 A**). Además, se estudió la expresión génica de *Bmp2*, *Runx2* y *Bglap* (**Figura 49 B**). La sobreexpresión de *Bmp2* y *Runx2* coincidió con la mineralización. Sin embargo, la expresión de *Bglap* no fue significativamente diferente entre las CMLVr-WT y CMVr-LOX tras 6 días de HPM. Además, se incluyó la expresión de *Calu* como marcador de la diferenciación osteoblástica, de acuerdo con los resultados derivados de este trabajo de investigación. *Calu* se mantuvo sobreexpresada en las CMLVr-LOX de forma semejante a hallazgos previos en la calcificación de fibroblastos procedentes de pacientes diagnosticados de PXE (*Boraldi F y cols., 2009*).

Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de *LOX* debe participar activamente durante la mineralización y osteodiferenciación de la CMLVr dependiente de HPM.

Dado que la mineralización de la MEC fue similar en los días 6 y 9, los experimentos posteriores se realizaron a 3 y 6 días para el estudio de la expresión génica.



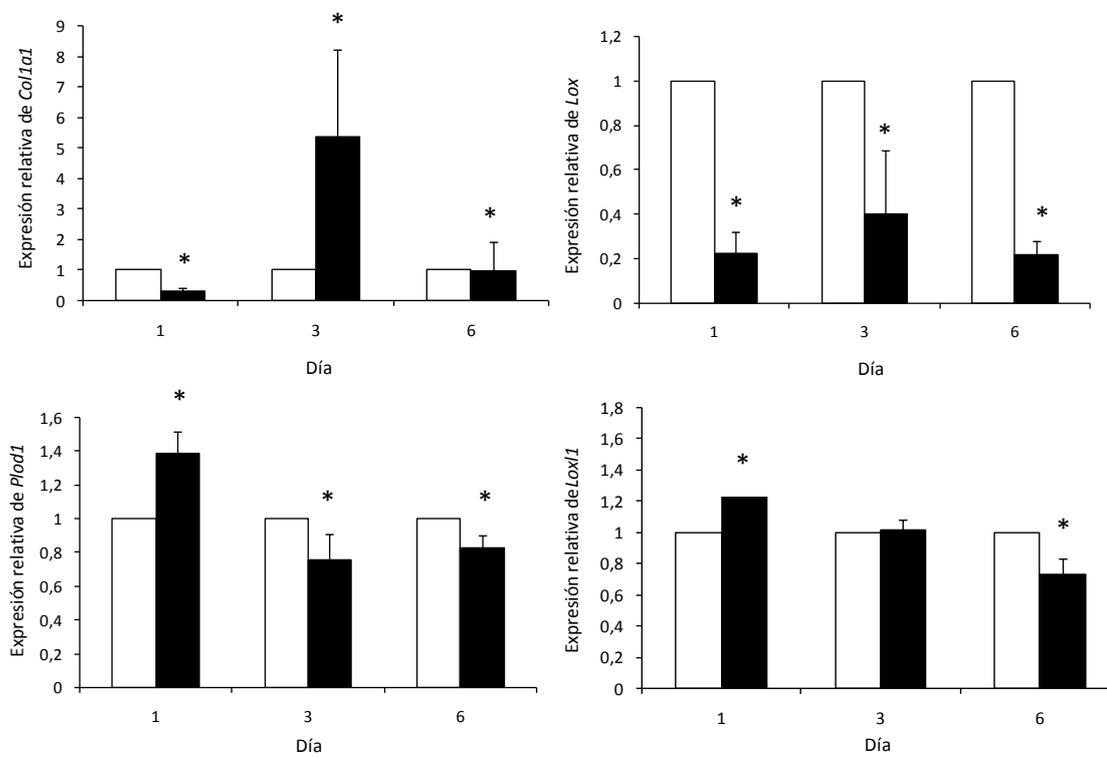


**Figura 49. La sobreexpresión de LOX en CMLVr sometidas a condiciones de HPM aumenta la mineralización y diferenciación osteoblástica.** El contenido de calcio se valoró cuantitativamente mediante el método de la o-cresoftaleina (A); Se analizó la diferenciación osteoblástica mediante expresión génica por qPCR de los marcadores *Bmp2*, *Runx2*, *Bglap* y *Calu*. Cada ensayo se realizó, al menos 3-4 veces en duplicados o triplicados técnicos. \*, Significación estadística ( $p < 0,05$ ) comparada con CMLVr-WT en el mismo punto temporal; barras blancas, CMLVr-WT; barras negras, CMLVr-LOX.

### 3.2.2. La sobreexpresión de LOX regula la expresión de colágeno y de otras enzimas hidroxilasas

Además del análisis fenotípico (expresión de marcadores osteoblásticos) y funcional (mineralización de la MEC), se estudió el efecto de la sobreexpresión de LOX sobre la expresión de colágeno y genes relacionados incluyendo *Colla1*, *Plod1* y *LoxL1*. La sobreexpresión de *Plod1* ( $1,39 \pm 0,13$ ,  $p < 0,001$ , día 1) y *LoxL1* ( $1,38 \pm 0,24$ ,  $p = 0,006$ , día 1) en CMLVr-LOX fue temporalmente anterior a la de *Colla1* ( $5,37 \pm 2,87$ ;  $p < 0,001$ , día 3) (**Figura 50**). Además, la sobreexpresión de *Colla1* parece ser transitoria, ya que a día 6 su expresión fue reprimida de forma estadísticamente significativa ( $0,22 \pm 0,06$ ;  $p < 0,001$ , día 6).

La expresión de *Lox* ante la sobreexpresión de *LOX* resultó en una regulación negativa.

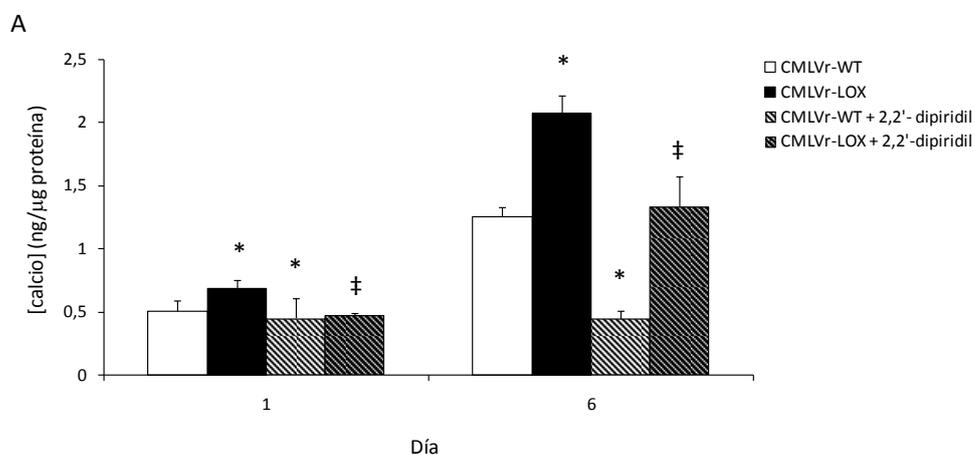


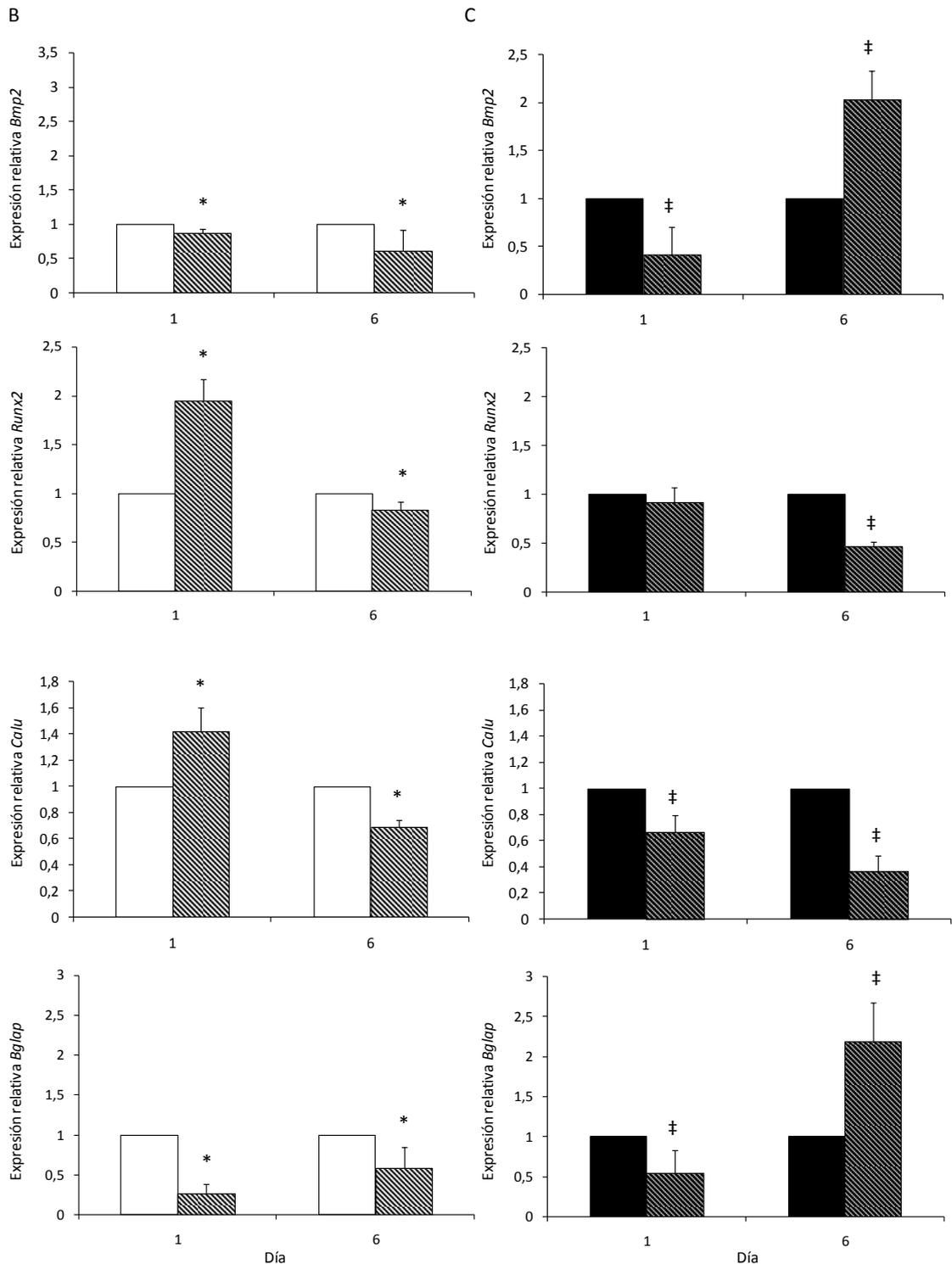
**Figura 50. Efecto de la sobreexpresión de LOX sobre la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de MEC.** Se analizó la expresión génica por qPCR de los genes *Col1a1*, *Lox*, *Plod1* y *Lox11*. Se comparó el efecto de la HPM sobre CMLVr-LOX, comparando con CMLVr-WT (control), para cada punto temporal. Cada ensayo se realizó, al menos 3-4 veces ( $n=3-4$ ) en duplicados o triplicados técnicos. \*, Significación estadística ( $p < 0,05$ ). Barras blancas, CMLVr-WT; barras negras, CMLVr-LOX.

### 3.2.3. La inhibición de la actividad PLOD reduce la calcificación y osteodiferenciación dependientes de HPM en la CMLVr-WT y CMLVr-LOX

Se estudió si la funcionalidad de *Plod*, al igual que *Lox*, se asocia con la mineralización y la diferenciación osteoblástica de la CMLVr. Para ello, el medio osteogénico HPM fue suplementado con 2,2'-dipiridil. Tanto CMLVr silvestres (CMLVr-WT) como transgénicas (CMLVr-LOX) fueron tratadas durante 1 y 6 días (Barsh GS y cols., 1981; Nabavi N y cols., 2008). La suplementación de 2,2'-dipiridil

resultó en un menor grado de mineralización valorado cuantitativamente (ng calcio/ $\mu$ g proteína) en CMLVr silvestres ( $1,25 \pm 0,07$  vs.  $0,44 \pm 0,06$ ;  $p < 0,001$ , a día 6) y transgénicas ( $0,69 \pm 0,06$  vs.  $0,47 \pm 0,02$ ;  $p = 0,021$ , a día 1) ( $2,08 \pm 0,14$  vs.  $1,33 \pm 0,24$ ;  $p = 0,014$ , a día 6) (**Figura 51 A**). Además, se redujo globalmente la expresión de los marcadores de diferenciación osteoblástica en el día 6 en la CMLVr-WT (**Figura 51 B**). Sin embargo, en las CMLVr-LOX el efecto protector sobre el programa de diferenciación osteoblástica únicamente se pudo describir en el día 1; en el día 6, *Bglap* y *Bmp2* se sobreexpresaron significativamente (**Figura 51 C**). Por tanto, el mayor beneficio, en términos de prevención de mineralización y diferenciación, se obtuvo en CMLVr silvestres. Estos datos sugieren que *Plod*, como *Lox*, debe jugar un papel fundamental en los estadios de formación de MEC mineralizable y la diferenciación osteoblástica de la CMLV. Las diferencias observadas para CMLVr silvestres o transgénicas deben resultar de las diferentes tasas intrínsecas de transdiferenciación celular y mineralización (**Figura 49**). Por tanto, la regulación de los genes relacionados con la biosíntesis de la MEC debe ser fundamental en las etapas tempranas de la calcificación.

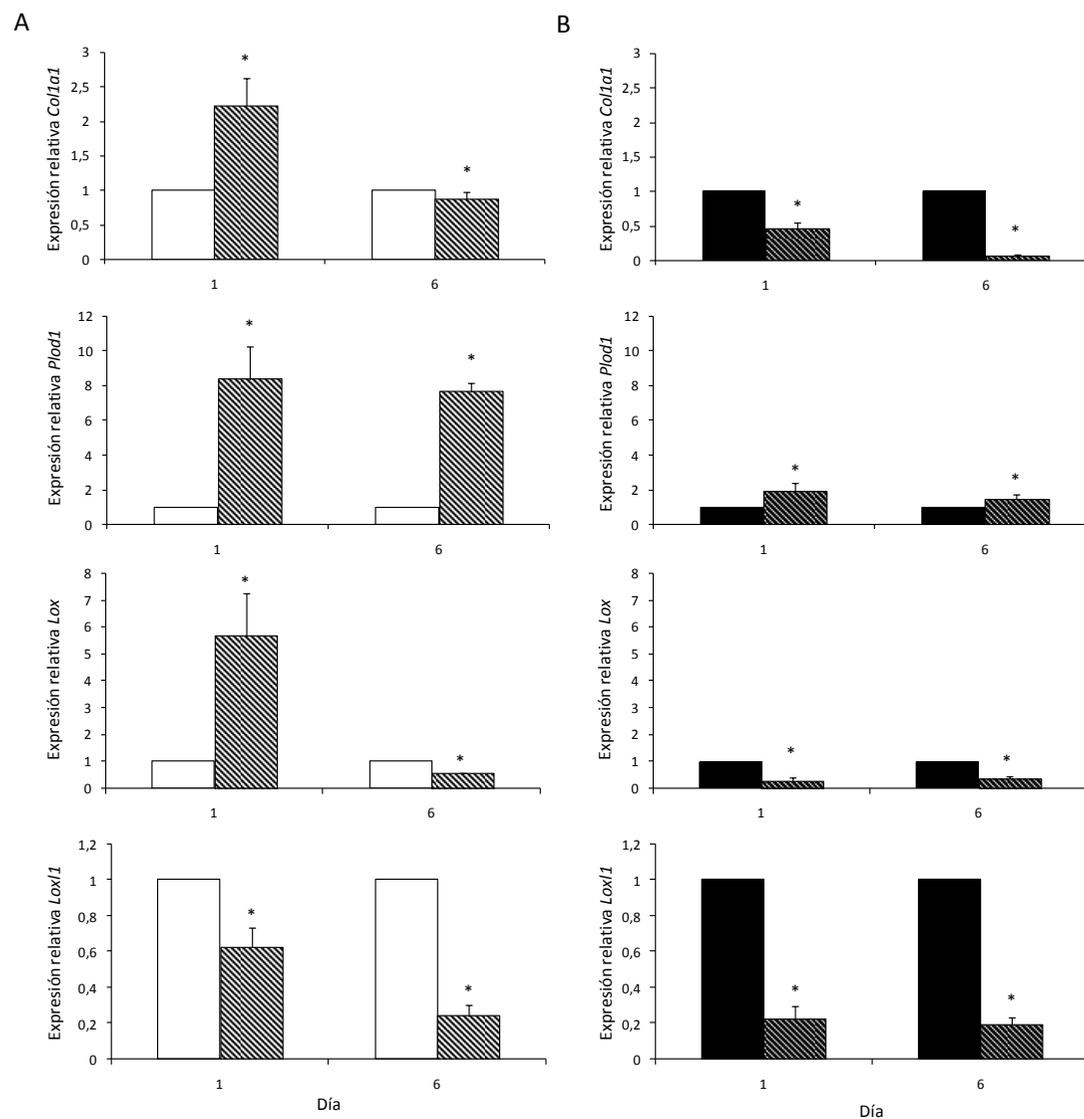




**Figura 51. Efecto del 2,2'-dipiridil sobre la mineralización y diferenciación osteoblástica de CMLVr silvestre (CMLVr-WT) y transgénica (CMLVr-LOX).** Se suplementó el medio osteoinductor HPM con 2,2'-dipiridil tanto en CMLVr-WT como CMVLr-LOX. Se utilizó el medio HPM como control de calcificación y se suplementó con 2,2'-dipiridil para estudiar el efecto sobre la calcificación vascular atendiendo a la mineralización de la MEC (A), y a la expresión génica de los marcadores de diferenciación osteoblástica en el modelo de CMLVr-WT (B) y en el de CMLVr-LOX (C). Cada ensayo se realizó, al menos 3 veces (n = 3) en duplicados o triplicados técnicos. Cada punto temporal se comparó

con su respectivo control. Barras blancas, CMLVr-WT control para HPM; barras blancas con líneas diagonales, CMLVr-WT tratada con HPM y suplementada con 2,2'-dipiridil; Barras negras, CMLVr-LOX control para HPM; barras negras con líneas diagonales, CMLVr-LOX tratada con HPM y suplementada con 2,2'-dipiridil. Asteriscos, significación estadística ( $p < 0,05$ ) al comparar con la CMLVr-WT; ‡, significación estadística ( $p < 0,05$ ) al comparar con CMLVr-LOX.

Además, el estudio de la expresión génica de *Plod1* en CMLVr tratadas con 2,2'-dipiridil sugiere una la regulación compensatoria (**Figura 52**), independientemente de la sobreexpresión de LOX. El efecto global sobre las expresiones de *Coll1a1*, *Lox* y *Lox1l* fue semejante tras 6 días de exposición a la condición de HPM. Tras 6 días de suplementación con 2,2'-dipiridil se obtuvo una menor expresión de *Lox*, *Lox1l* y *Coll1a1*, si bien se observa una regulación diferencial temprana dependiendo del modelo celular seleccionado.

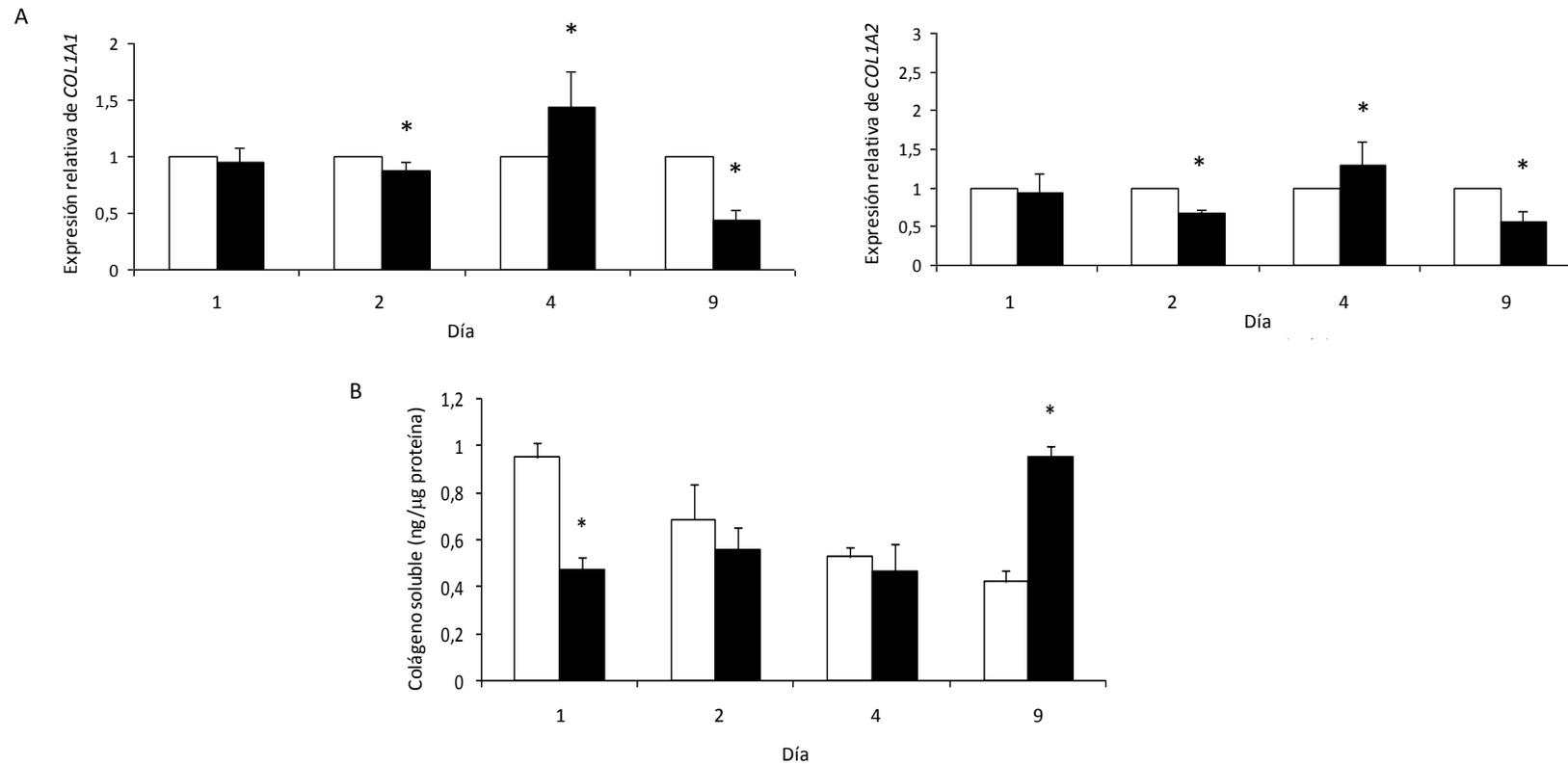


**Figura 52. Efecto de 2,2'-dipiridil sobre la expresión génica de reguladores de la biosíntesis de MEC en dos modelos de calcificación de CMLV de ratón.** Se suplementó el medio osteoinductor HPM con 2,2'-dipiridil. Se estudió los patrones de expresión génica relacionada con la biosíntesis de MEC, incluyendo *Coll1a1*, *Plod1*, *Lox* y *Lox11*, tanto en CMLVr silvestre (CMLVr-WT) (A) como en CMLV transgénica sobreexpresando LOX (CMLVr-LOX) (B). Cada ensayo se realizó, al menos 3 veces ( $n = 3$ ) en duplicados o triplicados técnicos. Cada punto temporal se comparó con su respectivo control. Barras blancas, CMLVr-WT control para HPM; barras blancas con líneas diagonales, CMLVr-WT tratada con HPM y suplementada con 2,2'-dipiridil; Barras negras, CMLVr-LOX control para HPM; barras negras con líneas diagonales, CMLVr-LOX tratada con HPM y suplementada con 2,2'-dipiridil. Asteriscos, significación estadística ( $p < 0,05$ )

### 3.3. CONFIRMACIÓN DE LA REGULACIÓN DE LOX Y PLOD EN CÉLULA DE MÚSCULO LISO VASCULAR HUMANA SOMETIDA A HIPERFOSFATEMIA

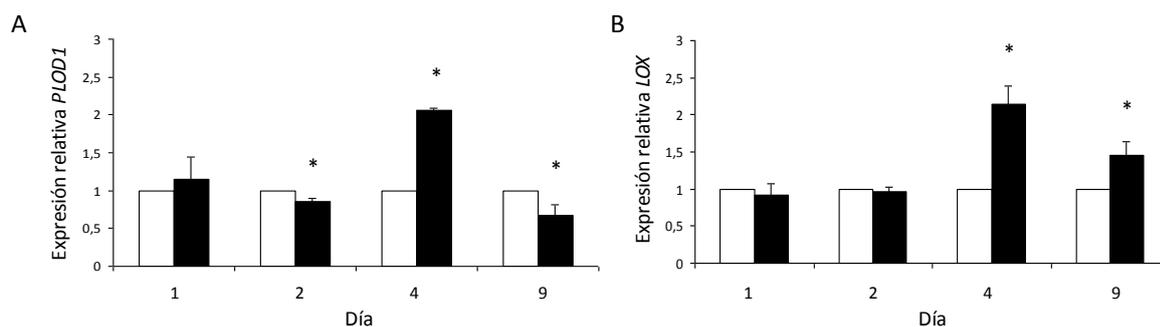
#### 3.3.1. Efecto de la hiperfosfatemia sobre la regulación del colágeno y la expresión de enzimas implicadas en su biosíntesis

Los hallazgos derivados del estudio en los modelos de CMLVr fueron posteriormente confirmados en CMLV humana (CMLVh). El efecto de la HPM sobre la CMLVh ya fue evidenciado en las secciones anteriores (*Objetivo 1, Sección 1.3*). El colágeno tipo I consiste en una estructura heterotrimérica que consta de dos cadenas pro- $\alpha$ 1 y una cadena pro- $\alpha$ 2 entrelazadas formando una triple hélice levógira. Desequilibrios en la expresión y síntesis de estas cadenas se han asociado con estados patológicos. Por ello, en este estudio de aplicación en CMLVh se estudió el patrón temporal de expresión tanto *COL1A1* como de *COL1A2*, para evidenciar expresiones aberrantes de alguno de los componentes. Como en osteoblastos, la expresión del colágeno está regulada temporalmente. Así, *COL1A1* y *COL1A2* se sobreexpresaron transitoriamente en el día 4 ( $1,44 \pm 0,31$ ;  $p = 0,013$ ;  $1,30 \pm 0,30$ ;  $p = 0,03$ , respectivamente) (**Figura 53 A**). Además, se estudió la síntesis *de novo* de colágeno durante la transdiferenciación de las CMLVh. Para ello, se analizó el contenido de colágeno soluble total en los medios sobrenadantes en diferentes puntos temporales (día 1, 2, 4 y 9). Es necesario remarcar que en condiciones normales el colágeno soluble secretado hacia el espacio extracelular en 3-4 días se insolubiliza, por lo que los valores esperados para cada punto temporal, incluso en las condiciones control, no tienen porqué mantenerse homogéneas a lo largo del tiempo. Es por ello, que cada condición experimental se comparó con su propio control. La condición experimental HPM resultó en una concentración de colágeno significativamente mayor que la determinada para la condición control en el día 9 ( $0,69 \pm 0,11$  vs.  $0,42 \pm 0,05$  ng colágeno /  $\mu$ g proteína,  $p = 0,028$ ) (**Figura 53 B**).



**Figura 53. La HPM se asocia con la regulación transitoria de la expresión y secreción de colágeno en CMLVh tratada con HPM.** Expresión génica de las cadenas pro- $\alpha$ 1 y pro- $\alpha$ 2 valorada por qPCR (A); Secreción de colágeno soluble (colágeno *de novo*) hacia el espacio extracelular (B). Cada punto temporal se comparó con su propio control. Barras blancas, condición control (normofosfatemia); barras negras, condición experimental HPM. Asterisco, significación estadística ( $p < 0,05$ )

Otros genes relacionados con la biosíntesis de la MEC también fueron regulados en el modelo de calcificación vascular de CMLVh desarrollado en esta Tesis. *LOX* y *PLOD1* también se sobreexpresaron transitoriamente en el día 4 ( $2,15 \pm 0,25$ ;  $p = 0,001$ ;  $2,06 \pm 0,03$ ;  $p < 0,001$ , respectivamente) (**Figura 54**). Estos datos sugieren una regulación temprana de diferentes miembros de la biosíntesis y maduración del colágeno y la MEC. De este modo queda justificada la posterior utilización de inhibidores químicos de las actividades enzimáticas que contribuyen al ensamblaje, estabilización y entrecruzamiento de la MEC (2,2'-dipiridil y BAPN). Cada experimento se repitió al menos tres veces de forma independiente ( $n = 3$ ), y cada experimento incluyó duplicados o triplicados técnicos para cada condición experimental. Para la valoración del colágeno soluble presente en los sobrenadantes celulares se realizaron 2 experimentos independientes definitivos con cuadruplicados técnicos cada uno que confirmaron los resultados preliminares encontrados durante la optimización del protocolo.

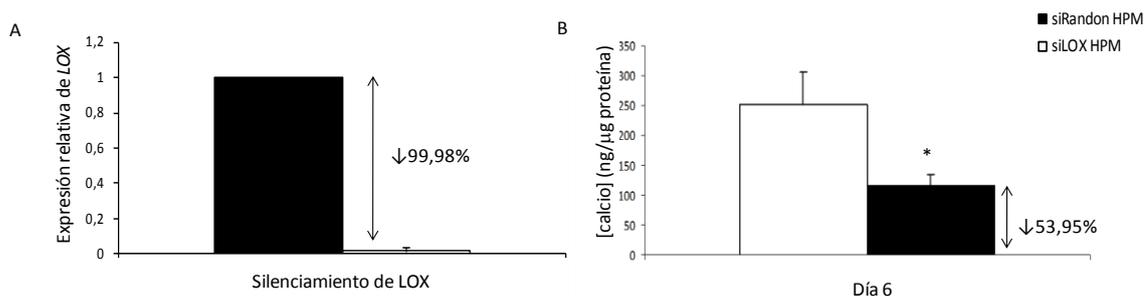


**Figura 54. Efecto de la HPM sobre la expresión génica de PLOD1 y LOX durante la calcificación de la CMLVh.** Patrón temporal de expresión génica de PLOD1 (A) y LOX (B) durante la osteodiferenciación por HPM de la CMLVh. Cada experimento se repitió al menos tres veces de forma independiente ( $n = 3$ ) utilizando duplicados o triplicados técnicos. Cada punto temporal incluyó su propio control. Barras blancas, condición control; barras negras, condición experimental HPM. Asteriscos, significación estadística ( $p < 0,05$ ) entre la condición experimental y el control para cada punto temporal.

### 3.3.2. Efecto de la regulación química de las actividades enzimáticas PLOD y LOX sobre la mineralización y la diferenciación osteoblástica de la CMLVh sometida a HPM

❖ **La inhibición de PLOD y LOX reduce la calcificación dependiente de HPM en la CMLVh**

Se realizó silenciamiento de la expresión de LOX en CMLVh que fueron sometidas a la condición experimental HPM durante 1 y 6 días. Se estudió el efecto de tal silenciamiento sobre la mineralización (**Figura 55 A**). El contenido de calcio se redujo un 53,9% en las CMLVh silenciadas para LOX (siLOX) comparado con las CMLVh transfectadas con una secuencia control ‘siRandom’ (**Figura 55 B**), tras 6 días de tratamiento. Sin embargo, el contenido de calcio (ng/μg proteína total) aumentó considerablemente al comparar con CMLVh no transfectadas y también sometidas a HPM durante el mismo tiempo ( $252,25 \pm 54,09$  vs.  $3,04 \pm 0,21$  ng  $\text{Ca}^{2+}$ /μg proteína;  $p = 0,025$ ). Este aumento masivo del grado de mineralización podría interferir en la interpretación de los resultados para los puntos temporales seleccionados.

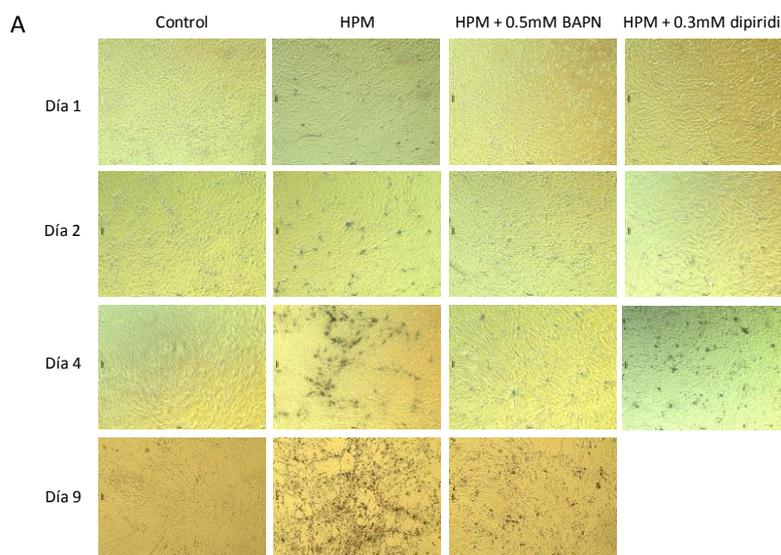


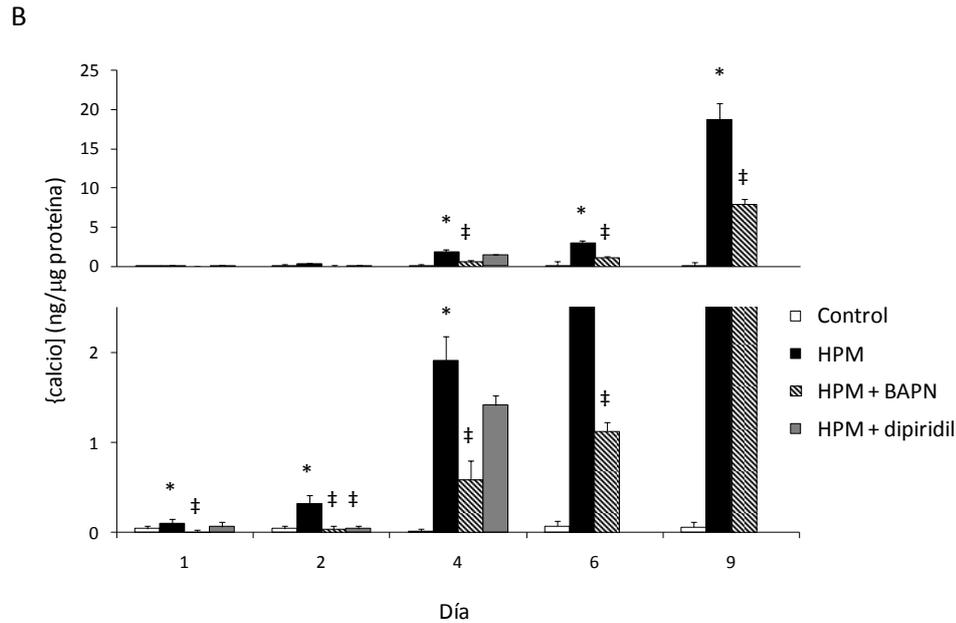
**Figura 55. El silenciamiento de LOX inhibe la calcificación vascular.** Se valoró la efectividad del silenciamiento de LOX en CMLVh mediante qPCR (A); se estudió su efecto sobre la calcificación vascular mediante valoración de la mineralización (B). Se realizaron tres silenciamientos independientes y efectivos por triplicado. Asterisco, significación estadística ( $p < 0,05$ ).

Para evitar efectos secundarios no deseados debidos al aumento en calcificación, se inhibió químicamente las actividades LOX y PLOD mediante la utilización de BAPN y 2,2'-dipiridil, respectivamente. Se registró la mineralización en las diferentes condiciones experimentales mediante microscopia de luz convencional. Los depósitos minerales aparecen como depósitos oscuros dispuestos sobre la monocapa celular (**Figura 56 A**). Adicionalmente se valoró el contenido de calcio mediante el método de la *o*-cresofatleína. (**Figura 56 B**). Ambos inhibidores químicos de las actividades hidroxilasas redujeron significativamente la calcificación dependiente de HPM en los

días 1 y 2. BAPN, además fue llevado hasta los días 4 y 9. Sin embargo, 2,2'-dipiridil no pudo llevarse más allá de 2-3 días dada la drástica reducción de la viabilidad celular. La muerte masiva resultante de la utilización prolongada de 2,2'-dipiridil debió resultar en la calcificación masiva de la CMLVh descrita en el día 4 y y la pérdida del marcador de CMLV, SM22- $\alpha$  (ver más adelante) comparable con el control de HPM, sin bien esto no se ha contrastado (**Figura 56 A y B**).

BAPN redujo en un 87% la mineralización en los días 1 y 2. El efecto protector fue perdiéndose progresivamente a medida que aumentó el tiempo de exposición a la HPM, siendo del 57,30% en el día 9 (**Figura 56 A y B**). Estos resultados sugieren que BAPN es capaz de inhibir temporalmente la calcificación, posponiéndola, pero no inhibiéndola por completo. De hecho, estudios realizados durante la osteogénesis fisiológica han demostrado que la MEC contribuye en un 30% al proceso global de la osificación (Burdan F y cols., 2009). Además, recientemente se ha descrito que osteocalcina regula positivamente la mineralización (Idelevich A y cols., 2011), por lo que pese a la inhibición de la síntesis de MEC, las CMLV en proceso de osteodiferenciación podrían conducir hacia la calcificación vascular igualmente. En el día 6, la reducción de la calcificación mediada por BAPN fue de un 62,77%, similar a la reducción obtenida por el silenciamiento de LOX pero sin la afectación en el número celular.





**Figura 56. La inhibición química de las actividades PLOD y LOX inhibe la mineralización dependiente de HPM en la CMLVh.** Imágenes de microscopía convencional de luz en CMLVh tratadas en condiciones control, HPM e HPM suplementada con 2,2'-dipiridil o BAPN (A); cuantificación colorimétrica del contenido de calcio en las mismas condiciones (B). Cada experimento se repitió 4 veces de forma independiente para 2,2'-dipiridil (n =4) y 3 veces para BAPN (n = 3) utilizando duplicados o triplicados técnicos. Asteriscos, significación estadística comparado con el control en cada punto temporal; ‡, significación estadística ( $p < 0,05$ ) comparando con la condición HPM para cada punto temporal.

❖ ***La inhibición de PLOD y LOX se asocia con una menor diferenciación osteoblástica de la CMLVh sometida a HPM***

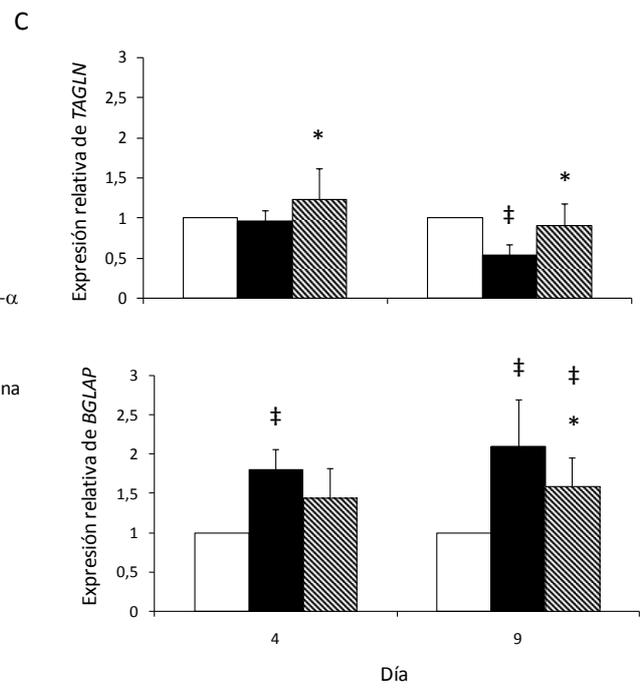
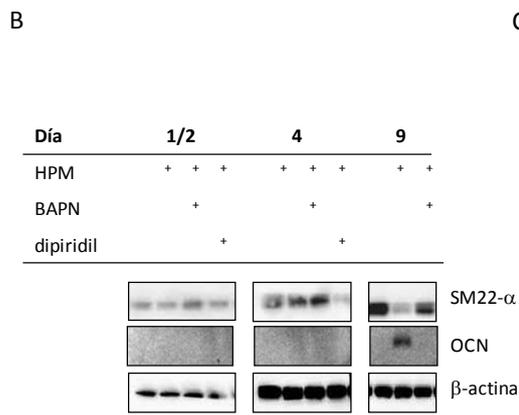
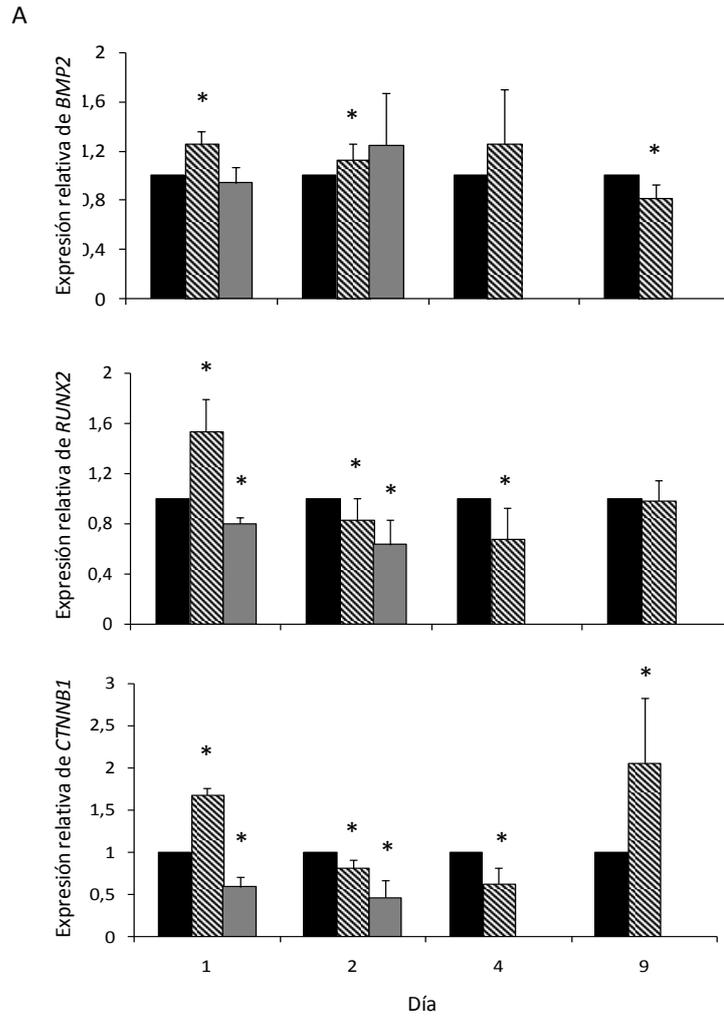
Además de estudiar el efecto de la inhibición de las actividades LOX y PLOD sobre la mineralización, se analizó el efecto sobre la regulación del programa de diferenciación osteoblástica. Se realizó estudios de expresión génica por qPCR de diferentes FEO incluyendo *BMP2*, *RUNX2*, *CTNNB1*. A excepción del 2,2'-dipiridil, se estudiaron los patrones de expresión de éstos a diferentes puntos temporales (día 1, 2, 4 y 9) para cada condición experimental ensayada comparada con su propio control. Para 2,2'-dipiridil únicamente se analizaron los datos de expresión de los días 1 y 2, dado que a día 4 se observó una pérdida del efecto protector asociada con una muerte celular importante y una calcificación masiva, como se ha comentado con anterioridad. Además, dado que 2,2'-dipiridil se preparó en una solución hidroalcohólica, sus controles fueron preparados con la misma proporción de solución hidroalcohólica y no

mostraron diferencias significativas de viabilidad, mineralización u expresión génica con los controles HPM convencionales (datos no mostrados).

La expresión de *RUNX2* se redujo significativamente en las CMLVh suplementadas con 2,2'-dipiridil durante los días 1 ( $0,80 \pm 0,04$ ;  $p < 0,001$ ) y 2 ( $0,63 \pm 0,20$   $p < 0,001$ ). Lo mismo ocurrió con la expresión de *CTNNB1* en los días 1 ( $0,59 \pm 0,12$ ;  $p < 0,001$ ) y 2 ( $0,46 \pm 0,20$ ;  $p < 0,001$ ) comparado con el control de HPM (**Figura 57 A**). No se encontraron diferencias significativas para la expresión de *BMP2*. Los valores de SM22- $\alpha$  analizados por western blot en extractos celulares recogidos en los días 1, 2 y 4 demostraron la pérdida de marcadores de fenotipo CMLV (**Figura 57 B**), de acuerdo con la reversión del papel protector de 2,2'-dipiridil sobre la calcificación (ver **Figura 56**).

La adición de BAPN se asoció con una disminución significativa de la expresión de *BMP2* únicamente en el día 9 comparado con el control HPM ( $0,82 \pm 0,10$ ;  $p = 0,041$ ). Sin embargo, la expresión de *RUNX2* fue significativamente menor desde el día 2 ( $0,83 \pm 0,17$ ;  $p = 0,039$ ) al día 4 ( $0,68 \pm 0,25$ ;  $p = 0,010$ ) (**Figura 57 A**). *CTNNB1* se sobreexpresó en los días 1 y 9 ( $1,68 \pm 0,09$ ;  $p < 0,001$ ) y ( $2,06 \pm 0,76$ ;  $p = 0,007$ ), respectivamente. La represión de *DKK1* sobre la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina o la activación de otras BMP no analizadas en este trabajo podría explicar la regulación negativa de *RUNX2*. Dada la participación activa de la  $\beta$ -catenina durante la diferenciación osteoblástica, promoviendo la expresión de *SP7/Osterix*, osteocalcina y ALP (Hill TP y cols., 2005; Beazley KE y cols., 2013; Rifas L y cols., 2003), los resultados sugieren que BAPN debe posponer la transdiferenciación osteoblástica. La MEC debe contribuir al proceso global de calcificación vascular, incluyendo la diferenciación osteoblástica y la disponibilidad de un sustrato susceptible de mineralización, como ocurre en el hueso.

Finalmente, se valoró la expresión y síntesis de SM22- $\alpha$  y osteocalcina en las diferentes condiciones experimentales de HPM (**Figura 57 B y C**). La adición de BAPN a la condición HPM resultó en una expresión y síntesis inversamente proporcional de ambos marcadores fenotípicos (**Figura 57 C y B**, respectivamente), en concordancia con la protección frente a la mineralización observada (ver **Figura 56**). Desgraciadamente, esta información no pudo ser evidenciada en la inhibición química de la actividad PLOD, debido a la muerte celular y calcificación masivas reportadas para tratamientos a largo plazo con 2,2'-dipiridil.

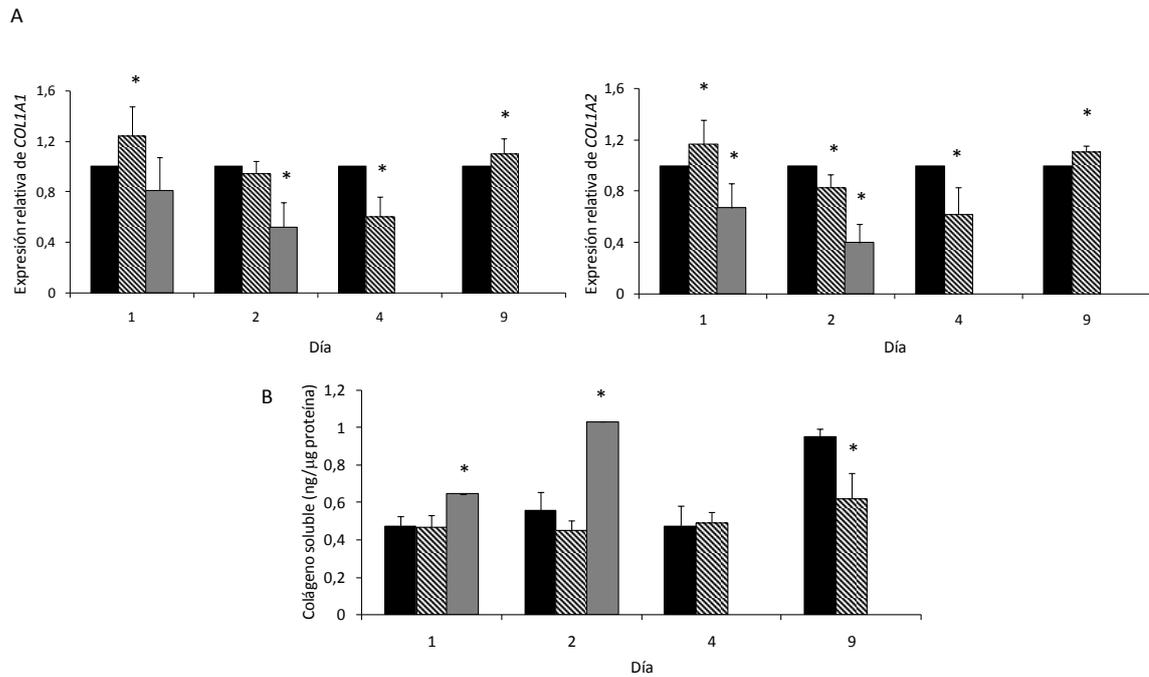


**Figura 57. La inhibición de las actividades PLOD y LOX se asocia con una menor diferenciación osteoblástica de la CMLVh.** La condición HPM fue utilizada como control (barras negras) y fue suplementada con 2,2'-dipiridil (barras grises) o BAPN (barras líneas diagonales) para comparar la expresión génica de los marcadores de diferenciación osteoblástica (A); se incluyó un control negativo de calcificación (normofosfatemia, barras blancas) para el estudio de los marcadores fenotípicos SM22- $\alpha$  y osteocalcina (OCN) por western blot (B) o expresión génica mediante qPCR (C). Cada experimento se repitió tres veces de forma independiente (n = 3) utilizando duplicados técnicos. Asteriscos, significación estadística (p < 0,05) al comparar con el control HPM; ‡, significación estadística al comparar con el control negativo o normofosfatemia.

❖ **Regulación de la síntesis de novo de MEC mediada por la inhibición química de las actividades LOX y PLOD**

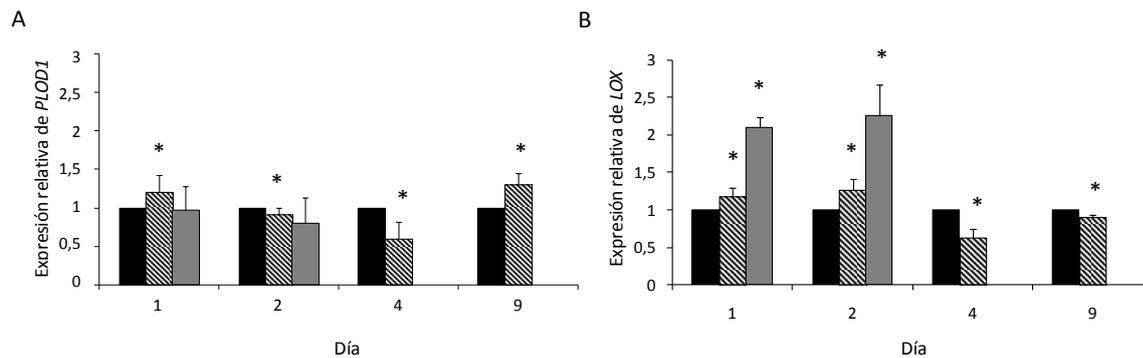
Se estudió la expresión de colágeno y su producción *de novo* en CMLVh tratadas con 2,2'-dipiridil y BAPN. Además, se evaluó la regulación compensatoria de la expresión génica de *PLOD* y *LOX* en CMLVh tratada con los inhibidores químicos de dichas actividades enzimáticas, 2,2'-dipiridil y BAPN, respectivamente.

A nivel de expresión génica, ninguno de los inhibidores (2,2'-dipiridil o BAPN) se asoció con un desequilibrio entre *COL1A1* y *COL1A2*. La expresión génica de *COL1A1* y *COL1A2* fue significativamente menor en las CMLVh tratadas con 2,2'-dipiridil. Sin embargo, el tratamiento con BAPN mostró una expresión variable a diferentes puntos temporales, siendo significativamente mayor en los días 1 y 9 (**Figura 58 A**). Para una mejor caracterización de la participación de las enzimas PLOD y LOX en la calcificación de pendiente de HPM, se estudió el efecto de 2,2'-dipiridil y BAPN sobre los valores de colágeno soluble como indicador de la síntesis *de novo* de colágeno. El tratamiento con 2,2'-dipiridil se asoció con una mayor síntesis de colágeno (0,65  $\pm$  0,25 vs. 0,47  $\pm$  0,06 ng colágeno/ $\mu$ g proteína, p = 0,032 día 1; y 1,03  $\pm$  0,13 vs. 0,56  $\pm$  0,10 ng colágeno/ $\mu$ g proteína, p = 0,041 día 2). La síntesis *de novo* de colágeno para cada punto temporal fue similar entre la condición control HPM y BAPN, excepto a día 9 cuando se registró una mayor síntesis de colágeno en las CMLVh tratadas con HPM (0,62  $\pm$  0,14 vs. 0,95  $\pm$  0,04 ng colágeno soluble/ $\mu$ g proteína, p = 0,049) (**Figura 58 B**).



**Figura 58.** La inhibición de las actividades PLOD y LOX se asocia con una regulación de la expresión génica y la síntesis *de novo* de colágeno. Expresión génica de las dos cadenas del colágeno (*COL1A1* y *COL1A2*) (A); secreción y síntesis *de novo* de colágeno valorado por método colorimétrico del Sircol utilizando medios sobrenadantes (B). Barras negras, control HPM; barras líneas diagonales, HPM suplementada con BAPN; barras grises, HPM suplementada con 2,2'-dipiridil. Cada experimento se repitió tres veces de forma independiente (n = 3) utilizando duplicados de cada condición experimental para la expresión génica, mientras que se realizaron 2 experimentos independientes para la valoración de colágeno soluble con cuadruplicados técnicos para cada condición experimental. Asterisco, significación estadística ( $p < 0,05$ ) al comparar cada punto temporal con su respectivo control HPM.

Adicionalmente, se analizó las expresiones génicas de *COL1A1*, *COL1A2*, *LOX* y *PLOD1* en los condicionamientos de HPM suplementados con 2,2'-dipiridil y BAPN. De este modo, se comprobó si 2,2'-dipiridil o BAPN se asocian con la regulación compensatoria de *PLOD1* y *LOX* como respuesta a la inhibición de su funcionalidad (**Figura 59**), como se observó para CMLVr. La adición de 2,2'-dipiridil a la condición HPM incrementó significativamente la expresión de *LOX* ( $2,11 \pm 0,14$ ;  $p < 0,001$  en día 1) y ( $2,26 \pm 0,41$ ;  $p < 0,001$  en día 2), pero no hubo cambios significativos para la expresión génica de *PLOD1*. Por otro lado, la adición de BAPN indujo la sobreexpresión temprana de *LOX* (en los días 1 y 2), probablemente como un mecanismo de compensación.



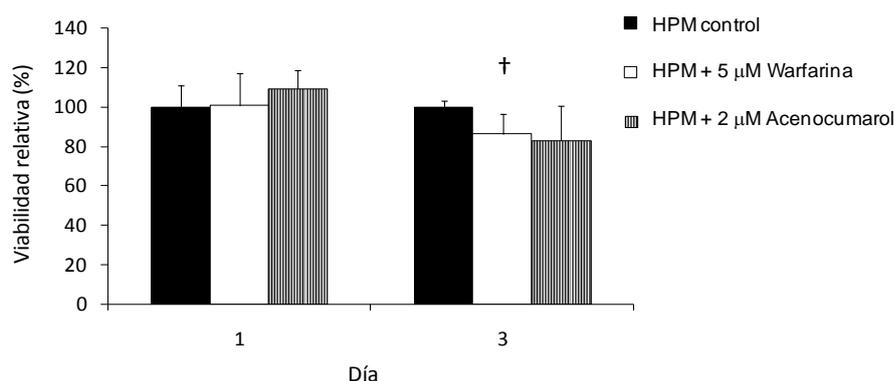
**Figura 59. La inhibición de LOX induce mecanismos de regulación compensatoria.** Efecto de 2,2'-dipiridil y BAPN sobre la expresión génica de *PLOD1* (A) y *LOX* (B). Barras negras, control HPM; barras líneas diagonales, HPM suplementada con BAPN; barras grises, HPM suplementada con 2,2'-dipiridil. Cada experimento se repitió tres veces de forma independiente ( $n = 3$ ) utilizando duplicados de cada condición experimental y en cada muestra se estudió la expresión génica de *PLOD1* y *LOX*. Asterisco, significación estadística ( $p < 0,05$ ) al comparar cada punto temporal con su respectivo control HPM.

La discrepancia entre los resultados de expresión génica de *COL1A1* y *COL1A2* con los valores de colágeno secretado sugiere una rápida sobreexpresión de colágeno en las CMLVh tratadas con 2,2'-dipiridil, la alteración del correcto ensamblaje, su acumulación extracelular y una insolubilización retrasada. La sobreexpresión de *LOX* observada para el condicionamiento con 2,2'-dipiridil debe gestionar el procesamiento extracelular de insolubilización del colágeno acumulado. Por otro lado, la adición de BAPN indujo la regulación temporal de los genes del colágeno, sin afectación de los valores de colágeno soluble en los diferentes puntos temporales estudiados. Esto sugiere un papel regulador de LOX sobre el ensamblaje y la retención del colágeno sintetizado *de novo*. Además, la menor disponibilidad de colágeno soluble podría resultar de la menor expresión de *COL1A1* y *COL1A2* reportada en los puntos temporales iniciales.

#### 4. COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS DE WARFARINA Y ACENOCUMAROL, SOBRE LA MINERALIZACIÓN Y ACTIVACIÓN DEL PROGRAMA DE DIFERENCIACIÓN OSTEOBLÁSTICA, EN UN MODELO DE CALCIFICACIÓN VASCULAR EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CMLVH

Ninguno de los fármacos anti-vitamina k produjo una disminución significativa en la viabilidad, medida por el contenido de DNA mediante el ensayo cristal violeta, a las dosis seleccionadas. Por tanto, las diferencias en la mineralización no deben resultar

de un incremento en la mortalidad celular a corto plazo. Se consideró la viabilidad del control HPM como el 100% de viabilidad en condiciones calcificantes. Las lecturas de HPM suplementada con 5  $\mu\text{M}$  warfarina sódica (HPM + 5  $\mu\text{M}$  warfarina), 2  $\mu\text{M}$  acenocumarol (HPM + 2  $\mu\text{M}$  acenocumarol) tras 1 y 3 días se relativizaron con las de la HPM. Las tendencias observadas tras 72 h nunca alcanzaron la significación estadística (HPM + 5  $\mu\text{M}$  warfarina:  $86,44 \pm 10,175$ ;  $p = 0,093$ ) (HPM + 2  $\mu\text{M}$  acenocumarol:  $82,88 \pm 17,593$ ;  $p = 0,165$ ) (**Figura 60**).



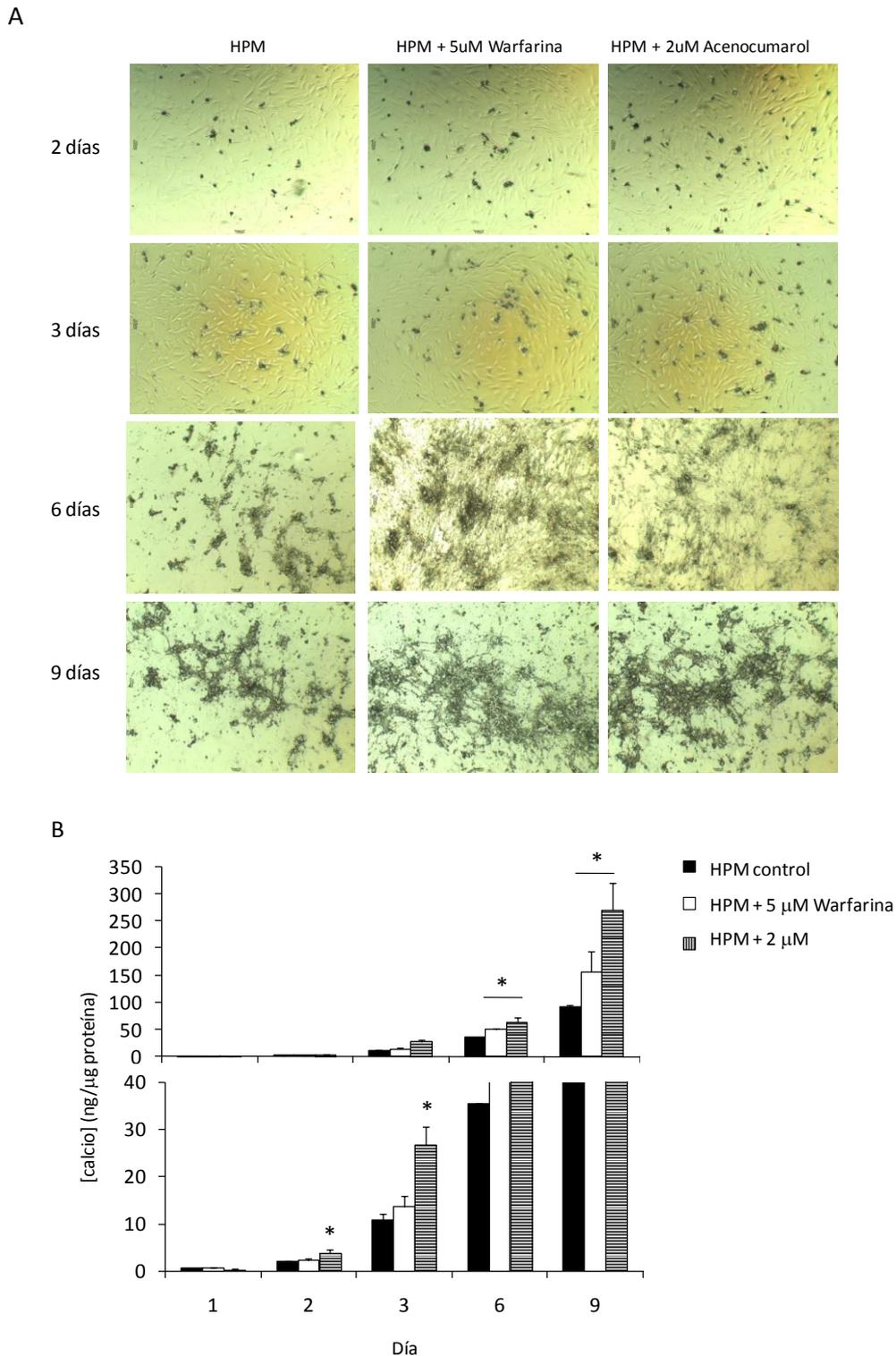
**Figura 60. Efecto de dosis sub-clínicas de fármacos anti-vitamina K sobre la viabilidad de la CMLV condicionada con HPM.** Cada experimento se repitió al menos 3 veces de forma independiente ( $n = 4-5$ ) utilizando cuadruplicados o quintuplicados técnicos para cada condición experimental. †, tendencia estadística no significativa ( $p = 0,093$ )

La utilización de warfarina, sin necesidad de incorporar una condición de HPM, es capaz *per se* de inducir calcificación (*Price PA y cols., 2006*), si bien la utilización de warfarina en medios deplecionados de SBF no es capaz de inducir calcificación. Esto explicaría, por qué no se observa mineralización en los puntos temporales seleccionados al comparar el condicionamiento de CMVL con y sin warfarina suplementada a medios conteniendo 5 veces menos SBF que en condiciones de mantenimiento y expansión celular. Por otro lado, algunos autores empleando medios deplecionados de SBF han sido capaces de registrar calcificación en condiciones de normofosfatemia y 10  $\mu\text{M}$  de warfarina. Estos trabajos se basan en la incorporación de 5-50  $\mu\text{M}$  warfarina y 1.4 mM de tampón fosfato (normofosfatemia) a medios basales comerciales tales como DMEM y M199. Estos medios, sin embargo, ya incluyen una concentración final de fosfatos de 1,0 mM, con lo que las condiciones reales finales serían hiperfosfatémicas con 2,4 mM de Pi (*Beazley y cols. 2012*). Varios estudios en humanos han demostrado la asociación

entre el uso de warfarina y el desarrollo de calcificación vascular (Palaniswamy C y cols., 2011) y una mejoría con la discontinuación de la terapia con warfarina (Spronk HM y cols., 2001).

#### 4.1. COMPARACIÓN DE LA POTENCIA PRO-CALCIFICANTE DE LOS DIFERENTES DERIVADOS CUMARÍNICOS SOBRE LA CMLV

Se valoró la funcionalidad osteoblástica de la CMLV transdiferenciadas mediante la cuantificación del contenido de calcio por análisis de imagen y cuantificación de extractos de HCl. De este modo se comparó el potencial pro-calcificante de los diferentes derivados anti-vitamina K. En la **Figura 61 A** se presenta la mineralización registrada por microscopia de luz durante 9 días. La dosis ajustada de acenocumarol (2  $\mu$ M) a los 5  $\mu$ M de warfarina sódica es aparentemente más potente induciendo mineralización que la warfarina. Adicionalmente, y dada la tendencia (no significativa) a una menor viabilidad tras 72 h de tratamientos, se valoró el contenido de calcio de extractos HCl mediante el ensayo de la *o*-cresoftaleína y normalización por el contenido de proteína total (**Figura 61 B**). El contenido de calcio en el día 2 fue significativamente mayor en las CMLV inducidas con acenocumarol, manteniéndose significativamente mayor desde el día 2 hasta el día 9 (**Tabla 20**). Los datos del presente trabajo sugieren que el uso combinado de acenocumarol e HPM debe acelerar significativamente la mineralización de la CMLV. Por tanto, la utilización de acenocumarol a 2  $\mu$ M en medios HPM, podría utilizarse como modelo acelerado para el estudio de los procesos de calcificación *in vitro* y el estudio del proceso patológico de calcificación vascular acelerado.



**Figura 61. Efecto de los compuestos anti-vitamina K sobre la mineralización de la CMLV.** Imágenes de microscopia de luz (A); valoración cuantitativa del calcio mediante ensayo de *o*-cresoftaleína y normalización por proteína total (B). Cada experimento se repitió 5 veces de forma independiente ( $n = 5$ ) utilizando triplicados de cada condición experimental. Cada condición experimental se comparó con su respectivo control HPM para cada punto temporal. Asterisco, significación estadística para la comparación con el control de HPM ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 20. Cuantificación del contenido de calcio extraído de monocapas celulares condicionadas con HPM e HPM suplementada con fármacos anti-vitamina K Ver Figura 67 B**

Condición experimental	Día	[Calcio] (ng/μg proteína)	P (*)	P (†)
HPM	1	0,58 ± 0,09		
	2	2,09 ± 0,04		
	3	10,90 ± 1,20		
	6	35,37 ± 0,21		
	9	90,88 ± 4,87		
HPM + 5 μM warfarina	1	0,58 ± 0,12	0,953	
	2	2,27 ± 0,47	0,526	
	3	13,64 ± 2,21	0,133	
	6	49,98 ± 1,40	<b>0,000</b>	
	9	156,37 ± 38,31	<b>0,042</b>	
HPM + 2 μM acenocumarol	1	0,36 ± 0,30	0,288	0,594
	2	3,76 ± 0,83	<b>0,032</b>	<b>0,038</b>
	3	26,93 ± 3,71	<b>0,002</b>	<b>0,006</b>
	6	63,75 ± 9,34	<b>0,006</b>	0,065
	9	270,63 ± 49,61	<b>0,006</b>	0,060

Negrita, valores P significativos tras análisis ANOVA. P(\*), valor P al comparar con HPM; P(†), valor P al comparar con HPM + 5 μM warfarina.

#### 4.2. EFECTO DE WARFARINA Y ACENOCUMAROL SOBRE LOS PATRONES DE ACTIVACIÓN DEL PROGRAMA DE DIFERENCIACIÓN OSTEABLÁSTICA EN LA CMLV

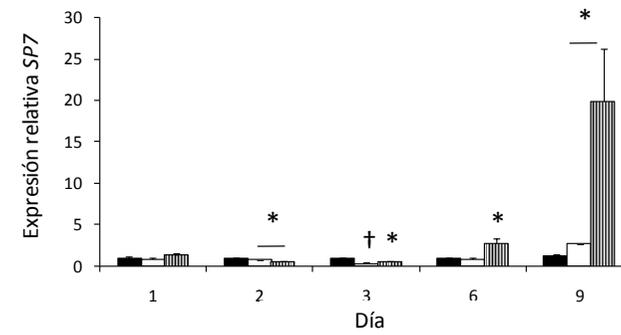
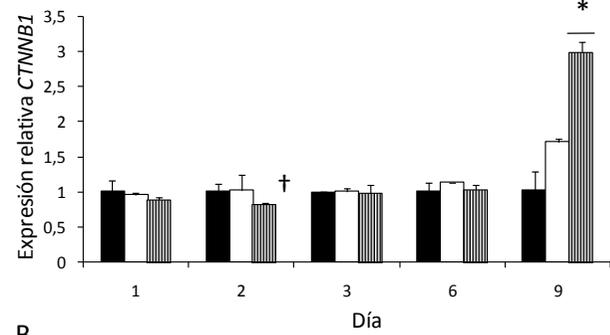
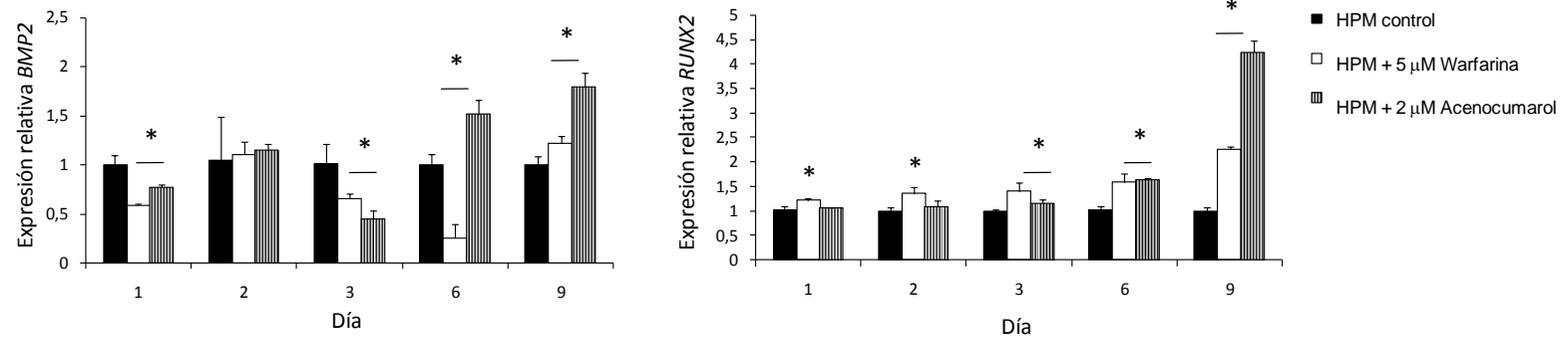
Se estudió la expresión génica de *BMP2*, *RUNX2*, *SP7* y *CTNNB1* para confirmar la activación del programa de diferenciación osteoblástica, en asociación con la mineralización, en los días 1, 2, 3, 6 y 9. El análisis ANOVA de los resultados de expresión génica sugiere ciertas diferencias en los patrones de expresión inducidos por uno y otro anti-vitamina K. *BMP2*, uno de los marcadores tempranos de diferenciación se mantuvo desregulado e incluso reprimido hasta el día 6, siendo significativamente sobreexpresado en el día 9. *RUNX2*, sin embargo, se mantuvo ligera y significativamente sobreexpresado durante los días 1-6, siendo mayor su expresión a día 9, sobre todo para acenocumarol. Esta sobreexpresión coincide con una extensa mineralización, que en HPM ya se asocia con la síntesis de osteocalcina (ver **Figura 33**

---

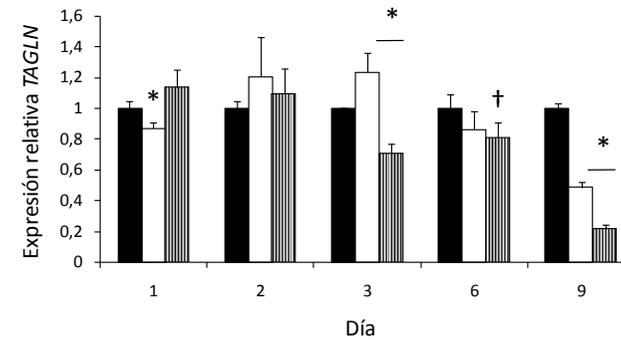
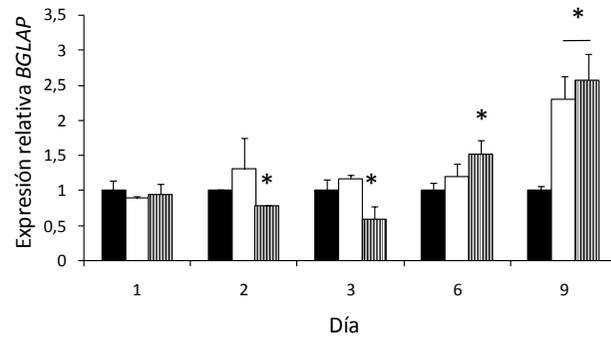
y **35A**). Este desequilibrio entre la expresión de *BMP2* y *RUNX2* podría sugerir una tendencia hacia la diferenciación osteoblástica con intermediarios condroblásticos, no estudiados específicamente en este trabajo. *RUNX2*, es un factor de transcripción que se sobreexpresa en las fases tempranas tanto de osteoblastos como condroblastos y solo *SP7/Osx* se sobreexpresa ulteriormente en osteoblastos. Además es bien conocido que el uso de fármacos anti-vitamina K, como la diabetes, la ERC y algunas patologías congénitas como PXE, se asocian con la calcificación de la media y un proceso de calcificación semejante a la osificación endocondral. *SP7* se sobreexpresó significativamente en el día 6, coincidiendo con el incremento de *BMP2* y *RUNX2*, indicando el cambio fenotípico. De nuevo, se observó una sobreexpresión concomitante entre *SP7* y *CTNNB1* (**Figura 62 A**).

Adicionalmente, se estudió los patrones de expresión génica de *TAGLN* y *BGLAP*. La expresión de *TAGLN*, el gen que codifica la proteína SM22- $\alpha$  (fenotipo CMLV) se reprimió significativamente más en las CMLV tratadas con anti-vitamina K que en HPM a partir del día 6, precediendo a la sobreexpresión de *BGLAP* que se alcanzó en los días 6 y 9, coincidiendo con *BMP2* y *SP7* (**Figura 62 B**).

A



B

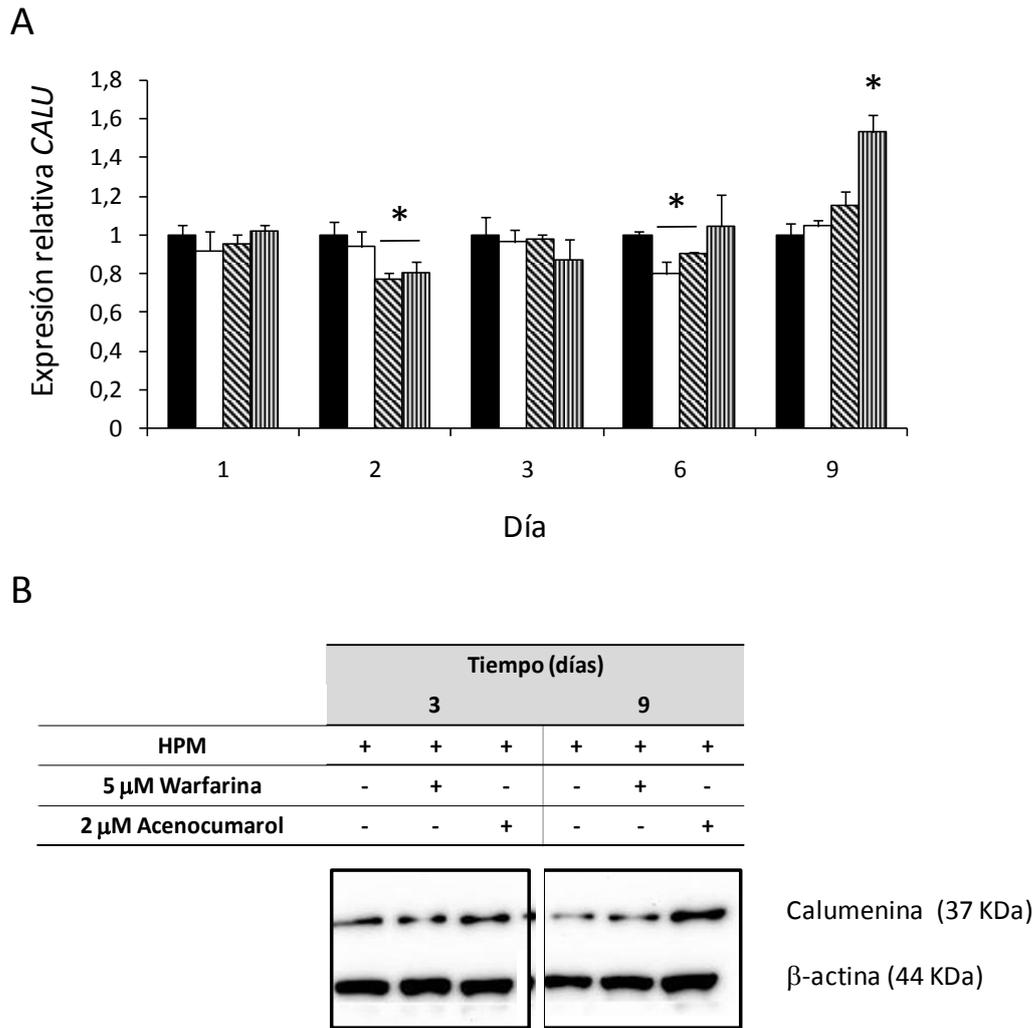


---

**Figura 62. Efecto de los compuestos anti-vitamina K en la diferenciación de la CMLV.** Expresión génica de los FEO (*BMP2*, *RUNX2*, *CTNNA1* y *SP7*) (A). Cambio temporal dependiente de la expresión génica de marcadores fenotípicos *TAGLN* (fenotipo CMLV) y *BGLAP* (fenotipo osteoblástico) (B). Tras el estudio funcional de mineralización, la expresión génica se estudió en muestras de 2 experimentos independientes (n=2) incluyendo triplicados de cada condición experimental. \*, Significación estadística ( $p < 0,05$ )

#### **4.3. EFECTO DE WARFARINA Y ACENOCUMAROL SOBRE LA EXPRESIÓN Y SÍNTESIS DE CALUMENINA**

La incorporación de compuestos anti-vitamina K al modelo de HPM propuesto en esta Tesis podría resultar en diferentes patrones de expresión y síntesis de calumenina, como ya se ha visto que warfarina es capaz de reprimir la expresión del mRNA MGP además de inhibir la gamma-carboxilación (Palaniswamy C y cols., 2011). Es por ello que finalmente, se estudió el efecto de los anti-vitamina K sobre la expresión de calumenina. Los resultados muestran un patrón de expresión de *CALU* diferente en asociación con la suplementación de compuestos anti-vitamina K, e incluso entre warfarina y acenocumarol en el día 2 y 9, principalmente. Sorprendentemente, el acenocumarol indujo la sobreexpresión de *CALU* a día 9 (**Figura 63 A**) coincidiendo con una mayor síntesis de calumenina (**Figura 63 B**). Este incremento de calumenina coincidió con la sobreexpresión de los marcadores de diferenciación osteoblástica.



**Figura 63. Efecto de los fármacos anti-vitamina K sobre la expresión y síntesis de calumenina.** Expresión génica de *CALU* desde el día 1-9 en 2 experimentos independientes (n=2) incluyendo cada uno triplicados de cada condición experimental (A). Síntesis de calumenina en monocapas celulares previamente descalcificadas en tres experimentos independientes (n=3) incluyendo triplicados de cada condición experimental (B). \*, Significación estadística ( $p < 0,05$ ).

---

## **Sección VIII. Discusión**



La enfermedad cardiovascular es la primera causa de muerte y morbilidad de los países desarrollados y envejecidos. La calcificación vascular es un factor de riesgo independiente que triplica o cuadruplica la morbilidad y mortalidad cardiovascular (Rennenberg RJ y cols., 2009). Además es una manifestación severa de la aterosclerosis que refleja la carga aterosclerótica subyacente y se correlaciona fuertemente con la prognosis de eventos isquémicos (Madhavan y cols., 2014). Este proceso de calcificación ectópica se asocia frecuentemente con desórdenes metabólicos y condiciones clínicas y demográficas que empeoran considerablemente el pronóstico y evolución del paciente. Independientemente de la localización de la calcificación en la pared vascular, la CMLV juega un papel fundamental en el proceso fisiopatológico que se caracteriza por la activación de vías de diferenciación osteoblástica y la mineralización. El resultado es la rigidez vascular asociada al incremento de la presión sistólica y disminución de la diastólica, desarrollo de hipertrofia del ventrículo izquierdo y menor perfusión coronaria en la calcificación de la media. La mejor comprensión de la biología de la CMLV ante situaciones pro-calcificantes es crucial para la identificación y caracterización de potenciales dianas terapéuticas.

En la presente Tesis se ha estudiado en detalle el control de la diferenciación osteoblástica de la CMLV y su funcionalidad (mineralización de la MEC). Se ha evaluado la participación de factores de diferenciación osteocondroblástica que deben participar durante la calcificación ectópica. Para ello, se han utilizado principalmente CMLV de origen humano, lo que hace que los resultados obtenidos y presentados en esta Tesis cobren un mayor carácter traslacional. Además, estos resultados han sido confirmados en pacientes ambulatorios de bajo riesgo. Extraordinariamente, se emplearon líneas celulares de ratón (CMLVr) silvestres y transgénicas para estudiar la regulación de la matriz extracelular durante la diferenciación osteocondroblástica de la CMLV.

**OBJETIVO 1. Estudiar la relevancia del polimorfismo rs1043550 afectando la región 3'-UTR del gen CALU y evaluar la participación de la proteína calumenina en el proceso de la calcificación vascular**

❖ *El polimorfismo (SNP) CALU rs1043550 se asocia con una menor calcificación vascular*

De acuerdo con Rustch y colaboradores (Rustch y cols., 2011) entre el 40-50% de los casos de calcificación coronaria pueden ser atribuidos a predisposición genética. Estudios GWAS (genome wide association studies) han identificado múltiples loci genéticos en asociación con aterosclerosis e infarto de miocardio. Algunos de estos genes codifican proteínas como ciclinas (implicadas en senescencia celular e inflamación), ENPP1 (síntesis de PPI), NT5E (síntesis de Pi) o ABCC6 (disfunción hepática y bajos valores de MGP) (Evrard S y cols., 2015). En este trabajo, se ha confirmado un nuevo gen cuya expresión se asocia con la calcificación coronaria y la severidad de lesiones coronarias, el gen CALU (7q32.1) que codifica la proteína calumenina y que se relaciona con la biodisponibilidad de cMGP.

Calumenina, una chaperona molecular del RE e inhibidor endógeno de la gamma-carboxilación acoplada al sistema VKOR (Wajih N y cols., 2004), debe contribuir al desarrollo y progresión de la calcificación. Trabajos previos publicados entre 2001 y 2006 demostraron la relación entre calumenina y la gamma-carboxilación dependiente de vitamina K hepática utilizando ratas resistentes y no resistentes a warfarina. Además de la expresión hepática de calumenina, ésta es abundante en multitud de tejidos como corazón, pulmón, músculo esquelético, testículos, cerebro y bazo, pero sin diferencias entre ratas resistentes o no a warfarina (Wallin y cols., 2001). La sobreexpresión hepática de calumenina inhibe la GCCX, y no la VKORC1, acoplada al sistema de reciclaje de la vitamina K y contribuye a la resistencia genética a warfarina en rata (Wajih N y cols., 2006; Wajih N y cols., 2004; Wallin y cols., 2001). Además, Wallin y colaboradores, propusieron un modelo de acción de calumenina por el que ésta debe ser capaz de unir e inhibir warfarina resultando en un incremento de las dosis requeridas para inhibir la gamma-carboxilación hepática (Wallin y cols., 2001). Sin embargo, este modelo, aunque aceptado, necesita de revisión ya que se planteo antes de evidenciar la GCCX, y no VKORC1, como diana real de calumenina (Wajih N y cols., 2006).

Nuestro grupo previamente demostró que el polimorfismo (SNP) CALU rs1043550 se asociaba con la reducción del calcio coronario valorado semicuantitativamente y un mejor pronóstico a 6 meses en 175 pacientes con Síndrome Coronario Agudo (SCA) sin elevación del segmento ST y sometidos a intervención

percutánea coronaria (Hernández-Romero D y cols., 2010). En el presente trabajo, se ha seleccionado una segunda cohorte de pacientes ambulatorios más estables que la primera cohorte de pacientes SCASEST. Además, se ha utilizado un protocolo de valoración cuantitativo del calcio coronario mediante la TCC multicorte (64 cortes) y la adaptación de la escala de puntuación de Agatston (Agatston AS y cols., 1990). La TCC es el único test no invasivo, lo suficientemente sensible y específico para detectar calcio coronario y cuantificarlo, permitiendo mejorar el pronóstico y la predicción de eventos cardiovasculares (Bastarrrika G y col., 2004). Diferentes estudios han encontrado que la TCC tiene un valor predictivo de entre el 83-100% (Timins ME y cols., 1991). Además la calcificación coronaria se correlaciona positivamente con la estenosis coronaria evidenciada mediante coronariografía angiográfica (Masuda Y y cols., 1990). La publicación previa de nuestro grupo relacionando el SNP CALU rs1043550 con lesión coronaria y calcio coronario valorado por TCC fue concordante (Hernández-Romero D y cols., 2010). Así, la ACC/AHA incluyó en sus guías una recomendación clase IIa, nivel de evidencia B para recomendar la utilización de la TCC en la valoración de calcio coronario (Greenland P y cols., 2010), con interpretaciones diferentes dependiendo de la patología subyacente (Petcher MJ y cols., 2013; Roger VL y cols., 2012).

Los pacientes portadores del alelo polimórfico 'G' presentaron valores de calcio coronario inferiores a los registrados para los portadores del alelo silvestre 'A'. Estos resultados concuerdan con los publicados previamente (Hernández-Romero D y cols., 2010). De este modo, se ha confirmado en una segunda población de nuestra área geográfica el impacto clínico del SNP CALU rs1043550 sobre la calcificación vascular ahora realizada con una valoración cuantitativa y estándar, concretamente sobre el contenido de calcio coronario.

El análisis histológico de la calcificación residual tras el procesamiento del tejido femoral o poplíteo confirmó estas observaciones. Así, *el contenido de calcio fue menor en tejido de pacientes homocigóticos para el alelo polimórfico 'GG' que en los homocigóticos para el alelo silvestre 'AA'*. Además, se realizó estudio inmunohistoquímico sobre estos tejidos para analizar si el genotipo subyacente se asociaba con la disponibilidad local de calumenina y de MGP. La homocigosis del alelo polimórfico (genotipo 'GG') efectivamente se asoció con menores valores de calumenina y mayores de MGP. *Los bajos valores de calumenina en los pacientes 'GG'*

*sugieren que el polimorfismo es funcional e indican que la disponibilidad de MGP tisular es dependiente de calumenina, al menos en parte.*

Sin embargo, no existen evidencias previas demostrando la funcionalidad del SNP CALU rs1043550 a pesar de los datos clínicos y farmacogenéticos publicados. Además, muy pocos polimorfismos del gen CALU son funcionales y siempre lo son en asociación con el sistema de la coagulación (Kimura R y cols., 2006; González-Conejero R y cols., 2007; Vecsler M y cols., 2006). Es por ello que, como parte de los objetivos de esta Tesis se estudió la funcionalidad mediante ensayos de expresión con el sistema luciferasa realizados en los dos tipos celulares residentes mayoritarios de la vasculatura: la célula endotelial y la célula de músculo liso vascular (CMLV). La actividad luciferasa fue un 30% significativamente menor en las construcciones plasmídicas conteniendo el cambio nucleotídico A>G, demostrando que *el SNP CALU rs1043550 es funcional mediante la desestabilización del mRNA CALU.*

Publicaciones previas han sugerido la existencia de vías secretoras de la calumenina, si bien su función biológica no está totalmente elucidada (Vorum H y cols., 1999; Wang Q y cols., 2012). La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica originada por el daño endotelial e influenciada por células circulantes, incluidas las plaquetas. La inhibición de la adhesión plaquetaria se asocia con una menor acumulación leucocitaria y menor progresión de la lesión aterosclerótica. La plaqueta activada es capaz de secretar multitud de factores con diferentes efectos entre los que se encuentra la calumenina. Coppinger y colaboradores (Coppinger JA y cols., 2004) reconocieron mediante estudios proteómicos y técnicas inmunohistoquímicas la presencia de calumenina en placas ateroscleróticas y no en vasculatura sana. Además, calumenina es capaz de unir el componente P amiloide sérico, también secretado por las plaquetas (Vorum y cols., 2000 (I)). Presumiblemente, la presencia exclusiva de calumenina en las lesiones ateroscleróticas debe promover la calcificación vascular mediante el bloqueo de la gamma-carboxilación dependiente de vitamina K y, por tanto, de la actividad de la MGP (Wallin R y cols., 1999). Así pues, calumenina ejercería su efecto mediante mecanismos autocrinos o paracrinos sobre las células vecinas (Coppinger JA y cols., 2004; Honoré B, 2009; Vorum y cols., 2000 (II)). En este trabajo, se ha demostrado la *presencia de calumenina también en lesiones calcificadas de arteria femoral o poplítea*, como parte de la evolución natural de la lesión aterosclerótica hacia formas más severas (Stary HC y cols., 1995)

Además, el estudio inmunohistológico revela una asociación entre la presencia de calumenina y los valores de MGP, tanto en su forma carboxilada (cMGP) como no carboxilada (uMGP), indicando que *la disponibilidad tisular local de MGP debe ser dependiente de calumenina*. Los valores elevados de ambas cMGP y uMGP en los pacientes ‘GG’ deben contribuir a la regulación local y directa de la mineralización de la matriz extracelular (MEC) (O’Young J y cols., 2011). Estudios recientes han demostrado que valores bajos de cMGP circulante deben resultar en un sistema VKOR deficiente asociado con mortalidad cardiovascular y por todas las causas (Schlieper G y cols., 2011). En este trabajo el análisis macroscópico inmunohistológico reveló que, si bien calumenina se expresa en tejido lesionado calcificado indistintamente del genotipo para SNP CALU rs1043550, ésta se expresó más en los portadores del alelo ‘A’ en homocigosis y en asociación con valores reducidos de cMGP. Algunos autores han sugerido que las paredes vasculares afectadas por aterosclerosis son deficientes en vitamina K por lo que la gamma-carboxilación dependiente de vitamina K es insuficiente para producir cMGP a partir del incremento tisular de uMGP producido en los sitios de riesgo de calcificación en comparación con los tejidos sanos (Schurgers LJ y cols., 2001). Esto podría explicar, al menos en parte, porqué incluso los portadores del alelo polimórfico ‘G’ pueden desarrollar calcificación coronaria y periférica a pesar de los valores bajos de calumenina y los valores elevados tanto de cMGP como de uMGP.

La menor estabilidad del mRNA *CALU* y, por tanto, la funcionalidad del SNP rs1043550 *CALU*, apoya la explicación de la menor presencia de calumenina en los tejidos calcificados de los portadores homocigotos del alelo polimórfico (genotipo ‘GG’), los valores elevados de MGP y la menor mineralización tanto de tejido arterial femoral/poplíteo como de las arterias coronarias de pacientes con diferentes perfiles patológicos y pronósticos (Hernández-Romero D y cols., 2010)

❖ ***La condición de hiperfosfatemia (HPM) reproduce la calcificación vascular mediante la mineralización de la MEC y la diferenciación osteoblástica de la CMLV***

La calcificación vascular está asociada con procesos degenerativos óseos y comparte múltiples similitudes con la síntesis ósea y cartilaginosa (osteogénesis y condrogénesis, respectivamente) (Sage AP y cols., 2010). Son muchos los estudios

epidemiológicos que sugieren una relación entre la calcificación vascular y la disrupción del metabolismo óseo, en asociación con una elevada morbilidad y mortalidad (Cannata-Andia JB y cols., 2011). Un meta-análisis recientemente publicado demostró que sólo el fósforo sérico se asocia con eventos cardiovasculares, no así para el calcio y los valores de PTH (Cannata-Andia JB y cols., 2011). Además el fósforo sérico relaciona el remodelado óseo con la calcificación vascular. El fósforo estimula directamente la transición osteoblástica de la CMLV a través de los transportadores PiT-1 y PiT-2, entre otros (Cannata-Andia JB y cols., 2011).

La CMLV en condiciones fisiológicas produce inhibidores de la calcificación vascular. Sin embargo, una larga exposición a múltiples tipos de estrés, inducen continuas respuestas adaptativas en la CMLV y saturan la actividad de estos inhibidores e inducen su transdiferenciación hacia formas condroblásticas y/u osteoblástica (Evrard S y cols., 2015). Procesos como la inflamación, alteraciones hormonales (Leptina, Adiponectina, PTH), desórdenes metabólicos y estrés oxidativo son capaces de inducir calcificación vascular. Sin embargo, los desórdenes iónicos (hiperfosfatemia e hipercalcemia) son unos de los agentes mejor descritos. En este sentido, alteraciones del remodelado óseo deben intervenir en el denominado eje óseo-vascular (Cannata-Andia JB y cols., 2011), por el que el hueso actúa como una fuente de calcio y fósforo “bone as calcium-phosphorous buffer” (Evrard S y cols., 2015). Así pues, son numerosos los estudios que han demostrado que la utilización de condiciones de hiperfosfatemia (2-4 mM fósforo inorgánico) en la CMLV inducen mineralización de la MEC, incluso en modelos *in vivo* (Shanahan CM y cols., 2011). Tanto el uso de fosfatos orgánicos (10 mM  $\beta$ -glicerolfosfato normalmente combinado con dexametasona) como inorgánicos, está ampliamente descrito como agente osteoinductor en diferentes modelos de calcificación *in vitro* (Idelevich y cols., 2011). En definitiva, la hiperfosfatemia desencadena una respuesta de señalización intracelular esencial en la inducción de la transdiferenciación de la CMLV y la mineralización de la MEC, de forma semejante a lo descrito para osteoblastos (Suzuki A y cols., 2006; Yoshiko Y y cols., 2007). BMP-2 parece ser un elemento clave mediando el efecto de la hiperfosfatemia aguas abajo y regulando la expresión de los factores de transcripción Runx2/Cbfa1 y Osterix (Mathew S y cols., 2007; Tyson KL y cols., 2003; Jono S y cols., 2000), cuya expresión génica se ha valorado a lo largo de este trabajo de Tesis. Además la hiperfosfatemia promueve la metilación de SM22- $\alpha$ , resultando en una menor expresión de transgelina, favoreciendo

la desdiferenciación de la CMLV e induciendo la osteo/condro-diferenciación (Montes de Oca A y cols., 2010).

En este trabajo se escogió la HPM a base de fosfatos inorgánicos para reproducir directamente la hiperfosfatemia local resultante de la activación de ALP y la depleción de PPI. Además, la presencia de fetuína-A en el suero justifica que en el desarrollo del modelo de calcificación vascular *in vitro*, los medios control e HPM se deplecionaron, al menos parcialmente, del suplemento sérico a base de suero bovino fetal. El tipo celular de elección para desarrollar el modelo *in vitro* de calcificación fue la CMLV. Por un lado, Reynolds y colaboradores (Reynolds JL y cols., 2005) evidenciaron el importante papel de la CMLV en el metabolismo de las microvesículas de matriz. La CMLV sana fagocita ávidamente estas microvesículas de matriz de forma fetuína-A-dependiente. Por otro lado, Proudfoot y colaboradores (Proudfoot D y cols., 2001) sugirieron que la liberación de microvesículas y cuerpos apoptóticos por parte de la CMLV sometida a condiciones patológicas deben actuar como sitios de nucleación de cristales de hidroxapatita locales y circulantes. Así, la apoptosis celular descrita en la ERC (hiperfosfatemia y uremia), facilita la liberación de sitios de nucleación y reduce la disponibilidad de CMLV sanas capaces de retirarlos (Mizobuchi M y cols., 2009). Esto junto con la elevada plasticidad fenotípica de la CMLV en respuesta a condiciones fisiológicas y patológicas y su más que demostrada migración de la íntima a la media durante la formación del ateroma evidencian el importante papel de ésta en cualquier proceso aterosclerótico y también justifica su utilización en este trabajo de Tesis.

Los principales objetivos analizados en este trabajo de Tesis para el modelo celular de calcificación en la CMLV fueron: i) la mineralización de la MEC y ii) la activación del programa de diferenciación osteogénica para evidenciar una diferenciación osteoblástica activa (Kim CW y cols., 1993). Así, se estudió los progresivos cambios durante la calcificación dependiente de HPM en la CMVL. La transición fenotípica de la CMVL hacia formas osteoblásticas se registró mediante el estudio de la regulación de diferentes marcadores. Para el estudio del efecto de la HPM sobre la expresión y síntesis de calumenina se valoró la síntesis de SM22- $\alpha$  y osteocalcina, y la expresión génica de *BMP2*, *RUNX2*, *CTNNB1* y *SP7*. De forma interesante, la expresión de *BMP2* incrementó significativamente desde el día 3 en concordancia con un incremento significativo de la mineralización de la monocapas celulares. La ulterior expresión de efectores aguas abajo de BMP2, como Runx2/Cbfa1

y Osterix, indica que la calcificación vascular observada resulta de un proceso activo gobernado por diferentes morfógenos y factores transcripcionales osteoblásticos. De hecho Runx2/Cbfa1 es un regulador transcripcional específico e indispensable durante la diferenciación osteoblástica de la CMLV inducida por hiperfosfatemia (Evrard S y cols., 2015). Como se discute más adelante, eventualmente se valoró la expresión génica de *COL1A1* (pro- $\alpha$ 1) y *COL1A2* (pro- $\alpha$ 2) así como *DKK2* (inhibidor del eje Wnt/ $\beta$ -catenina) como marcadores de la diferenciación osteoblástica de la CMLV.

❖ ***La HPM modula la expresión de calumenina de una forma temporal-dependiente en la CMLV***

Resultados propios previos (Hernández-Romero D y cols., 2010), así como los derivados de esta Tesis, sugieren una asociación clínica entre el polimorfismo funcional CALU A29809G y la calcificación vascular, además confirmado en el estudio histológico de las arterias femorales y poplíteas. Todo ello sugiere que calumenina debe participar durante el desarrollo y/o progresión de la calcificación vascular. Por ello, se estudió el patrón temporal dependiente de expresión y síntesis de calumenina en la CMLV condicionada con HPM durante su transdiferenciación hacia fenotipos osteoblásticos. Calumenina fue regulada durante el proceso de calcificación activa de la CMLV. Los resultados sugieren un patrón de regulación de la expresión de calumenina temporal-dependiente con posibles consecuencias en el sistema de la gamma-carboxilación. Además, en éste modelo de calcificación de la CMLV, la significativa sobreexpresión temprana de calumenina se asoció con una sobreexpresión significativa de *BMP2* y de la deposición de calcio. Por tanto, *se demuestra por primera vez una relación asociativa entre la mineralización de la MEC, la diferenciación osteoblástica de la CMLV y la sobreexpresión temprana de calumenina.*

Las proteínas luminales de unión a calcio del RE, incluyendo la calumenina y otras reticulocalbinas, muestran funciones biológicas divergentes durante la maduración osteoblástica y condroblástica (Nakazawa T y cols., 2004; Wilson R y cols., 2012). Estudios recientes han demostrado una regulación transitoria positiva de calumenina en el condroblasto hipertrófico/pre-osteoblasto, durante las fases tardías de la osificación endocondral. Wilson y colaboradores (Wilson R y cols., 2012) mostraron las primeras evidencias bioquímicas para el cambio de funcionalidad de estas proteínas durante la

formación de cartílago y su asociación con el estrés del RE. Del mismo modo, la sobreexpresión de calumenina y otras reticulocalbinas ha sido descrita durante los estadios tempranos de la diferenciación osteoblástica en procesos de osteogénesis y reparación de fracturas óseas (Nakazawa T y cols., 2004). Tanto en el condroblasto hipertrófico como en el pre-osteoblasto, la regulación positiva es transitoria y se suprime posteriormente (Nakazawa T y cols., 2004; Wilson R y cols., 2012). Los resultados concuerdan con estas descripciones previas realizadas en el contexto de la osificación endocondral e intermembranosa, ambas recapituladas en la evolución fisiopatológica natural de la lesión aterosclerótica calcificada.

La hiperfosfatemia, como la desregulación homeostática del calcio, debe inducir una constante activación de respuestas adaptativas (secreción de MGP y fetuína-A) capaces de inducir estrés del RE (Farzaneh-Far A y cols., 2000; Reynolds JL y cols., 2004; Chen NX y cols., 2008; Farzaneh-Far A y cols., 2001(I); Farzaneh-Far A y cols., 2001(II); Shanahan CM y cols., 1994) cuya asociación con la calcificación vascular ya se ha evidenciado (Ravindran S y cols., 2011). Calumenina, entre las múltiples funciones biológicas que acumula, es además un marcador de estrés del RE. Estudios recientes han demostrado la sobreexpresión de diferentes marcadores de estrés del RE, incluyendo GRP78, GRP96, CHOP, reticulocalbinas y calumenina, en procesos de biomineralización, osteogénesis y condrogénesis (Murakami T y cols., 2009; Duan X y cols., 2009). El estrés del RE parece mediar la regulación de Runx2/Cbfa1 y la secreción de colágeno tipo I en el metabolismo óseo (Murakami T y cols., 2009; Saito A y cols., 2009; Tohmonda T y cols., 2011). Además, nuevas evidencias indican una asociación entre el estrés del RE y la calcificación ectópica (Boraldi F y cols., 2009; Gheduzzi D y cols., 2007; Ravindran S y cols., 2011). La sobreexpresión de calumenina descrita en este trabajo podría deberse a un incremento del estrés del RE, no evidenciado directamente en este trabajo, y la subsiguiente alteración de la gamma-carboxilación y facilitación de la calcificación dependiente de BMP-2 y de su efector aguas abajo, Runx2/Cbfa2 (Mathew S y cols., 2007; Liberman M y cols., 2011; Gheduzzi D y cols., 2007; Boraldi F y cols., 2009; Shanahan CM y cols., 2011; Shindyapina AV y cols., 2014; Byon CH y cols., 2008; Sun Y y cols., 2012). Runx2/Cbfa1 promueve la transdiferenciación osteoblástica de la CMLV en asociación con un incremento del estrés oxidativo y del RE dependiente de BMP-2. De hecho, la

inhibición del estrés del RE o del estrés oxidativo revierte la expresión de Runx2/Cbfa1 e inhibe el proceso de mineralización (Sun Y y cols., 2012).

❖ ***La gamma-carboxilación se restaura en las fases tardías de la diferenciación osteoblástica de la CMLV osteoinducida con HPM***

En este trabajo de Tesis se estudió cómo afecta la regulación temporal de calumenina a la gamma-carboxilación dependiente de vitamina K en éste particular sistema biológico. *La expresión de cMGP fue inversamente proporcional a la disponibilidad intracelular de calumenina en las CMLV condicionadas con HPM.* Ello sugiere una regulación de la gamma-carboxilación dependiente de calumenina (Wajih N y cols., 2004) durante la diferenciación osteoblástica de la CMLV. La sobreexpresión temprana de calumenina debe reducir la disponibilidad de cMGP permitiendo que la sobreexpresión concomitante de *BMP2* sea efectiva y progrese hacia la diferenciación osteo/condroblástica. De acuerdo con los resultados, la sobreexpresión de calumenina debe favorecer i) la depleción de inhibidores naturales de la calcificación vascular, ii) la pérdida de protección vascular y iii) la transdiferenciación celular. Por tanto, los resultados sugieren que la calcificación vascular es un proceso activamente inhibido y, una vez se ha iniciado, ulteriormente activamente activado.

MGP es una proteína principalmente secretada por la CMLV, osteocitos y condrocitos. La función biológica de MGP viene determinada por la presencia de residuos Gla específicos (Schurgers LJ y cols. 2005). La disponibilidad de cMGP parece ejercer un papel protector en la calcificación arterial (Proudfoot D y cols., 2006), superior al de otros inhibidores naturales como la Fetuína-A (Jahnen-Dechent W y cols., 1997), mediante la inhibición de la calcificación dependiente e independiente de BMP2 (Lomashvili KA y cols., 2011; O'Young J y cols., 2011; Böstrom K y cols., 2001; Yao Y y cols., 2010). Una aproximación experimental-computacional evidenció que cMGP (pero no uMGP) debe prevenir la calcificación vascular directamente mediante la inhibición del crecimiento de los cristales de hidroxapatita, e indirectamente mediante la unión e inhibición de BMP2 (O'Young J y cols., 2011; Boström K y cols., 2001; Sweatt A y cols., 2003). La capacidad de unión de cMGP a los cristales de hidroxapatita de calcio de microvesículas y cuerpos apoptóticos, evita la formación de sitios de nucleación (Roy ME y cols., 2002) y explicaría la presencia de cMGP en las

arterias calcificadas de diferentes tipos de pacientes, entre ellos los renales y urémicos (Price PA y cols., 2000; Shanahan CM y cols., 1999 (I); Spronk HM y cols., 2001; Lomashvili KA y cols., 2006; Shioi A y cols., 1995; Mori K y cols., 1998; Tintut Y y cols., 1998; Steitz SA y cols., 2001; Moe SM y cols., 2004). Además, la co-localización de las formas ucMGP y cMGP, sugiere la ausencia de carboxilación como causa primaria de la calcificación (Lomashvili KA y cols., 2011). Los resultados sobre la restauración de la gamma-carboxilación en fases avanzadas de la calcificación y transdiferenciación, explicarían porqué estos pacientes a pesar de presentar elevadas concentraciones vasculares de cMGP no revierten el proceso patológico de mineralización. Un fallo inicial en la inhibición activa de la calcificación consecuencia de la menor disponibilidad de cMGP, debe facilitar la transdiferenciación de la CMLV. Una vez adquirido el fenotipo osteoblástico, la forma cMGP acumulada no debe ejercer el papel protector descrito para la CMLV sana.

Wajih N y colaboradores (Wajih N y cols., 2000) ya demostraron, por unión de ligando, la existencia de una interacción entre MGP y BMP2, posteriormente confirmada por Zebboudj y cols (Zebboudj AF y cols., 2002). La forma cMGP es capaz de unirse a  $Ca^{2+}$ , lo que produce un cambio conformacional necesario para la formación del complejo MGP/BMP2 (Wajih N y cols., 2000; Sweat A y cols., 2003). Además, cMGP es especialmente insoluble, al contrario que otras PVKD, y con Fetuína-A (Price PA y cols., 2003). Sin embargo, estudios realizados en ratones transgénicos han demostrado que la MGP producida en los vasos y no la sistémica es capaz de inhibir la calcificación vascular (Murshed M y cols., 2004). La carencia de MGP en ratones 'knock-out' para MGP se han asociado con la diferenciación de la CMLV en condroblastos y finalmente con calcificación arterial (El-Maadawy S y cols., 2003). Burton y colaboradores han afirmado, incluso, que la sobreexpresión de BMP-2 sería consecuencia de la pérdida de inhibición MGP-dependiente (Burton DGA y cols., 2010). A todo esto, hay que añadir el papel que MGP ejerce sobre la homeostasis vascular, preservando la solvencia y competencias de la vasculatura, como sugieren estudios de sobreexpresión de MGP en ratón y el ineficiente desarrollo del árbol arterial pulmonar (Yao Y y cols., 2007; El-Maadawy S y cols., 2003).

La importancia de la gamma-carboxilación acoplada al sistema de reciclaje de la vitamina K sobre la disponibilidad y funcionalidad de MGP y la calcificación ectópica ya fue sugerida previamente. Boraldi y colaboradores (Boraldi F y cols., 2009),

evidenciaron la importancia del estrés del RE en el desarrollo de PXE en un estudio proteómico. Los autores describieron cómo calumenina y otras proteínas acopladas al sistema de gamma-carboxilación dependiente de la vitamina K aparecían sobre presadas en asociación con valores bajos de cMGP y elevada calcificación vascular (Boraldi F y cols., 2009; Gheduzzi D y cols., 2007). Es de destacar que el PXE es una enfermedad genética asociada con el desarrollo de aterosclerosis y calcificación vascular infantil, de mal pronóstico y que se relaciona con la ausencia total o parcial de cMGP en fibroblastos.

La inhibición temprana de la gamma-carboxilación dependiente de calumenina hallada en este trabajo de Tesis, pone de manifiesto el relevante papel protector de la cMGP, al menos durante las etapas iniciales de la calcificación vascular. Paradójicamente, se encontró que los valores inicialmente reducidos de cMGP aumentaron de forma concomitante con la expresión de osteocalcina y, por tanto, con la diferenciación osteoblástica. Esta recuperación de la gamma-carboxilación también se asoció con la menor expresión génica y disponibilidad intracelular de calumenina reportada para los días 6/9 al 12/18. Estos datos sugieren una *restauración de la gamma-carboxilación en asociación con una menor disponibilidad de calumenina celular y durante los estadios tardíos de la diferenciación osteoblástica de la CMLV*.

La restauración tardía de la gamma-carboxilación podría explicar, al menos en parte, recientes hallazgos que restan importancia al papel protector de la cMGP. Beazley y colaboradores demostraron una elevada expresión concomitante de osteocalcina y Osterix a pesar de los valores elevados de cMGP en un modelo de calcificación de la CMLV basado en la combinación de warfarina e hiperfosfatemia (2.4 mM fosfatos inorgánicos finales) (Beazley KE y cols., 2013). En este modelo la adición de vitamina K no fue capaz de inhibir la calcificación (Beazley KE y cols., 2013). El análisis comparativo se centró en la valoración de los niveles de proteína de calumenina y de dos PVKD incluyendo MGP y osteocalcina, durante la calcificación a largo plazo (12/18 días) de la CMLV osteoinducida con HPM. Los resultados también demuestran una elevada sobreexpresión de osteocalcina y cMGP en los estadios tardíos de la diferenciación de la CMLV dependiente de HPM. La restauración de la gamma-carboxilación en fases tardías de la diferenciación osteoblástica debe permitir la activación de osteocalcina (Hauschka PV y cols., 1989; Patti A y cols., 2013). Sólo la

forma carboxilada de osteocalcina es funcional y capaz de regular la maduración de la MEC mineralizada.

La gamma-carboxilación dependiente de vitamina K debe regular la calcificación vascular durante las etapas tempranas (Lomashvili KA y cols., 2011; O'Young J y cols., 2011; Proudfoot D y cols., 2006), si bien el déficit de PPI debe ser necesario (Lomashvili KA y cols., 2011). El efecto protector de la gamma-carboxilación debe depender del fenotipo normal o patológico de la CMLV en la pared vascular y los resultados obtenidos, explicarían la coexistencia de ucMGP y cMGP en tejidos calcificados, así como la co-expresión de factores y marcadores de diferenciación osteoblástica y cMGP.

❖ *Activación de vías dependientes de beta-catenina durante la evolución de la diferenciación osteoblástica*

Probablemente otras vías no estudiadas en este trabajo deben asumir la progresión de la calcificación ectópica a partir de los estadios avanzados en los que calumenina se reduce y la gamma-carboxilación de la MGP deja de ser protectora. Los patrones temporales de expresión de calumenina y de la funcionalidad de la gamma-carboxilación deben ocurrir para otros perfiles proteicos tal y como se ha descrito durante los procesos de maduración de osteoblastos y condroblastos. Múltiples factores locales y sistémicos ejercen un reclutamiento y diferenciación hacia el fenotipo osteoblástico, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Ambrosetti D y cols., 2008; Hu H y cols., 2005; Kalajzic I y cols., 2005; Lomashvili KA y cols., 2011; Mukherjee A y cols., 2009). Por ejemplo, BMP-2 y otras moléculas osteoinductoras estimulan las vías de señalización dependientes de Wnt mediante la modulación de los represores o activadores de Wnt (Kalajzic I y cols., 2005; Rawadi G y cols., 2003). Así, el eje Wnt/ $\beta$ -catenina promueve la osteogénesis al promover y regular positivamente la diferenciación, reclutamiento y proliferación del osteoblasto, la supervivencia del osteocito, y la osificación endocondral (Bonewald LF y cols., 2008; Tamamura Y y cols., 2005). Muchos autores, han señalado en las publicaciones más recientes que la vía Wnt/ $\beta$ -catenina es la principal vía molecular involucrada en la calcificación vascular (Beazley KE y cols., 2012; Beazley KE y cols., 2013). De acuerdo con estas observaciones, los resultados obtenidos muestran una regulación positiva concomitante

de *CTNNB1* junto con otros marcadores clásicos de activación osteoblástica (*BMP2*, *RUNX2* y *SP7/Osx*) y un progresivo incremento de la deposición de calcio.

Todos estos resultados en conjunto proporcionan nueva información elucidando cambios temporales de expresión y participación de diferentes elementos y vías moleculares asociadas con la transdiferenciación de la CMLV.

❖ ***La HPM debe activar las vías secretoras de la calumenina***

Como se ha comentado con anterioridad, publicaciones previas han sugerido la existencia de vías secretoras de la calumenina aunque su función biológica no está definida (Vorum H y cols., 1999; Wang Q y cols., 2012). Trabajos previos y éste mismo han demostrado la acumulación de calumenina en lesiones ateroscleróticas y calcificadas (Coppingher y cols., 2004; Vorum y cols., 2000; Honoré B. 2009). Los resultados desprendidos de las inmunocitoquímicas con y sin permeabilización de membranas realizadas sobre monocapas celulares de CMLV osteoinducidas con HPM sugieren la activación de vías secretoras de la calumenina. Calumenina se acumuló en la MEC mineralizada como respuesta a la HPM. La reducción intracelular masiva descrita por técnicas de western blot debe ser el resultado de la depleción intracelular de la misma por la secreción hacia el espacio extracelular.

La formación de complejos de elevado peso molecular de calumenina y otras moléculas (como el componente amiloide P) (Honoré B. 2009) se han encontrado frecuentemente en pacientes con PXE (Boraldi F y cols., 2009). Además, como calumenina, otras chaperonas moleculares del RE implicadas en la respuesta celular al estrés del RE, se han localizado en el espacio extracelular con diferentes funciones biológicas. De hecho, GPR78 parece participar directamente sobre la mineralización de la MEC (Ravindran S y cols., 2011). Además, la estructura molecular de calumenina le permite unir iones de calcio y estabilizar la MEC mineralizada (Honoré B y cols., 2000). De acuerdo con estas consideraciones, calumenina debe ejercer dos papeles diferentes durante la calcificación vascular. Por un lado, debe participar indirectamente en las etapas tempranas reduciendo la disponibilidad de inhibidores naturales de la calcificación vascular, concretamente cMGP, y facilitando la calcificación dependiente e independiente de BMP-2. Por otro lado, debe participar directamente en la mineralización de la MEC durante las etapas tardías o fases avanzadas de la

calcificación. Finalmente, existiría una última participación indirecta de calumenina en las fases tardías que sería resultado de su menor disponibilidad intracelular y la restauración de la gamma-carboxilación facilitando la activación de osteocalcina. Los resultados de las muestras tisulares y el modelo celular desarrollado en esta Tesis concuerdan con resultados previamente publicados (Coppinger JA y cols., 2004; Honoré B. 2009; Ravindran S y cols., 2011; Vorum H y cols., 2000).

❖ ***La HPM regula la expresión de miRNAs con dianas implicadas en la regulación de calumenina y de la diferenciación osteoblástica***

Los pequeños RNA no codificantes miRNA han emergido como represores post-transcripcionales en una amplia variedad de enfermedades incluida la cardiovascular. Las principales dianas descritas de los miRNA han sido las regiones 3'UTR de los mRNA, lo que resulta en: *i*) una disminución de estabilidad del mRNA, semejante a la producida por un SNP, o *ii*) la disociación del complejo de transcripción. Este tipo de regulación se ha descrito tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Ambros V. 2004).

Los miRNA regulan procesos de proliferación, migración, crecimiento y diferenciación celular (Dong S y cols., 2013; Li P y cols., 2013), por lo que constituyen herramientas atractivas para el estudio de patologías vasculares proliferativas. La lista de miRNAs implicados en la homeostasis vascular no es extensa, pero son destacables los hallazgos publicados en los últimos años. La sobreexpresión de miR-663 ejerce un papel crítico en la regulación de la proliferación y cambio fenotípico de la CMLV y el desarrollo de neoíntima (Li P y cols., 2013). Más interesante es el caso de los miR-424/322 que inhibe la proliferación y migración de la CMLV, sin afectar las vías apoptóticas, previene su desdiferenciación y la expresión de ciclina D1 y, muy notablemente, de proteínas reguladoras de calcio como STIM1 (acrónimo del inglés '*stromal-interacting molecule 1*') y calumenina (Merlet E y cols., 2013). Estos resultados, sugieren nuevamente la participación de calumenina en la protección y homeostasis vascular.

Múltiples miRNAs regulando las vías de señalización de la diferenciación osteoblástica (osteomiR) o condroblástica (condromiR) han sido descritos (Hassan M y cols., 2010; Hassan M y cols., 2012; Li Z y cols., 2009; Zhang Y y cols., 2011;

Weilbaecher KN y cols., 2011). Sin embargo, sólo una pequeña proporción de estos han sido identificados y funcionalmente caracterizados en la calcificación vascular (Qiao W y cols., 2014; M'Baya-Moutoula E y cols., 2015; Liao XB y cols., 2013; Gui T y cols., 2012; Mackenzie NC y cols., 2014).

La revisión de la literatura relacionada con la regulación de la expresión de miRNAs durante la calcificación vascular sugiere que esta patología es un proceso activamente inhibido. Hasta ahora es escasa la bibliografía demostrando la sobreexpresión de miRNAs durante la calcificación vascular (miR221, miR-222, miR-223) (Mackenzie NCW y cols., 2014; Rangrez AY y cols., 2012). La mayoría de trabajos publicados ha encontrado una regulación negativa de diversos microRNA (miR-205, miR-133a, miR-125b, miR-30e, miR-30b y miR-30c, miR-29, miR-204) cuyas dianas son, generalmente, factores implicados en la osteogénesis (Qiao W y cols., 2014; Liao XB y cols., 2013; Wen P y cols., 2014; Ding W y cols., 2015; Balderman JA y cols., 2012; Du Y y cols., 2012; Cui RR y cols., 2012; Chen NX y cols., 2013). Sin embargo, las funciones de los miRNA regulando la calcificación vascular son muy diversas y también incluyen la disrupción del influjo de calcio en la CMLV *in vitro* e *in vivo* (Gui T y cols., 2012).

Además de la CMLV, otros tipos celulares como las células madre mesenquimales han evidenciado el papel de los miRNA en la diferenciación osteoblástica. Un programa de múltiples miRNA controla la diferenciación del linaje mesenquimal hacia fenotipos osteo/condroblásticos mediante la regulación del eje BMP-2/Runx2 (Zhang Y y cols., 2012). De hecho, en la línea mesenquimal C2C12, el eje BMP2/Runx2 determina la diferenciación ósea principalmente mediante la represión de miRNAs cuyas dianas son 'osteogenes' (Li Z y cols., 2008).

El papel de calumenina en la calcificación ectópica hace especialmente interesante el estudio de reguladores endógenos. En este trabajo se muestra cómo un simple cambio nucleotídico 29809A>G (SNP CALU rs1043550) en la región 3'UTR del mRNA de *CALU* afecta a la expresión de calumenina y es clínicamente relevante. La función putativa de los miRNA sobre las regiones 3'UTR de *CALU* debe regular la disponibilidad de calumenina de forma similar. En este trabajo de Tesis se emplearon diferentes aproximaciones computacionales para predecir *in silico* potenciales miRNAs complementarios con la región 3'UTR *CALU*.

De entre los múltiples miRNA identificados, se seleccionaron *hsa-miR-132-3p* (miR-132) y *hsa-miR-218-5p* (miR-218). Los resultados de este trabajo muestran una regulación de miR-132 y miR-218 condicionada por la HPM en la CMLV. Ambos miRNA aparecieron reprimidos inicialmente, coincidiendo con un fenotipo todavía muscular de la CMLV (evidenciado por la síntesis de SM22- $\alpha$ ). Pero se sobreexpresaron en fases tardías de la calcificación, coincidiendo con el fenotipo osteoblástico (evidenciado por la síntesis de osteocalcina). De forma similar al modelo desarrollado en esta Tesis, también en la célula mesenquimal y su adherencia hacia el linaje osteoblástico se han descrito perfiles transitorios de sobreexpresión/represión de miRNAs (Li Z y cols., 2008).

❖ ***La región 3'UTR del gen CALU es una diana real de miRNA-132 y miR-218 en la célula endotelial y la CMLV***

Liao y colaboradores (Liao XB y cols., 2013) demostraron que miR-133a era capaz de unirse a la región 3'UTR del gen *RUNX2* y así regular negativamente la diferenciación osteoblástica de la CMLV. Para ello realizaron ensayos luciferasa co-transfectando CMLV con miR-133a y constructos plasmídicos conteniendo las variantes silvestre de 3'UTR *RUNX2* o mutante (como control negativo). De este modo, los autores demostraron que miR-133a regula negativamente la diferenciación osteoblástica de la CMLV (Liao XB y cols., 2013).

En este trabajo se realizó una aproximación experimental similar a la de Liao y colaboradores (Liao XB y cols., 2013) utilizando plásmidos reportero conteniendo el gen *LUC*, para abordar el estudio de la regulación de 3'UTR *CALU* dependiente de los miRNAs de interés. La co-transfección de miR-132 o miR-218 y los constructos plasmídicos conteniendo la región 3'UTR de *CALU* redujo significativamente la actividad luciferasa en la célula endotelial y, en menor medida, en la CMLV. Por tanto, en ambos tipos celulares, miR-132 y miR-218 son capaces de regular la expresión de *CALU*, al menos mediante la desestabilización de los mRNA.

Los resultados derivados de este trabajo son claros. Sin embargo, es necesario, considerar los nuevos avances en el área de conocimiento de los miRNA. Al margen de las múltiples dianas para un mismo miRNA, nuevas publicaciones indican regulaciones alternativas que involucran la regulación post-transcripcional de las regiones 5'UTR y

CDS en el mRNA, e incluso de regiones promotoras (Berezikov E y cols., 2005; Bentwich I y cols., 2005; Dweep y cols., 2013; Hausser J y cols., 2013; Kim DH y cols., 2008; Guang S y cols., 2008; Hwang HW y cols., 2007; Winter J y cols., 2009; Fang Z y cols., 2011; Schnall-Levin y cols., 2011).

Finalmente, puntualizar la necesidad de consideración de los patrones de expresión de las cadenas guía y *star* (\*) de los miRNA en investigaciones futuras. En este trabajo sólo se analizaron las cadenas predichas para la unión con 3'UTR *CALU*, que además son las cadenas guía de cada uno (miR-132-3p y miR-2185p). Sin embargo, estudios recientes demuestran que la expresión de las cadenas *star*\* puede ser equitativa o exceder la de las cadenas guía, evocando respuestas fenotípicas (Hu HY y cols., 2009; Starega-Roslan J y cols., 2011). Así, durante la adipogénesis y la osteogénesis se ha observado una sobreexpresión de los miR\* sin afectación de los niveles de las cadenas guía miR (Martin EC y cols., 2015). Diferencias en los patrones de expresión del dúplex miR/miR\* sugieren una regulación post-transcripcional de los mismos, posiblemente durante la biogénesis. Esta posibilidad abre nuevas incógnitas y avenidas en el estudio de la regulación epigenética dependiente de miRNAs en la calcificación vascular.

❖ ***La sobreexpresión de miR-132 y miR-218 en las etapas iniciales de la calcificación de la CMLV protege frente el desarrollo de la calcificación vascular incipiente***

Es fundamental la identificación de las vía moleculares que desencadenan la calcificación de la CMLV sometida HPM. Tras confirmar que la HPM regula la expresión de miR-132 y miR-218 y que 3'UTR *CALU* es una diana común, se estudió la sobreexpresión de estos en la CMLV. Se realizaron ensayos miRNA mimic durante las etapas iniciales del condicionamiento con HPM. Por tanto, la realización de los ensayos coincidió con el fenotipo contráctil de la CMLV (evidenciado por la síntesis de SM22- $\alpha$ ), la sobreexpresión de calumenina (principal diana de interés) y el inicio de la calcificación en condiciones de HPM control. Esto nos permitió deducir la función biológica de estos miRNA en este microambiente celular particular. La represión observada para miR-132 y miR-218 y dependiente de HPM, debe facilitar el inicio de la calcificación de la CMLV mediante la regulación de *CALU*.

No existe un consenso en la literatura sobre los niveles de sobreexpresión de miRNAs necesarios para demostrar su función biológica. En muchas publicaciones se alcanzan valores de sobreexpresión (*fold change*) de cientos y miles, aunque publicaciones recientes los critican. Lagos y colaboradores (Lagos D y cols., 2010) han demostrado que los valores de miR-132 son críticos para que se reprima o no la actividad transcripcional de sus diferentes mRNA diana. Es por ello que los valores de sobreexpresión de miRNAs actualmente aceptados deben identificar interacciones potenciales entre miRNAs y mRNA dianas tanto deseados como no deseados en el diseño experimental. Los miRNA tienen múltiples dianas y tales valores podrían conllevar regulaciones secundarias no deseadas que inferirían en las conclusiones finales. En este trabajo la sobreexpresión evidenciada en los ensayos miRNA mimic únicamente fue significativa para miR-132 en los dos puntos temporales analizados. Sólo después de las 48h de transfección de miR-218, la sobreexpresión fue consistente, coincidiendo con la pérdida de significancia estadística del efecto protector sobre la mineralización, pero en asociación con una menor expresión de *CALU*. Estos datos confirman los resultados de los ensayos en plásmidos reportero, en la CMLV osteoinducida con HPM. La regulación de la expresión de calumenina incluso a valores relativamente bajos de miR-132 y miR-218, podrían sugerir una estricta represión de ambos durante el inicio de la HPM y una elevada sensibilidad para la regulación de *CALU*.

La región intergénica del cromosoma 17p13.3 codifica el miRNA-132 y su secuencia madura es muy similar a la de miR-212, por lo que deben tener los mismos mRNA diana y forman un clúster. Sin embargo, esto no se ha podido demostrar excepto en algunos mRNA. La maduración de miR-132 resulta en dos unidades: miR-132 (hsa-miR-132-3p) y miR-132\* (hsa-miR-132-5p), si bien la forma -3p es la mejor caracterizada para este miRNA y la predicha para 3'UTR *CALU*. Aunque no se ha valorado en este trabajo de Tesis, no es despreciable la existencia de miR-132\* dada la existencia de diferentes variantes de transcritos resultantes de procesamiento o *splicing* alternativo para un mismo miRNA y los diferentes patrones de expresión específicos de tejido hallados en rata (Wanet A y cols., 2012). Algunos autores han sugerido que la preferencia de miR-132 respecto de miR-212 debe radicar en una mayor estabilidad de miR-132 más que en diferencias de procesamiento, si bien el tipo celular y los contextos

fisiológicos deben afectar a la maduración y estabilidad de los mismos (Lagos D y cols., 2010).

En los últimos años ha crecido el número de publicaciones identificando y validando múltiples dianas para miR-132, tales como el factor transcripcional CREB (*cAMP-response element binding protein*), la subunidad proteica b2 de los canales cardiacos de calcio tipo L, MeCP2, MMP9, p120RasGAP, SirT1 (Wanet A y cols., 2012) e incluso Calumenina (Eskildsen TV y cols., 2014). Además de la importante participación del clúster miR-132/miR-212 en la neurogénesis, cada vez es más evidente su participación en la regulación de las funciones inmune y cardiovascular. MiR-132 es capaz de inhibir la proliferación de la CMLV y la hiperplasia de la neoíntima al regular la expresión de LRRFIP1 (acrónimo en inglés de '*leucine-rich repeat (in Flightless 1) interacting protein-1*') (Choe N y cols., 2013). Además, los resultados de este estudio evidencian que la región 3'UTR de *CALU* es otra diana de miR-132 en la CMLV. BMP-2 también cuenta entre las potenciales dianas de miR-132, si bien su regulación no ha podido ser evidenciada en el pre-osteoblasto. Aunque, BMP-2 no ha sido objeto de estudio directo de regulación miR-132 dependiente en esta Tesis, sí se incluyó el estudio de expresión génica para evaluación indirecta e identificación de la activación del programa osteogénico temprano. Un trabajo reciente ha demostrado una relación negativa entre la sobreexpresión de miR-132-3p y la diferenciación osteoblástica mediante la inhibición de la histona acetiltransferasa Ep300 implicada en la acetilación y activación de Runx2 (Hu Z y cols., 2015). En cuanto a la contextualización de miR-132 y su función cardioprotectora, una publicación reciente demostró la implicación de miR-132 en la mejor recuperación de zonas infartadas, menor grado de calcificación secundaria y mejor presupuesta endotelial (angiogénesis y formación de túbulos) en la terapia celular y regenerativa (Katare R y cols., 2011). La expresión de miR-132 en la CMLV debe inhibir el desarrollo de la placa de ateroma y su progresión hacia lesiones avanzadas incluyendo la mineralización, probablemente en relación con el cambio fenotípico contráctil a sintético de la CMVL y todo lo que ello conlleva.

Wibrand y colaboradores estudiaron la cinética de expresión de las diferentes formas del miR-132 (pri-miR, pre-miR, y miR) tras estimulación. Sus resultados sugieren que la transcripción y procesado del pri-miR y el pre-miR es muy rápida (50 veces mayor), mientras que el procesado de las formas maduras resultó ser muy lento y

mucho menor (menos de 2 veces la expresión de las formas inmaduras), por lo que o el procesamiento de los precursores es muy limitado o los valores basales de los miRNA maduros son muy elevados (Wibrand K y cols., 2010). Según esto, la sobreexpresión de miR-132 evidenciada por qPCR en los ensayos miRNA mimic debe resultar de la propia eficiencia de la transfección. La baja tasa de procesamiento de las formas maduras de miR-132 o la elevada concentración inducida por la transfección no justificarían, en principio, una elevación endógena de miR-132 en las condiciones experimentales ensayadas en esta Tesis.

Más controvertido es el estudio de la función de miR-218. La contextualización biológica de miR-218 lo relaciona significativamente con la promoción de la diferenciación osteoblástica (Li Z y cols., 2009). El análisis computacional de miR-218 predice una regulación negativa directa sobre múltiples inhibidores de la vía del Wnt y una promoción indirecta del eje Wnt/ $\beta$ -catenina tanto en la osteoblastogénesis fisiológica como patológica (mimetismo de las células cancerosas) (Hassan M y cols., 2012). Durante la maduración de los osteoblastos, múltiples miRNA están sobreexpresados (Li Z y cols., 2009) (incluyendo miR-218-5p y miR-218-3p) (Hassan M y cols., 2012). Sin embargo, las predicciones de unión del miR-218-3p a *CALU* fueron negativas y se descartó su estudio en este trabajo, incluyendo sólo miR-218-5p.

La sobreexpresión de factores como Runx2/Cbfa1, ALP y osteocalcina en asociación con la sobreexpresión de miR-218 en pre-osteoblastos MC3T3, BM-MSC (Hassan M y cols., 2012) y ahora en CMVL osteodiferenciada, demuestran que miR-218 es un potente osteo-miR.

La formación de tejido óseo tanto fisiológico como patológico es el resultado de un proceso dinámico en el que interactúan diferentes vías moleculares y participan diferentes ligandos anabólicos, regulados por diferentes mecanismos. Tanto BMP-2 como Wnt son ligandos capaces de inducir la diferenciación osteoblástica y además ejercen una regulación sinérgica cuando se co-expresan. Los miembros de la familia del TGF- $\beta$  incluyendo las BMP activan una serie de eventos moleculares de señalización intracelular conducente a la activación de las proteínas Smad, la activación de Runx2/Cbfa1 y Osterix (Komori T. 2011; Chen G y cols., 2012). Por otro lado, la unión de Wnt al complejo receptor constituido por LRP5/6 y Frizzled, permite la traslocación nuclear de  $\beta$ -catenina y su interacción con los factores transcripcionales

TCF/LEF que a su vez regulan positivamente la expresión de *Runx2/Cbfa1* y *Osterix* (Monroe DG y cols., 2012; Long F y cols., 2008). Ambos ligandos BMP2 y Wnt, están directa o indirectamente regulados por los miRNA analizados en este trabajo. Por ello se incluyó el estudio de la expresión génica de *BMP2* y de *DKK2* (inhibidor del eje Wnt/ $\beta$ -catenina) como dianas de miR-132 y miR-218, respectivamente. Los resultados obtenidos sugieren una mediación de miR-132 y miR-218 sobre las reacciones acopladas entre las vías de señalización dependientes de BMP2 y Wnt. Así, miR-132 se asoció con una menor expresión de *BMP2* y una represión temprana de *CTNNB1* tras sólo 48h. También miR-218 reguló la expresión de *DKK2*, y se observó una menor expresión génica de *BMP2*.

Además, en este trabajo se ha observado una relación entre la expresión temprana de *CALU* y *BMP2*. Este hecho fue especialmente llamativo cuando las transfecciones de miR-218 regulando *CALU* se asociaron también con una menor expresión de *BMP2*. Si bien miR-132 podría regular BMP-2, no existen predicciones de interacción para miR-218, sino más bien todo lo contrario. Hassan y colaboradores (Hassan M y cols., 2012) demostraron una retroalimentación positiva entre BMP-2 y miR-218. De entre las 800 dianas predichas para miR-218, 4 son especialmente relevantes para la osteogénesis incluyendo un represor de BMP-2 (*Tob1*) y tres inhibidores de Wnt/ $\beta$ -catenina (*Dkk2*, *Sfrp2* y *Sost*) (Hassan M y cols., 2012; Zhang Y y cols., 2011), aunque en este trabajo de Tesis sólo se validó indirectamente el efecto de miR-218 sobre *DKK2*. Los autores concluyeron que otros tipos de regulación pueden ocurrir ya que únicamente los resultados de expresión génica y proteína de *Sost* se asociaron con la sobreexpresión de miR-218. Los resultados obtenidos en CMLV sí demuestran una regulación negativa de *DKK2* y sugieren una nueva diana para miR-218, la calumenina.

La selectividad molecular de cualquier miRNA, por diferentes vías debe depender del fenotipo celular y del micro-ambiente celular (Hassan M y cols., 2012). Así, las observaciones resultantes de los ensayos miR-218 mimic en las fases tempranas de la calcificación de la CMLV podrían resultar de forzar la expresión de miR-218 en un sistema diferente al del osteoblasto, donde se han descrito todas estas asociaciones funcionales promocionando la diferenciación osteoblástica. Durante la evolución natural del proceso de calcificación, la expresión y actividad de miR-218 debe ir preferiblemente dirigida a la activación indirecta de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, y no de

BMP-2/*Runx2* (Hassan M y cols., 2012) y probablemente de la regulación de la expresión de calumenina. Ello explicaría por qué la sobreexpresión tardía de miR-218 no se asoció con la represión de *RUNX2* en el modelo de calcificación de la CMLV desarrollado en esta Tesis.

Además, es importante recordar que en este trabajo de Tesis se observó una relación inversa entre los perfiles temporales de expresión de *CALU* y *CTNNB1*. La sobreexpresión tardía de miR-218 y miR-132 podría explicar tal relación inversamente proporcional entre *CALU* y *CTNNB1*. Sin embargo, en este trabajo no se estudió la función de miR-132 y miR-218 en el contexto de la CMLV osteodiferenciada (fases tardías). Por tanto, la función aquí sugerida para miR-132 y miR-218 durante las fases tardías de la calcificación de la CMLV, aunque atractiva, es simplista, necesita de confirmación y garantiza una mayor profundización futura.

## **OBJETIVO 2. Analizar el papel de la MEC en un modelo celular de calcificación vascular en cultivos primarios de célula de músculo liso vascular humana y de ratón**

### **❖ *La HPM induce cambios de expresión del colágeno tipo I en la CMLV***

La MEC es el componente mayoritario de los tejidos mineralizados. Alrededor de un 90% del hueso está constituido por colágeno tipo I y su síntesis está estrictamente regulada (Risteli, M. 2008; Behonick DJ y cols., 2003; Burdan F y cols., 2009; De la Fuente A y cols., 2012; Wilson R y cols., 2012; Nakazawa T y cols., 2004; Alford AI y cols., 2010). Éste es el principal sustrato de nucleación de los cristales de bioapatita y confiere fuerzas de tensión y funcionalidad osteoblástica (Bonucci E. 2006; Ross, MH, 2011). Como en el hueso, en la calcificación vascular la disponibilidad de un sustrato de mineralización es un requisito fundamental junto con la osteodiferenciación de la CMLV. Por tanto, la síntesis de una MEC madura rica en colágeno tipo I es fundamental en el establecimiento de un sustrato susceptible de mineralizarse, así como de promover la diferenciación osteoblástica de las células vasculares (Johnson RC y cols., 2009). Diferentes condiciones pro-calcificantes inducen la síntesis *de novo* de MEC como parte de la transdiferenciación de la CMLV (Murakami T y cols., 2009; Saito A y cols., 2009; Tohmonda T y cols., 2011). En este sentido, el daño vascular

propio de los procesos ateroscleróticos promueve el remodelado y reorganización de la MEC mediante la promoción de la migración y proliferación de la CMLV localizada en la media (Fuster JJ y cols., 2010; Dzau VJ y cols., 2002). Anormalidades mecánicas y bioquímicas en la MEC ejercen una influencia significativa sobre el fenotipo de la CMLV (Kim SH y cols., 2011). Además, el remodelado de la MEC vascular se ha asociado con la sobreexpresión de diferentes factores osteogénicos incluidos Runx2/Cbfa1, Osterix,  $\beta$ -catenina y colágeno tipo I (Bailey M y cols., 2004). Así pues, la MEC constituye una entidad no celular capaz de promover la comunicación intercelular e inducir la diferenciación celular (Bailey M y cols., 2004; Bonucci E. 2006; Johnson RC y cols., 2009; Kadler KE y cols., 2007).

Una publicación de Villa-Bellosta R y colaboradores (Villa-Bellosta R y cols., 2011 (I); Villa-Bellosta R y cols., 2011 (II)) plantea que la carencia de inhibidores naturales de la calcificación combinada con Pi facilitaría una deposición pasiva inicial y breve de calcio. Esta modificación inicial de la MEC debe constituir un estímulo *per se* de transdiferenciación de la CMLV (Bonucci E. 2006; Bailey M y cols., 2004; Johnson RC y cols., 2006), al margen de la internalización del Pi. Además, los cristales de hidroxiapatita son *per se* pro-inflamatorios, lo que crea un círculo retroalimentado entre calcificación e inflamación y demuestra la importancia de la MEC en la progresión de la calcificación vascular (Evrard S y cols., 2015).

Para el estudio del papel de la MEC en el proceso de la calcificación vascular los criterios de evaluación incluidos en esta Tesis fueron la deposición de calcio, la expresión de genes de diferenciación osteoblástica y marcadores fenotípicos (*TAGLN* y *BGLAP*). Además, se incluyó el estudio de genes relacionados con la biosíntesis de colágeno en asociación con la HPM y se valoró la biosíntesis y secreción de colágeno en medios sobrenadantes mediante ensayo basado en la tinción rojo de picrosirio y posterior solubilización (Alford AI y cols., 2010).

En el modelo de CMVL humana desarrollado en esta Tesis, *la HPM se asoció con una expresión de COL1A1 y COL1A2 en fases tempranas*. Estos resultados coinciden con publicaciones previas, tanto para la diferenciación osteoblástica (Hong HH y cols., 2004) como para las fases inmaduras condroblásticas (Wilson R y cols., 2012). Esta regulación génica *se asoció con la biosíntesis de colágeno en la CMVL sometida a HPM* en el siguiente punto temporal analizado. Otras publicaciones han

demostrado la transitoriedad de la expresión de los elementos colagénicos (Wilson R y cols., 2012; Nakazawa T y cols., 2004).

Así, Alford y colaboradores (Alford AI y cols., 2010) ya han descrito previamente el desacoplamiento entre la expresión génica y la secreción de colágeno, también observados en este trabajo de Tesis (Alford AI y cols., 2010). Adicionalmente, los autores mostraron un cambio transitorio en la solubilidad de colágeno. Después de 4 días, los cambios paralelos entre el colágeno soluble total y los valores de colágeno insoluble indicaron una relación entre la síntesis *de novo* de colágeno y la maduración de la MEC. Por tanto, tras la secreción del tropocolágeno se necesitan de 3-4 días para la insolubilización del colágeno. En este trabajo de Tesis los medios sobrenadantes se recogieron para la valoración del colágeno soluble cada  $\leq 4$  días. Por tanto, *la elevación y cambios de los valores de colágeno en la condición de HPM para cada punto temporal analizado debe reflejar la progresiva acumulación y renovación del mismo* (Wilson R y cols., 2012).

### ❖ *La HPM de CMVL produce regulación positiva transitoria de la expresión génica de PLOD1 y LOX*

La síntesis de MEC no sólo implica la producción de colágeno. La biosíntesis del colágeno es un proceso complejo que implica modificaciones post-traduccionales intracelulares y extracelulares, el ensamblaje de las cadenas alfa de pro-colágeno (cadenas pro- $\alpha$ ) y su secreción, el procesamiento de los extremos C y N-terminales y el entrecruzamiento intra e intermolecular. Es por ello que el estudio de la biosíntesis de MEC durante los procesos de biomineralización no sólo se ha abordado desde el punto de vista de la producción de colágeno, sino que incluye la valoración de glicosaminoglicanos y otras proteínas de matriz no colagénicas, además de perfiles de expresión variables. Y de hecho, ensayos bioinformáticos sugieren la importante participación de vías moleculares implicadas en el entrecruzamiento colagénico y la mineralización ósea también en la calcificación vascular (Shindyapina AV y cols., 2014).

Además de los perfiles de expresión del colágeno, la expresión de proteínas de matriz no colagénicas también muestran patrones temporal-dependientes (Wilson R y cols., 2012; Nakazawa T y cols., 2004). El estudio proteómico de Wilson y

colaboradores (Wilson R y cols., 2012) demostró que la osificación endocondral se caracteriza por una regulación temporal del repertorio de proteínas de RER e implicadas en la biosíntesis de proteínas, más allá de la exclusiva biosíntesis de elementos colagénicos. Además mostraron el importante control de calidad al que son sometidas las moléculas de colágeno tanto en fases tempranas como tardías de la diferenciación; si bien la biosíntesis de colágeno es mayor durante las fases tempranas de la maduración condroblástica. Destacaron los cambios relativos a las proteínas lumbales de RE de unión a calcio, como calumenina, que aparecieron excepcionalmente elevados en los estadios de condroblastos hipertróficos, de forma similar a los resultados obtenidos en esta Tesis. También destacó la sobreexpresión de las ‘oxigenasas oxoglutarato y dependientes de hierro’ y ‘dioxigenasas de prolinas’ que incluyen las actividades enzimáticas prolil-4 hidroxilasa P4H, lisil hidroxilasas PLOD1 y PLOD2, prolil-3 hidroxilasa P3H y procolágeno galactosil transferasa-1. Todas estas enzimas intracelulares del RE generan modificaciones post-traduccionales de ciertos residuos aminoacídicos en los precursores colagénicos. Las formas hidroxiladas de Lys y Pro son imprescindibles para generar los entrecruzamientos intermoleculares e intramoleculares de las cadenas pro- $\alpha$  (Wilson R y cols., 2012). Las LHs, pero no las P4H, modifican covalentemente los aminoácidos del colágeno tipo I en condiciones fisiológicas y patológicas. Por otro lado, la lisil oxidasa extracelular LOX cataliza la hidroxilación de Lys en la molécula de tropocolágeno (Hong HH y cols., 2004).

La importancia del entrecruzamiento de las moléculas de colágeno en la calcificación, independientemente del tipo o fenotipo celular, se ha observado con el entrecruzamiento espontáneo propio del envejecimiento que es capaz de proporcionar sitios de nucleación de apatita (Li F y cols., 2012). Además, todas estas enzimas requieren ascorbato además de  $Fe^{2+}$ , 2-oxoglutarato y  $O_2$  (Gelse K y cols., 2003; Myllyharju J y cols., 2003). Es importante resaltar que el ascorbato (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) se utiliza como suplemento en el condicionamiento de fibroblastos y de la CMLV resultando en un incremento de la concentración de colágeno soluble y de la mineralización si se combina con formas orgánicas de fosfato (Dembure PP y cols., 1987; Trion A y cols., 2008).

La participación de las actividades PLOD y LOX se asocia con procesos de diferenciación osteoblástica y condroblástica. Por un lado, tanto PLOD1 como PLOD2 contienen múltiples elementos de unión a la proteína bicoide PITX2, y se co-expresan

en múltiples tejidos con una importante repercusión en la diferenciación osteoblástica de miocitos (Hjal TA y cols., 2001; Hayashi M y cols., 2008). Por otro lado, la expresión de LOX está regulada durante el proceso normal de diferenciación osteoblástica (Hong HH y cols., 2004) y la máxima sobreexpresión precede la fase más eficiente de acumulación e insolubilización del colágeno.

Además, la función de LOX en el desarrollo del sistema cardiovascular y respiratorio es única como demuestra la letalidad de los modelos murinos knock-out para LOX (Orriols M y cols., 2014). Como estrategia alternativa al desarrollo de modelos knock-out, Orriols M y colaboradores desarrollaron recientemente un modelo murino sobre-expresando LOX humana. La sobreexpresión de LOX regula la actividad proliferativa y la plasticidad fenotípica de la CMLV (mediante la valoración de Myh10), y participa en el desarrollo de remodelado vascular inducido por ligación de arteria carótida (Orriols M y cols., 2014); si bien el LOX-PP escindido proteolíticamente de la forma activa de LOX debe ejercer un efecto anti-proliferativo, al menos sobre la CMLV de rata (Hurtado PA y cols., 2008). Además CMLV de rata adulta quiescentes sobreexpresan LOX tras la aplicación de estímulos proliferativos (Rodríguez C y cols., 2008). En consecuencia, los fenotipos quiescentes de CMLV inducidos por HPM u otros agentes pro-calcificantes deberían de asociarse con una regulación temporal de la expresión de LOX.

En este trabajo se ha demostrado, por primera vez, que la mineralización y la transdiferenciación de la CMLV sometida a HPM incluye la *regulación positiva transitoria de la expresión génica de lisil hidroxilasas (PLOD1, intracelular; LOX, extracelular)*. Estos resultados sugieren la necesidad de cambios cualitativos, además de cuantitativos, en la síntesis *de novo* de MEC durante la calcificación vascular.

En este modelo los genes *PLOD1* y *LOX* se sobreexpresaron en los días 3-4, en paralelo con *COL1A1* y *COL1A2*. Por tanto, la formación de precursores de colágeno y su entrecruzamiento muestran cambios temporal-dependientes durante la maduración de la MEC y su mineralización en la calcificación vascular. Es importante destacar que la mineralización de la MEC ya se ha asociado con cambios cualitativos del colágeno (Kuboki Y y cols., 1992) y ambas actividades enzimáticas analizadas son necesarias para la maduración y calidad del colágeno.

Adicionalmente, la sobreexpresión de colágeno y de las enzimas PLOD1 y LOX debe preceder a la acumulación e insolubilización del colágeno sintetizado *de novo*. Esta *regulación es transitoria de acuerdo con publicaciones previas* (Hong HH y cols., 2004) y con los resultados derivados de este trabajo de Tesis. De forma semejante se ha descrito en osteoblastos en diferenciación una sobreexpresión inicial de colágeno asociada con la sobreexpresión de LOX (Hong HH y cols., 2004). En definitiva, los resultados de este trabajo de Tesis indican la importancia de la hidroxilación en los dominios helicoidales de la molécula de colágeno, como ya se ha planteado para las células osteoprogenitoras (Uzawa K y cols., 1999). Todos estos datos en conjunto muestran la relevante participación las LH en el proceso de calcificación.

Finalmente, *los cambios de expresión de PLOD1 y LOX (Plod1, Lox y LoxL en ratón) y de biosíntesis de colágeno se asociaron con mayores grados de mineralización y de expresión de marcadores de diferenciación osteoblástica, incluida la osteocalcina*. La regulación de estas enzimas durante la osteodiferenciación de la CMLV sugiere una afectación funcional y de expresión de las mismas ante situaciones que promuevan los mecanismos de estrés del RE tales como la HPM o la ausencia de inhibidores naturales (Boraldi F y cols., 2009; Shanahan CM y cols., 2011; Reynolds JL y cols., 2004; Chen NX y cols., 2008; Farzaneh-Far A y cols., 2000; Farzaneh-Far A y cols., 2001(I); Farzaneh-Far A y cols., 2001(II); Shanahan CM y cols., 1994; Duan X y cols., 2009). De hecho, el estrés del RE es capaz de regular la expresión de Runx2/Cbfa1 y la secreción de colágeno tipo I en el metabolismo óseo (Murakami T y cols., 2009; Saito A y cols., 2009; Tohmonda T y cols., 2011), lo que de nuevo indica la activación de la biosíntesis de MEC durante la diferenciación osteoblástica. Finalmente decir que la superposición del estadio de síntesis y acumulación de MEC y del estadio de mineralización ya ha sido descrita en el contexto de la maduración condroblástica y osteoblástica (Wilson R y cols., 2012; Nakazawa T y cols., 2004; Hong HH y cols., 2004).

**❖ *La regulación de las actividades enzimáticas PLOD y LOX afecta la mineralización y diferenciación osteoblástica de la CMLV sometida a HPM***

La importancia del grado de entrecruzamiento del colágeno ya ha sido sugerida en la patología cardiovascular (Badenhorst D y cols., 2003; Gunja-Smith Z y cols.,

1996) y debe contribuir a la esclerosis vascular. El remodelado de la MEC propio de los procesos arterioscleróticos no implica necesariamente un incremento cuantitativo del colágeno. Un entrecruzamiento inter e intramolecular de las subunidades de colágeno es capaz *per se* de incrementar la rigidez del vaso (Norton GR y cols., 1997). Por tanto, tanto la expresión de colágeno como la sobreexpresión de las actividades enzimáticas encargadas de regular el ensamblaje y entrecruzamiento debe tener efectos sobre el propio ensamblaje del colágeno y su retención en la MEC sintetizada *de novo*, su mineralización y la inducción de diferenciación celular. La sobreexpresión de PLOD1 y LOX en CMLV sometidas a HPM descrita en este trabajo demuestra la importancia de la calidad del entrecruzamiento en el proceso de calcificación vascular.

Inicialmente se evidenció el papel de LOX en dos modelos de CMLV murinas (CMLVr) dada la posibilidad de utilizar CMLVr silvestres o transgénicas para la expresión de LOX. Además, estudios previos han demostrado el efecto de 2,2'-dipiridil y BAPN sobre la diferenciación y maduración osteoblástica (Hong HH y cols., 2004), pero no existen estudios específicos en modelos de calcificación vascular. Así pues, se utilizó 2,2'-dipiridil en CMLVr para evidenciar la importancia de la regulación de las actividades PLOD. Finalmente se confirmaron los resultados en CMLV humanas mediante inhibidores químicos. La utilización de inhibidores de las actividades enzimáticas PLOD y LOX/LOXL, así como el desequilibrio generado por la sobreexpresión de LOX en las CMVLR transgénicas, alteró la mineralización y diferenciación osteoblástica dependientes de HPM, en ambos tipos de CMLV (murina y humana).

El efecto de agentes latirogénicos como el BAPN, se ha asociado con un reducción de la actividad LOX. Di Cesare PE y cols. (Di Cesare PE y cols., 1994), demostraron una menor mineralización de matrices óseas desmineralizadas en ratas latíricas que en ratas normales; si bien el efecto se revirtió tras 4 semanas. También la producción de matrices extirpadas de ratas latíricas y por tanto con una elevada afectación del entrecruzamiento colagénico resultaba en una menor capacidad osteoinductiva. También el mayor grado de entrecruzamiento e insolubilización del colágeno resultante de la diabetes, un importante factor de riesgo aterosclerótico y de calcificación vascular, es inhibido por BAPN (Maruel E y cols., 1982).

La expresión y funcionalidad de LOX también tuvieron un impacto sobre la osteodiferenciación de la CMLV además de afectar la mineralización. La inhibición de

LOX/LOXL, mediante la suplementación de BAPN, previene la diferenciación osteoblástica de la CMLV sometida a HPM. Siempre en concordancia con el silenciamiento de LOX en la CMLVh y, sobretodo, con los estudios de sobreexpresión de LOX realizados con CMLVr transgénico. Esta regulación de la osteodiferenciación se estudió sobre la regulación del eje *BMP-2/RUNX2*/osteocalcina y también se asoció con la preservación del fenotipo muscular (expresión y síntesis de SM22- $\alpha$ ). BMP-2 media la fosforilación de Runx2/Cbfa1 lo que induce e incrementa la expresión del mismo (Cai J y cols., 2012; Shu B y cols., 2011). La fosforilación de Runx2 es dependiente de la vía del MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) cuya activación depende de las interacciones célula-MEC mediada por integrinas y de la acción de factores de crecimiento (Franceschi RT y cols., 2003), indicando la relevante participación de la MEC en la activación de los factores de diferenciación osteoblástica.

Además, el uso de agentes latirogénicos debe inhibir o retrasar la acumulación del colágeno insoluble en la MEC, registrándose concentraciones mayores de colágeno soluble (Gerstenfeld L y cols., 1984; Maruel E y cols., 1982; Smiley JD y cols., 1962); si bien no se pudo registrar un pico de colágeno en comparación con el control de HPM, incluso a pesar una rápida sobreexpresión génica de colágeno. Los valores de colágeno descritos en este trabajo deben resultar de la acumulación del mismo y su menor procesamiento en comparación con los valores temporal-dependientes descritos para los controles de HPM. Por tanto, LOX debe ser fundamental en la retención y ensamblaje de una MEC derivada de CMLV calcificantes durante su mineralización y un nuevo elemento de regulación de la calcificación ectópica hasta ahora sólo descrito en la osteogénesis (Wilson R y cols., 2012).

Los resultados del presente trabajo concuerdan con los derivados de pre-osteoblastos *knock-out* para LOX en los que la mineralización y diferenciación se redujo en asociación con una menor expresión de colágeno tipo I, Runx2/Cbfa1 y BSP (Pischon N y cols., 2009). Sin embargo, la utilización de BAPN ejerce una inhibición generalizada de las actividades enzimáticas LOX y LOXL, por lo que los resultados, al menos en CMLVh, no pueden atribuirse exclusivamente a LOX. El silenciamiento de LOX podría proporcionar más información acerca de la participación de LOX y LOXL en la calcificación de la CMLVh, sin embargo los silenciamientos llevados a cabo resultaron en mineralizaciones masivas incluso para los controles, comparados con los grados de calcificación reportados a lo largo del desarrollo de esta Tesis.

Aunque la inhibición de PLOD también resultó en una rápida inhibición de la mineralización de la MEC, los resultados fueron controvertidos. Se observó un desequilibrio entre la expresión génica del colágeno y su secreción. Mientras la expresión génica se reguló negativamente, la concentración de colágeno soluble fue mayor que cualquiera de las condiciones estudiadas en ese punto temporal. Este desequilibrio sugiere una rápida sobreexpresión y síntesis del colágeno en estas condiciones y su acumulación en el medio sobrenadante. El tratamiento 2,2'-dipiridil se asoció además con la sobreexpresión de LOX en ambos tipos celulares (CMLVr y CMLVh), probablemente como mecanismo compensatorio para el ulterior procesamiento extracelular del colágeno sintetizado. Esta rápida prevención de la mineralización se asoció con una menor activación del programa de diferenciación osteogénico. Galvin y colaboradores (Ryan LM y cols., 1991) demostraron que 2,2'-dipiridil inhibe la trimerización del colágeno y la hidroxilación de Pro y ALP en células osteoblásticas, lo que pone de manifiesto la importancia de la MEC en la osteodiferenciación. Desafortunadamente, los resultados hasta el momento no nos permiten distinguir si el efecto protector resulta de la capacidad de la MEC para inducir diferenciación celular o si es un efecto secundario del 2,2'-dipiridil sobre la expresión génica.

Sorprendentemente, el efecto protector de 2,2'-dipiridil se perdió rápidamente. Después de 2 días, 2,2'-dipiridil indujo la mineralización de la MEC y la pérdida del fenotipo muscular. Los trabajos previos utilizando 2,2'-dipiridil para alterar la síntesis de MEC, han realizado tratamientos breves de horas y no de días (Barsh GS y cols., 1981; Nabavi N y cols., 2008). Además, 2,2'-dipiridil inhibe la producción de PPI (Ryan LM y cols., 1991), un potente inhibidor natural de la calcificación (Kuboki Y y cols., 1992). Es más, 2,2'-dipiridil se ha descrito como un 'agente inductor de hipoxia química' ya que desencadena la activación de la señalización intracelular propia de procesos de hipoxia incluyendo la disminución del consumo de glucosa, efectos pro-inflamatorios en la aterosclerosis y la modulación de la diferenciación vascular (Ferguson JE 3rd y cols., 2007; Bilton RL y cols., 2003; Hung HF y cols., 2008). Otros agentes inhibidores de prolil hidroxilasas (como P4H) también promueven la osteogénesis y se emplean como agentes terapéuticos en la regeneración de tejido óseo fracturado. Un ejemplo es el de la dimetiloxaliglicina (DMOG) sobre los osteoblastos MDPC-23 y el incremento

de mineralización de la MEC, actividad ALP, expresión de dentina sialoproteína (DSP), Runx2/Cbfa1 y osteocalcina (Rahman SU y cols., 2004).

Somos conscientes que los resultados de este trabajo no ofrecen soporte al uso de 2,2'-dipiridil como protector de la calcificación vascular, pero se ha evidenciado el potencial de PLOD1 como diana terapéutica y una mayor profundización debe llevarse a cabo incluyendo sistemas de silenciamiento de la misma (ensayos *knock-down*).

Estos resultados ponen de manifiesto la importante contribución de la MEC al proceso global de la calcificación vascular, así como la importancia de la hidroxilación de ciertos residuos aminoacídicos en los precursores de colágeno. La expresión de las enzimas PLOD1 y LOX forma parte del proceso de transdiferenciación de la CMLV hacia formas osteoblásticas. Por tanto, la síntesis impedida de MEC debe regular la expresión de genes osteogénicos, incluidos LOX y PLOD1, y la progresión de la patología aterosclerótica, constituyendo un nuevo punto de regulación terapéutica.

**OBJETIVO 3. Comparar los efectos de la warfarina y el acenocumarol, sobre la mineralización y activación del programa de diferenciación osteoblástica, en un modelo de calcificación vascular en cultivos primarios de célula de músculo liso vascular humana**

❖ *La utilización de acenocumarol es una alternativa eficaz para reproducir la calcificación de la CMLV en la media*

El acenocumarol, al igual que la warfarina, se administra como una mezcla racémica de enantiómeros R y S (Ufer M., 2005; Thijssen HH y cols., 2000). Tras la administración oral de los fármacos anti-vitamina K, estos son rápidamente absorbidos a nivel gastrointestinal y completamente biodisponibles a excepción del enantiómero S-acenocumarol que precisa de una metabolización inicial. El resultado es una biodisponibilidad del 60% tras su administración oral (Ufer M., 2005; Thijssen HH y cols., 2000). Además, las tasas de aclaramiento y la vida media de los diferentes fármacos anti vitamina K también es diferente. También existen diferencias en cuanto al tiempo de aclaramiento. El tiempo de vida media de la warfarina es de unas 40h mientras que la del acenocumarol es de unas 5-8 h; esto permite que warfarina permanezca más tiempo en el torrente sanguíneo ejerciendo su inhibición del sistema de

reciclaje de la vitamina K, pero también incrementa el tiempo de exposición en los vasos. Es por ello que a pesar de las similares estructuras químicas, existen diferencias farmacocinéticas y farmacodinámicas entre ambos fármacos, si bien ambos se han asociado con la calcificación de la media y la depleción de los inhibidores naturales vasculares de la calcificación (PVKD).

La utilización y dosificación de warfarina para inducir la calcificación *in vitro* e *in vivo* está bien establecida. Nuestro grupo tiene amplia experiencia en el manejo de los anticoagulantes anti-vitamina K en la práctica clínica. El acenocumarol es el fármaco anti-vitamina K más utilizado en España. En este trabajo de Tesis se ha estudiado la respuesta de la CMLV al estímulo calcificante inducido por la warfarina y el acenocumarol. Se utilizó la dosis sub-terapéutica más baja de warfarina descrita en la literatura para su utilización en cultivos celulares y se ajustó la concentración de acenocumarol.

Como se ha explicado anteriormente, las warfarina y acenocumarol presentan diferencias farmacocinéticas y farmacodinámicas evidentes. Las consecuencias son claras si se considera que la gamma-carboxilación dependiente de vitamina K no hepática es aparentemente más sensible a estos fármacos y es posible su inhibición incluso para dosis sub-terapéuticas, como las empleadas en este trabajo de Tesis. Estudios recientes demuestran que dosis bajas de warfarina son capaces de inhibir la carboxilación periférica sin afectar la hepática (Hara K y cols., 2005). Las dosis típicamente empleadas en la literatura muestran la utilización de concentraciones de fármacos anti-vitamina K de 1-50  $\mu\text{M}$  (Gschwind L y cols., 2013). En este trabajo se ha utilizado una dosis sub-terapéutica de warfarina de 5  $\mu\text{M}$  y se ha adaptado la dosis de acenocumarol de acuerdo con la proporción de dosis realizada en nuestra área geográfica (2  $\mu\text{M}$  acenocumarol).

El efecto de los anti-vitamina K sobre el desarrollo de calcificación vascular se ha evidenciado en modelos animales e *in vitro*. Tantisattamo y cols (Tantisattamo y cols., 2015), publicaron en un gran número de pacientes llevadas a mamografía, que el tratamiento a base de warfarina y la duración del mismo se asociaban con mayor grado de calcificación arterial mamaria. El impacto traslacional de estas observaciones fue enorme dadas las implicaciones clínicas de la calcificación vascular y los millones de pacientes en tratamiento anticoagulante oral a base de fármacos anti-vitamina K (Roth

JA y cols., 2014). La utilización de la TCC ha sugerido una asociación entre el uso de warfarina y la calcificación valvular y coronaria (Koos R y cols., 2005) confirmando los resultados del análisis histopatológico de tejido procedente de reemplazamiento valvular, en que el uso de warfarina se asoció con el de calcio valvular (Schrugers LJ y cols., 2004). Sin embargo, no existen estudios clínicos diseñados exclusivamente para el estudio de la asociación entre la calcificación vascular y el uso de fármacos anti-vitamina K, por lo que las evidencias son indirectas y controvertidas. Sin la realización de estudios prospectivos incluyendo un gran número de pacientes, el posible impacto clínico de los anti-vitamina K sólo se apoya con datos de estudios de asociación. En este trabajo, solo un porcentaje muy bajo de pacientes estaban medicados con fármacos anti-vitamina K y resultó insuficiente para alcanzar poder estadístico (datos no incluidos).

La principal explicación fisiopatológica recae sobre la inhibición de la gamma-carboxilación dependiente de vitamina K no hepática y la depleción de Gla-MGP o cMGP (Luo G y cols., 1997; Howe AM y cols., 2000). El déficit extra-hepático de vitamina K combinado con tratamiento a base de warfarina en rata demostró una extensa calcificación arterial (Howe AM y cols., 2000), afectando principalmente la túnica media y las válvulas en ratón de una forma semejante a la demostrada en ratones deficientes para MGP (Price PA y cols., 1998). Algunas observaciones recientes sugieren que los pacientes anticoagulados con warfarina por enfermedad vascular periférica tienen un riesgo de sangrado unas 10 veces mayor que los pacientes anticoagulados por otros motivos (Anand S y cols., 2007). Considerando, el papel de la MGP en la preservación y conservación de la homeostasis vascular, las asociaciones entre calcificación vascular y uso de anti-vitaminas K podría reflejar un fallo global en el sistema de gamma-carboxilación resultando lógicamente en la inhibición de los factores de la coagulación y la pérdida de la homeostasis vascular. Además, los métodos actuales disponibles para evaluar el estatus de gamma-carboxilación a partir de la valoración de las formas carboxiladas de factores de la coagulación podría subestimar el estatus basal dependiente de la gamma-carboxilación no hepática o periférica, cuyas PVDK son más sensibles a la warfarina, incluso a dosis sub-terapéuticas, y con algunas diferencias respecto a la gamma-carboxilación hepática (Dazinger J. 2008).

Además, warfarina se ha relacionado con una represión de la expresión de MGP en ratón, por lo que el efecto no debe ser exclusivamente atribuido al déficit en la gamma-carboxilación, sino que también a la disponibilidad de MGP (Palaniswamy C y

cols., 2011). Así pues, el déficit de cMGP generado por la terapia a base de fármacos anti-vitamina K, además, podría alterar la angiogénesis y la homeostasis de la vasculatura facilitando procesos de sangrado cerebrovascular. Como alternativa terapéutica emergen los nuevos anticoagulantes, pero su efecto sobre la calcificación vascular todavía está pendiente de definir.

En este Trabajo, se ha evidenciado que tanto warfarina como acenocumarol incrementan la cantidad de calcio acumulado en cultivos celulares, así como la velocidad de la calcificación de los mismos. Sin embargo, se han observado diferencias entre acenocumarol y warfarina, siendo más rápida la calcificación en medios con acenocumarol, donde al segundo día ya se manifiestan diferencias respecto del control. Estas diferencias entre fármacos parecen igualarse a partir del sexto día de tratamiento, cuando ambas concentraciones de calcio son comparables.

Se ha encontrado un patrón de expresión de CALU diferente en asociación con la suplementación de compuestos anti-vitamina K. El acenocumarol indujo la sobreexpresión de CALU a día 9, coincidiendo con una mayor síntesis de calumenina. Este incremento de calumenina coincidió con la sobreexpresión de los marcadores de diferenciación osteoblástica. Una publicación reciente de Wilson y cols (2009 y 2012), mostró que calumenina y otras reticulocalbinas efectivamente se regulan durante la maduración condroblástica. A diferencia de otros factores implicados en la biosíntesis de proteínas, calumenina y reticulocalbinas se sobre-expresaron en las fases de maduración del condroblasto, coincidiendo con la hipertrofia del condroblasto y su reemplazamiento a osteoblastos.

Todo ello sugiere, que acenocumarol efectivamente podría reconstruir el proceso de osificación endocondral desarrollado en la túnica media vascular bajo determinadas situaciones patológicas. Por ejemplo, la patología congénita *PXE*, como el uso de derivados cumarínicos, se asocia con una calcificación que requiere de intermediarios condroblásticos (osificación endocondral). Esta patología se asocian con la sobreexpresión de calumenina durante todo el proceso de calcificación, al contrario de lo observado en hueso y en el modelo de calcificación de la CMLV dependiente de HPM desarrollado en esta Tesis y para el que calumenina se expresó temporalmente. Una publicación reciente de Wilson y colaboradores (Wilson y cols., 2009 y 2012), mostró que calumenina y otras reticulocalbinas efectivamente se regulan durante la maduración condroblástica. A diferencia de otros factores implicados en la biosíntesis

de proteínas, calumenina y reticulocalbinas se sobreexpresaron en las fases de maduración del condroblasto, coincidiendo con la hipertrofia y el reemplazamiento a osteoblastos.

A diferencia de warfarina, calumenina no parece ser capaz de unir e inhibir acenocumarol, por lo que se genera un sinergismo entre ambos capaz de incrementar la mineralización y la diferenciación de la CMLV hacia un fenotipo condroblástico. Sin embargo, estudios funcionales encaminados a corroborar los resultados obtenidos apoyarán estas evidencias generadoras de hipótesis.

---

## **Sección IX. Limitaciones**



En esta sección se enumeran las principales limitaciones del presente trabajo de Tesis. En primer lugar, presenta una serie de limitaciones técnicas tales como los factores que influyen en la reproducibilidad de la cuantificación del calcio coronario; se relacionan principalmente con artefactos resultantes del latido cardiaco y los movimientos respiratorios del paciente, errores en el registro ECG, ruido de la imagen y artefacto por volumen parcial. El ritmo cardiaco sufre fluctuaciones en apnea, reduciéndose durante el inicio del proceso inspiratorio e incrementando al final del mismo. Además la utilización de poca radiación dificulta la detección de pequeños depósitos de calcio y resulta en un incremento del ruido de fondo, aunque es corregible mediante el incremento de radiación.

Por otro lado, las muestras de tejido femoral o poplíteo analizadas para estudiar la asociación entre el polimorfismo (A29809G) y la disponibilidad local de calumenina fueron tomadas de pacientes en estadios avanzados de calcificación. No obstante, la acumulación extracelular de calumenina en el modelo *in vitro* de calcificación de la CMLV es concordante con la acumulación tisular de la misma.

Además, la disponibilidad de tejidos con diferentes grados de calcificación debería resultar en diferentes cantidades de tejido disponible para las ulteriores tinciones histológicas. Sin embargo, los diferentes grados de mineralización valorados por tinción Alizarin Red, se asociaron con el genotipo subyacente en concordancia con los hallazgos de calcio coronario y genotipo.

Aunque los pacientes incluidos en este estudio eran ambulatorios y estaban estables, los hallazgos de calcificación coronaria indican, en realidad, que se incluyen pacientes con estadios avanzados de calcificación y diferentes grados de severidad que reflejan una aterosclerosis avanzada.

El estímulo osteogénico se basó en una condición de hiperfosfatemia, pero otros inductores, además de la hiperfosfatemia local, se han asociado con el desarrollo de calcificación vascular. Ahora bien, la utilización de hiperfosfatemia está ampliamente utilizada en el desarrollo de protocolos *in vitro* de calcificación vascular bien mediante la utilización de fosfatos inorgánicos como orgánicos.

En la utilización exógena de miRNAs para confirmar la regulación de calumenina en la CMLV y evaluar su efecto sobre la calcificación temprana de la CMLV, los resultados sugieren una regulación de BMP2 y DKK2. Ambos fueron

predichos mediante análisis bioinformático como potenciales dianas de los miRNA estudiados en este trabajo. Aunque son varias las publicaciones originales que han demostrado la regulación de tales dianas, los resultados de este trabajo son meramente descriptivos y no concluyentes. La confirmación definitiva de la regulación se establecería de forma rápida y sencilla con la elaboración de construcciones plasmídicas conteniendo las regiones de interacción predichas para miR-132-3p y miR-218-5p sobre BMP2 y DKK2/CTNNB1, respectivamente, pero queda fuera de los objetivos de este trabajo.

La utilización exógena de miRNAs puede ejercer mecanismos de acción variables dependiendo del fenotipo celular como demuestra la expresión endógena de miR-132-3p durante la osteodiferenciación de la CMLV inducida por HPM y el efecto de la sobreexpresión exógena temprana de miR-132-3p. Además, en este trabajo sólo se ha evidenciado la regulación de calumenina mediante la utilización de vectores de expresión conteniendo la región 3'-UTR CALU y, por tanto asociada con la desestabilización del mRNA CALU. Sin embargo, los resultados de los ensayos miRNA mimic evalúan el efecto global del miRNA, por lo que otras regulaciones diferentes de la putativa sobre 3'UTR podrían estar ocurriendo.

Es importante remarcar que BAPN ejerce inhibición sobre la actividad LOX/LOXL y no es exclusivo de LOX. Por tanto, los efectos sobre la calcificación presentados en esta Tesis resultan de la afectación global de la actividad lisil oxidasa en general. Sin embargo, los resultados concuerdan con lo observado en los ensayos de sobreexpresión de LOX utilizando CMLV de ratón silvestre y transgénico. El silenciamiento de LOX podría proporcionar más información sobre el papel concreto de LOX en la calcificación vascular. Desafortunadamente, se encontró una mineralización masiva no esperable de acuerdo con los resultados previos. Además, las fracciones ácido-soluble y pepsina ácido soluble del colágeno en las CMLV diferenciadas a osteoblastos deben ser descritas tal y como se ha publicado recientemente para pre-osteoblastos. Sin embargo, los resultados de este trabajo sugieren la importante contribución de la MEC y su maduración al proceso global de la calcificación vascular.

El estudio del efecto de la warfarina y el acenocumarol requiere de mayor profundización en su asociación con la expresión de calumenina y la valoración de marcadores condroblásticos.

\_\_\_\_\_ **Sección X. Conclusiones/*Conclusions***



Las conclusiones de este trabajo de Tesis se presentan respondiendo a los objetivos señalados en la Sección IV.

*Conclusions from this Thesis are showed replying each individual aim included into Section IV.*

**1. Estudio de la relevancia del polimorfismo rs1043550 afectando la región 3'-UTR del gen *CALU* y evaluación de la participación de la proteína calumenina en el proceso de la calcificación vascular.**

*Relevance assessment of both rs1043550 SNP affecting the 3'-UTR CALU and the role of calumenin during vascular calcification.*

- 1.1. El estudio de la implicación clínica del polimorfismo *CALU* rs1043550 (A29809G) en una población de bajo riesgo sugiere que la presencia del polimorfismo se asocia con un efecto protector sobre la calcificación vascular, lo que resulta en puntuaciones menores del contenido de calcio coronario valorado mediante TCC multicorte y escala Agatston.

*The assessment of the clinical impact related to CALU SNP rs1043550 in a low risk cohort suggests that the SNP carriage is associated with a protective effect on vascular calcification leading to low coronary calcium scores assessed by MultiSliced Coronary Computed Tomography and the Agatston score.*

- 1.2. El estudio de la expresión tisular de calumenina en asociación con el polimorfismo SNP *CALU* rs1043550 (A29809G) indica que la presencia del polimorfismo se asocia con un menor contenido de calumenina tisular. Dada la función fisiológica de la calumenina sobre la regulación del sistema de gamma-carboxilación dependiente de vitamina K, la menor expresión tisular de calumenina conlleva una mayor expresión de MGP, tanto en sus formas carboxiladas como no carboxiladas.

*The study of the expression of tissue calumenin content related to CALU SNP rs1043550 (A29809G) indicates that the SNP carriage is associated with lower tissue calumenin content. Since calumenin exerts physiological regulation of the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system, the lower tissue expression*

*of calumenin is associated with MGP expression in both carboxylated and uncarboxylated isoforms.*

- 1.3. El estudio de funcionalidad del polimorfismo *CALU* rs1043550 (A29809G) mediante vectores de expresión de luciferasa sugiere que el SNP *CALU* rs1043550 debe ser funcional y afectar la expresión de calumenina disminuyendo la estabilidad del mRNA de *CALU*

*Studying the functionality of CALU SNP rs1043550 (A29809G) by using luciferase expression vectors suggests that CALU SNP rs1043550 may be functional and thus may impair calumenin expression by decreasing the CALU mRNA stability*

- 1.4. El análisis del patrón temporal de expresión de calumenina en asociación con la calcificación *in vitro* de la CMLVh en condiciones de hiperfosfatemia muestra que calumenina presenta una cinética de expresión asociada al proceso de diferenciación osteoblástica y mineralización de la MEC inducidos por la hiperfosfatemia. Además, calumenina muestra una cinética de expresión y síntesis temporal-dependiente que consta de una etapa inicial de sobreexpresión asociada con el inicio de la mineralización e inicio de la diferenciación osteoblástica, y una etapa tardía en la que la expresión de calumenina se reduce en asociación con la restauración de la gamma-carboxilación y la síntesis de osteocalcina. La menor disponibilidad intracelular de calumenina resulta de una menor expresión génica y de la activación de vías secretoras en respuesta a la hiperfosfatemia mantenida. La secreción de calumenina hacia el espacio extracelular resulta en la acumulación de la misma sobre la MEC mineralizada co-localizándose mayoritariamente con los depósitos de calcio. Todo ello sugiere una contribución directa de la calumenina sobre la mineralización. De acuerdo con esto, calumenina debe ejercer tanto efectos directos como indirectos sobre el proceso de calcificación de la CMLV.

*The assessment of the temporal expression profile for Calumenin in association with the in vitro VSMC calcification under HPM indicates that Calumenin shows a kinetic profile which is associated with the*

*hyperphosphatemia-dependent osteoblast differentiation and ECM mineralization. Expression and synthesis profiles of calumenin are time-dependent showing an early up-regulation associated with the mineralization and VSMC differentiation into osteoblast-like cells; as well as a late calumenin down-regulation associated to a gamma-carboxylation restoration and osteocalcin synthesis. Decreased intracellular storages of calumenin are associated with the activation of calumenin release into the extracellular site and gene down-regulation. Calumenin release into the extracellular site leads to its accumulation on the mineralizing ECM and main co-localization on calcium deposits. Therefore Calumenin could contribute to the mineralization. Accordingly, Calumenin may play a double role in the whole calcification process including direct and indirect effects on the VSMC calcification.*

- 1.5. **La evaluación de la regulación epigenética de la expresión de calumenina sobre las variantes silvestre y polimórfica** sugiere que los miR-132 y miR-218 constituyen potenciales osteomiR en el proceso de mineralización y diferenciación osteoblástica de la CMVL inducida por hiperfosfatemia. Ello se evidencia tanto mediante la predicción *in silico* de potenciales sitios de unión putativa de miR-132 y miR-218 sobre la región 3'-UTR CALU, como mediante la utilización de vectores de expresión de luciferasa. Es por ello que la regulación de calumenina silvestre dependiente de miR-132 y miR-218 debe ser, al menos en parte, resultado de la desestabilización del mRNA.

*Evaluating the epigenetic regulation of wild-type or polymorphic Calumenin suggests that miR-132 and miR-218 are potential osteomiR during the VSMC mineralization and osteoblast differentiation after hyperphosphatemia conditioning. Those findings were evidenced by in silico prediction of potential putative binding sites for miR-132 and miR-218 on 3'-UTR CALU as well as using luciferase vectors. Thereby, miR132 and miR-218 dependant regulation of calumenin may result, at least in part, by the mRNA destabilization.*

- 1.6. **La confirmación del papel de los miRNA regulando la expresión de calumenina en un modelo de calcificación de la CMLVh *in vitro*** se ha

evidenciado mediante la incorporación exógena de miR-132 y miR-218 utilizando ensayos miRNA mimic. Los miR-132 y miR-218 se asocian con una menor mineralización, expresión y síntesis de calumenina y de BMP2 en las etapas tempranas de mineralización y diferenciación osteoblástica de la CMLV inducida por hiperfosfatemia. Por tanto, en el sistema biológico *in vitro* desarrollado en esta Tesis, miR132 y miR218 son capaces de atenuar la calcificación de la CMLV humana.

*The role of miRNAs on calumenin expression in an in vitro VSMC calcification model has been demonstrated by performing miR-132 and miR-218 mimic assays. MiR-132 and miR-218 are associated with a decreased mineralization, expression and synthesis of calumenin and BMP2 during early stages of the VSMC hyperphosphatemia-dependent mineralization and osteoblastic differentiation. Therefore, in our particular in vitro model, miR-132 and miR-218 are able to impair the calcification of human VSMC.*

## **2. Análisis del papel de la MEC en un modelo celular de calcificación vascular en cultivos primarios de célula de músculo liso vascular humana y de ratón.**

*Assesment of ECM role in a vascular calcification model performed in primary vascular smooth muscle cells from human and mice.*

2.1. El estudio de la regulación dependiente de hiperfosfatemia de la síntesis y expresión de colágeno las enzimas hidroxilasas PLOD1 y LOX, en cultivos de CMLVh y CMLV de ratón (CMLVr) indicó que la hiperfosfatemia induce la sobreexpresión temprana y síntesis de colágeno tipo I en asociación con la sobreexpresión de PLOD1 y LOX. La hiperfosfatemia induce la expresión temprana de enzimas relacionadas con la estabilidad y ensamblaje del colágeno. Por tanto, PLOD1 y LOX emergen como nuevos elementos tempranos de regulación de la calcificación vascular. Ello sugiere, además, que es necesaria la disponibilidad de la matriz como sustrato de mineralización.

*Assessing the hyperphosphatemia-dependent regulation of Plod1 and Lox, in VSMC from human or mice suggested that the expression and synthesis of collagen type I is highly associated with PLOD1 and LOX up-regulation as a*

*response to hyperphosphatemia. Hyperphosphatemia conditioning promotes the up-regulation of enzymes involved in collagen cross-linking and maturation. Therefore, PLOD1 and LOX emerge as new early players regulating vascular calcification. The availability of extracellular matrix may be a mineralization surrogate.*

- 2.2. **El estudio del efecto de la sobreexpresión de la lisil oxidasa sobre la calcificación y la activación de la diferenciación osteoblástica** indica una asociación entre la sobreexpresión de *Lox* con una mayor mineralización y expresión de marcadores de la diferenciación osteoblástica de la CMLV de ratón inducida por hiperfosfatemia.

*Assessing the effect of lisil oxidase on hyperphosphatemia-dependent calcification and osteoblast differentiation suggests an association among *Lox* up-regulation and an increase in the mineralization and the expression of osteoblast markers in VSMC from mice.*

- 2.3. **Del estudio del efecto de inhibidores específicos de las actividades enzimáticas PLOD y LOX/LOXL sobre la calcificación y la activación del programa de diferenciación osteoblástica en un modelo celular de calcificación en CMLVr y CMLVh** se desprende que la inhibición de ambas actividades se asocia con una menor mineralización y expresión y síntesis de marcadores de diferenciación. La inhibición de la actividad LOX/LOXL mediante BAPN mejora sustancialmente la conservación del fenotipo de la CMLV humana. **La regulación de PLOD mediante 2,2'-dipiridil constituye una potencial diana en el estudio de las vías moleculares implicadas en la diferenciación osteoblástica de la CMLV. Sin embargo, la utilización de 2,2'-dipiridil durante más de 48h promueve efectos secundarios no deseados.**

*Studying the effect of specific inhibitors on the *Plod* and *Lox/LoxL* activities in a hyperphosphatemia-dependent differentiation of VSMC(from human and mice) into osteoblast-like cells indicates that inhibiting both enzyme activities is associated with lower mineralization and expression and synthesis of osteoblast*

*differentiation markers. Inhibiting LOX/LOXL activities by using BAPN consistently improves the phenotype of human VSMC. PLOD regulation using 2, 2'-dipyridil is a potential target for the assessment of molecular pathways involved in the VSMC differentiation into osteoblast-like cells. However, using 2, 2'-dipyridil for more than 48h promotes non-desired secondary effects.*

**3. Comparación de los efectos de la warfarina y el acenocumarol, sobre la mineralización y activación del programa de diferenciación osteoblástica, en un modelo de calcificación vascular en cultivos primarios de célula de músculo liso vascular humana.**

*Comparison of warfarin and acenocumarol effect on mineralization and osteoblast differentiation in a vascular calcification model using human primary culture vascular smooth muscle cells.*

3.1. **Del estudio de efecto de los principales derivados cumarínicos usados en España sobre los patrones de activación del programa de diferenciación osteoblástica en la CMLV** se comprueba que el acenocumarol, como la warfarina, es un buen agente osteoinductor en combinación con condiciones de hiperfosfatemia. La suplementación de la hiperfosfatemia con dosis ajustadas de acenocumarol se asocia con una mayor mineralización que la warfarina, sugiriendo una mayor potencia en modelos *in vitro*. La incorporación de acenocumarol, como ya se ha demostrado para warfarina, abre nuevas vías de estudio para una mejor comprensión y caracterización de las vías moleculares implicadas en la fisiopatología de la calcificación vascular.

*By studying the effect of main coumadin derivatives used in Spain on the VSMC differentiation into osteoblast-like cells, acenocumarol, as warfarin, has been demonstrated to be a good osteoinductive agent when combined with hyperphosphatemia. Supplementation of hyperphosphatemia with adjusted dose of acenocumarol promotes a higher mineralization in comparison with warfarin, thus suggesting a more potent pro-calcifying effect in in vitro models. Acenocumarol usage, as demonstrated by warfarin, opens new avenues to for the study and molecular pathways involved in the vascular calcification physiopathology*

- 3.2. De la **evaluación del efecto de warfarina y acenocumarol sobre la expresión y síntesis de Calumenina** se desprende que acenocumarol y warfarina muestran diferencias en la activación de vías moleculares relacionadas con calumenina durante el proceso de diferenciación osteoblástica de la CMLV.

*By studying the effect of warfarin and acenocumarol on Calumenin expression and synthesis, both Acenocumarol and warfarin showed different activation profiles of molecular pathways related with calumenin during the VSMC differentiation into osteoblast-like cells.*



---

## **Sección XI. Bibliografía**



- ❖ Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN (2001) Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol* 166 (12): 7556–7562
- ❖ Abedin M, Tintut Y, Demer LL (2004) Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(7):1161-70
- ❖ Adrogué HJ, Frazier MR, Zeluff B, Suki WN (1981) Systemic calciphylaxis revisited. *Am J Nephrol* 1(3-4):177-83
- ❖ Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP (2015) Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife*. 4. doi: 10.7554/eLife.05005
- ❖ Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M Jr, Detrano R (1990) Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol*. 15(4):827-832. doi:10.1016/0735-1097(90)90282-T
- ❖ Ahmed S, O'Neill KD, Hood AF, Evan AP, Moe SM (2001) Calciphylaxis is associated with hyperphosphatemia and increased osteopontin expression by vascular smooth muscle cells. *Am J Kidney Dis* 37: 1267–1276.
- ❖ Aigner T, Neureiter D, Câmpean V, Soderá S, Arnann K (2008) Expression of cartilage-specific markers in calcified and non-calcified atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 196 (1): 37–41
- ❖ Alford AI, Terkhorh SP, Reddy AB, Hankenson KD (2010) Thrombospondin-2 regulates matrix mineralization in MC3T3-E1 pre-osteoblasts. *Bone* 46(2):464-471. doi: 10.1016/j.bone.2009.08.058
- ❖ Allison MA, Criqui MH, Wright CM (2004). Patterns and risk factors for systemic calcified atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(2):331-6
- ❖ Ambros V (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature* 431(7006):350-355
- ❖ Ambrosetti D, Holmes G, Mansukhani A, Basilico C (2008) Fibroblast growth factor signaling uses multiple mechanisms to inhibit Wnt-induced transcription in osteoblasts. *Mol Cell Biol* 28:4759-4771. doi: 10.1128/MCB.01849-07
- ❖ Anand S, Yusuf S, Xie C, Pogue J, Eikelboom J, Budaj A, Sussex B, Liu L, Guzman R, Cina C, Crowell R, Keltai M, Gosselin G (2007) Oral anticoagulant and antiplatelet therapy and peripheral arterial disease. *N Engl J Med* 357(3):217-27
- ❖ Antman E, Braunwald E (2006). Infarto de miocardio con elevación del ST: anatomía patológica, fisiopatología y manifestaciones clínicas. En: Zipes DP, Libby P, Bonow R, Braunwald E, editores. *Braunwald Tratado de Cardiología*. 7ª ed. Madrid: elsevier. P.1141-1163
- ❖ Aoki A, Murata M, Asano T, Ikoma A, Sasaki M, Saito T, Otani T, Jinbo S, Ikeda N, Kawakami M, Ishikawa SE (2013) Association of serum osteoprotegerin with vascular calcification in patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 12:11. doi: 10.1186/1475-2840-12-11
- ❖ Apple FS, Wu AH, Jaffe AS (2002) European Society of Cardiology and American College of Cardiology guidelines for redefinition of myocardial infarction: how to use existing assays clinically and for clinical trials. *Am Heart J* 144(6):981-6

- ❖ Artigas N, Ureña C, Rodríguez-Carballo E, Rosa JL, Ventura F (2014) Mitogen-activated protein kinase (MAPK)-regulated interactions between Osterix and Runx2 are critical for the transcriptional osteogenic program. *J Biol Chem* 26;289(39):27105-17. doi: 10.1074/jbc.M114.576793
- ❖ Badenhorst D, Maseko M, Tsoetsi OJ, Naidoo A, Brooksbank R, Norton GR, Woodiwiss AJ (2003) Cross-linking influences the impact of quantitative changes in myocardial collagen on cardiac stiffness and remodelling in hypertension in rats. *Cardiovasc Res* 57(3):632-41
- ❖ Badimon L, Vilahur G (2008) Coronary atherothrombotic disease: progress in antiplatelet therapy. *Rev. Esp. Cardiol* 6, 501-513
- ❖ Bailey M, Pillarisetti S, Jones P, Xiao H, Simionescu D, Vyavahare N (2004) Involvement of matrix metalloproteinases and tenascin-C in elastin calcification. *Cardiovasc Pathol* 3:146-155
- ❖ Balderman JA, Lee HY, Mahoney CE, Handy DE, White K, Annis S, Lebeche D, Hajjar RJ, Loscalzo J, Leopold JA (2012) Bone morphogenetic protein-2 decreases microRNA-30b and microRNA-30c to promote vascular smooth muscle cell calcification. *J Am Heart Assoc* 1(6):e003905. doi: 10.1161/JAHA.112.003905 Bandyopadhyay PK. *Vitamins & Hormones*. 2008;78:157-184
- ❖ Barsh GS, Byers PH (1981) Reduced secretion of structurally abnormal type I procollagen in a form of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 78(8):5142-6.
- ❖ Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136(2):215-33. Review. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
- ❖ Bastarrika G, Pueyo JC, Cosín O, Bergaz F, Vivas I, Cano D (2004) Detection and quantification of coronary artery calcification: radiological perspective. *Radiología* 46(1):1-8
- ❖ Bätge B, Diebold J, Stein H, Bodo M, Müller PK (1992) Compositional analysis of the collagenous bone matrix. A study on adult normal and osteopenic bone tissue. *Eur J Clin Invest* 22(12):805-12
- ❖ Beazley KE, Deasey S, Lima F, Nurminskaya MV (2012) Transglutaminase 2-mediated activation of  $\beta$ -catenin signaling has a critical role in warfarin-induced vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:123-130 doi: 10.1161/ATVBAHA.111.237834
- ❖ Beazley KE, Eghtesad S, Nurminskaya MV (2013) Quercetin attenuates warfarin-induced vascular calcification in vitro independently from matrix Gla protein. *J Biol Chem* 288:2632-2640 doi: 10.1074/jbc.M112.368639
- ❖ Beck L, Leroy C, Salaun C, Margall-Ducos G, Desdouets C, Friedlander G (2009) Identification of a novel function of PiT1 critical for cell proliferation and independent of its phosphate transport activity. *J Biol Chem* 284:31363–31374

- ❖ Becker CR, Knez A, Jakobs TF, Aydemir S, Becker A, Schoepf UJ, Bruening R, Haberl R, Reiser MF (1999) Detection and quantification of coronary artery calcification with electron-beam and conventional CT. *Eur Radiol* 9(4):620-4
- ❖ Behonick DJ, Werb Z (2003) A bit of give and take: the relationship between the extracellular matrix and the developing chondrocyte. *Mech Dev* 120(11):1327-36. Review.
- ❖ Benditt EP, Benditt JM (1973) Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 70(6):1753-6
- ❖ Benton ME, Price PA, Suttie JW (1995) Multi-site-specificity of the vitamin K-dependent carboxylase: in vitro carboxylation of des-gamma-carboxylated bone Gla protein and Des-gamma-carboxylated pro bone Gla protein. *Biochemistry* 34(29):9541-51
- ❖ Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E, Sharon E, Spector Y, Bentwich Z (2005) Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet* 37(7):766-70
- ❖ Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk RH, Cuppen E (2005) Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell* 120(1):21-4
- ❖ Berkner KL, Pudota BN (1998) Vitamin K-dependent carboxylation of the carboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(2):466-71
- ❖ Berkner KL (2005) The vitamin K-dependent carboxylase. *Annu Rev Nutr* 25:127-49. Review.
- ❖ Berkner KL (2000) The vitamin K-dependent carboxylase. *J Nutr* 130(8):1877-80. Review
- ❖ Bilton RL, Booker GW (2003) The subtle side to hypoxia inducible factor (HIF alpha) regulation. *Eur J Biochem* 270(5):791-798
- ❖ Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK (1998). Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. *Am J Kidney Dis* 31(4):607-17
- ❖ Block GA, Port FK (2000). Re-evaluation of risks associated with hyperphosphatemia and hyperparathyroidism in dialysis patients: recommendations for a change in management. *Am J Kidney Dis* 35(6):1226-37. Review
- ❖ Bochaton-Piallat ML, Gabbiani F, Ropraz P, Gabbiani G (1993) Age influences the replicative activity and the differentiation features of cultured rat aortic smooth muscle cell populations and clones. *Arterioscler Thromb* 13(10):1449-1455
- ❖ Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Gabbiani F, Gabbiani G (1996) Phenotypic heterogeneity of rat arterial smooth muscle cell clones. Implications for the development of experimental intimal thickening. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16(6):815-20
- ❖ Bodin L, Verstuyft C, Tregouet DA, Robert A, Dubert L, Funck-Brentano C, Jaillon P, Beaune P, Laurent-Puig P, Becquemont L, Lorient MA (2005) Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and

- vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity. *Blood* 106(1):135-40
- ❖ Bonewald LF, Johnson ML (2008) Osteocytes, mechanosensing and Wnt signalling. *Bone* 42:606-615. doi: 10.1016/j.bone.2007.12.224
  - ❖ Bonucci E (2007) Biological calcification. Normal and pathological processes in the early stages. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemania. Capitulo 4- The nature and composition of the inorganic phase (p. 85-86); Capitulo 5-the shape of inorganic particles (p. 127-128); Capitulo 6- The size of inorganic particles (p 157-158); Capitulo 14- calcifying matrices: pathological calcifications (p. 394-401). Doi 10.1007/978-3-540-36013-1
  - ❖ Boraldi F, Annovi G, Guerra D, Paolinelli Devincenzi C, Garcia-Fernandez MI, Panico F, De Santis G, Tiozzo R, Ronchetti I, Quaglino D (2009) Fibroblast protein profile analysis highlights the role of oxidative stress and vitamin K recycling in the pathogenesis of pseudoxanthoma elasticum. *Proteomics Clin Appl* 3:1084-1098 doi: 10.1002/prca.200900007
  - ❖ Boraldi F, Annovi G, Guerra D, Paolinelli Devincenzi C, Garcia-Fernandez MI, Panico F, De Santis G, Tiozzo R, Ronchetti I, Quaglino D (2009) Fibroblast protein profile analysis highlights the role of oxidative stress and vitamin K recycling in the pathogenesis of pseudoxanthoma elasticum. *Proteomics Clin Appl* 3:1084-98
  - ❖ Boström K. (2001). Insights into the mechanism of vascular calcification. *Am J Cardiol* 88: 20E-22E (I).
  - ❖ Böstrom K, Tsao D, Shen S, Wang Y, Demer LL (2001). Matrix GLA protein modulates differentiation induced by bone morphogenetic protein-2 in C3H10T1/2 cells. *Journal of Biological Chemistry* 276: 14044-14052 (II).
  - ❖ Boström K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL (1993). Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 91(4):1800-9.
  - ❖ Breving K, Esquela-Kerscher A (2010) The complexities of microRNA regulation:mirandering around the rules. *Int J Biochem Cell Biol* 42(8):1316-29. doi: 10.1016/j.biocel.2009.09.016
  - ❖ Brodersen P, Voinnet O (2009) Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(2):141-8. doi:10.1038/nrm2619
  - ❖ Brown WE, Eidelman N, Tomazic B (1987) Octacalcium phosphate as a precursor in biomineral formation. *Adv Dent Res* 1(2):306-313
  - ❖ Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS (1998) Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Development* 12:1260-1268
  - ❖ Burdan F, Szumiło J, Korobowicz A, Farooquee R, Patel S, Patel A, Dave A, Szumiło M, Solecki M, Klepacz R, Dudka J (2009) Mo. Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate. *Folia Histochem Cytobiol* 47(1):5-16

- ❖ Burmester JK, Berg RL, Yale SH, Rottscheit CM, Glurich IE, Schmelzer JR, Caldwell MD (2011) A randomized controlled trial of genotype-based Coumadin initiation. *Genet Med* 13(6):509-18. doi: 10.1097/GIM.0b013e31820ad77d
- ❖ Burton D.G.A., Matsubara H., Ikeda K. (2010). Pathophysiology of vascular calcification: Pivotal role of cellular senescence in vascular smooth muscle cells. *Experimental Gerontology* 45: 819–824
- ❖ Bushati N, Cohen SM (2007) microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:175-205. Review
- ❖ Byon CH, Javed A, Dai Q, Kappes JC, Clemens TL, Darley-Usmar VM, McDonald JM, Chen Y (2008) Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *J Biol Chem* 283(22): 15319-15327
- ❖ Cadamuro J, Dieplinger B, Felder T, Kedenko I, Mueller T, Haltmayer M, Patsch W, Oberkofler H (2010) Genetic determinants of acenocoumarol and phenprocoumon maintenance dose requirements. *Eur J Clin Pharmacol* 66(3):253-60. doi: 10.1007/s00228-009-0768-7
- ❖ Cai J, Pardali E, Sánchez-Duffhues G, ten Dijke P (2012) BMP signaling in vascular diseases. *FEBS Letters* 14:1993-2002
- ❖ Cain D, Hutson SM, Wallin R (1997) Assembly of the warfarin-sensitive vitamin K 2,3-epoxide reductase enzyme complex in the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 272(46):29068-75
- ❖ Cain D, Hutson SM, Wallin R (1998) Warfarin resistance is associated with a protein component of the vitamin K 2,3-epoxide reductase enzyme complex in rat liver. *Thromb Haemost* 80(1):128-33
- ❖ Cancela ML, Conceição N, Laizé V (2012) Gla-rich protein, a new player in tissue calcification? *Adv Nutr* 3(2):174-81. doi: 10.3945/an.111.001685. Review. Erratum in: *Adv Nutr*. 2012 Nov;3(6):831
- ❖ Cannata-Andía JB, Roman-García P, Hruska K (2011) The connections between vascular calcification and bone health. *Nephrol Dial Transplant* 26(11):3429-36. doi: 10.1093/ndt/gfr591. Review
- ❖ Cannata-Andía JB, Rodríguez-García M, Carrillo-López N, Naves-Díaz M, Díaz-López B (2006) Vascular calcifications: pathogenesis, management, and impact on clinical outcomes. *J Am Soc Nephrol* 17(12 Suppl 3):S267-73. Review
- ❖ Chamley JH, Campbell GR, McConnell JD, Gröschel-Stewart U (1977) Comparison of vascular smooth muscle cells from adult human, monkey and rabbit in primary culture and in subculture. *Cell Tissue Res* 177(4):503-22
- ❖ Chamley-Campbell JH, Campbell GR, Ross R (1979) The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev* 59(1):1-61
- ❖ Chang K, Uitto J, Rowold EA, Grant GA, Kilo C, Williamson JR (1980) Increased collagen cross-linkages in experimental diabetes: reversal by beta-aminopropionitrile and D-penicillamine. *Diabetes* 29(10):778-81

- ❖ Chen AL, Fang C, Liu C, Leslie MP, Chang E, Di Cesare PE (2004). Expression of bone morphogenetic proteins, receptors, and tissue inhibitors in human fetal, adult, and osteoarthritic articular cartilage. *J Orthop Res* 22(6):1188-92
- ❖ Chen D, Zhao M, Mundy GR (2004). Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 22(4):233-241. Review
- ❖ Chen G, Deng C, Li YP (2012) TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci* 8(2):272-88. doi: 10.7150/ijbs.2929. Epub 2012 Jan 21. Review
- ❖ Chen NX, Duan D, O'Neill KD, Wolisi GO, Koczman JJ, Laclair R, Moe SM (2006) The mechanisms of uremic serum-induced expression of bone matrix proteins in bovine vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* 70(6):1046-53
- ❖ Chen NX, Kiattisunthorn K, O'Neill KD, Chen X, Moorthi RN, Gattone VH 2nd, Allen MR, Moe SM (2013) Decreased microRNA is involved in the vascular remodeling abnormalities in chronic kidney disease. *PLoS ONE* 8(5):e64558
- ❖ Chen NX, O'Neill KD, Chen X, Moe SM (2008) Annexin-mediated matrix vesicle calcification in vascular smooth muscle cells. *J Bone Miner Res* 23:1798–1805.
- ❖ Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY (2008). Characterization of miRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 18(10); 997-1006. doi: 10.1038/cr.2008.282.
- ❖ Chiu YW, Adler SG, Budoff MJ, Takasu J, Ashai J, Mehrotra R (2010) Coronary artery calcification and mortality in diabetic patients with proteinuria. *Kidney Int* 77:1107-14
- ❖ Cho S, Jang I, Jun Y, Yoon S, Ko M, Kwon Y, Choi I, Chang H, Ryu D, Lee B, Kim VN, Kim W, Lee S (2013) MiRGator v3.0: a microRNA portal for deep sequencing, expression profiling and mRNA targeting. *Nucleic Acids Res* 41(Database issue):D252-7. doi: 10.1093/nar/gks1168
- ❖ Choe N, Kwon JS, Kim JR, Eom GH, Kim Y, Nam KI, Ahn Y, Kee HJ, Kook H(2013) The microRNA miR-132 targets Lrrfip1 to block vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *Atherosclerosis* 229(2):348-55. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.05.009
- ❖ Christian RC, Fitzpatrick LA (1999) Vascular calcification. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 8(4):443-8. Review
- ❖ Churchman AT, Siow RC (2009) Isolation, culture and characterisation of vascular smooth muscle cells. *Methods Mol Biol* 467:127-138 doi: 10.1007/978-1-59745-241-0\_7
- ❖ Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM (1983) Kinetics of cellular proliferation after arterial injury, I: smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest* 49:327–333
- ❖ Coates T, Kirkland GS, Dymock RB, Murphy BF, Brealey JK, Mathew TH, Disney AP (1998) Cutaneous necrosis from calcific uremic arteriolopathy. *Am J Kidney Dis* 32(3):384-91. Review

- ❖ Coecke S, Balls M, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, Hatung T, Hay R, Merte OW, Price A, Schechtman L, Stacey G, Stokes W (2005) Guidance on good culture practice. A report of the second ECVAM Task Force on good cell cultura practice. *ATLA* 33:261-287
- ❖ Coll B, Betriu A, Martínez-Alonso M, Amoedo ML, Arcidiacono MV, Borrás M, Valdivielso JM, Fernández E (2011) Large artery calcification on dialysis patients is located in the intima and related to atherosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol* 6(2):303-10
- ❖ Collin-Osdoby P, Rothe L, Anderson F, Nelson M, Maloney W, Osdoby P (2001) Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 276(23):20659-72
- ❖ Collins JF, Bai L, Ghishan FK (2004) The SLC20 family of proteins: dual functions as sodium-phosphate cotransporters and viral receptors. *Pflugers Arch* 447(5):647-52
- ❖ Cook CL, Weiser MC, Schwartz PE, Jones CL, Majack RA (1994) Developmentally timed expression of an embryonic growth phenotype in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74(2):189-96
- ❖ Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, Kislinger T, Belton O, McRedmond JP, Cahill DJ, Emili A, Fitzgerald DJ, Maguire PB (2004) Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood* 103:2096-2104 doi.org/10.1182/blood-2003-08-2804
- ❖ Coutu DL, Wu JH, Monette A, Rivard GE, Blostein MD, Galipeau J (2008) Periostin, a member of a novel family of vitamin K.-dependent proteins, is expressed by mesenchymal stromal cells. *J Biol Chem* 283: 17991–18001.
- ❖ Cranenburg EC, Brandenburg VM, Vermeer C, Stenger M, Muhlenbruch G, Mahnken AH, Gladziwa U, Ketteler M, Schurgers LJ (2009) Uncarboxylated matrix Gla protein (ucMGP) is associated with coronary artery calcification in haemodialysis patients. *Thromb Haemost* 101:359–366. [PubMed: 19190822]
- ❖ Csiszar A, Smith KE, Koller A, Kaley G, Edwards JG, Ungvari Z (2005). Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression in endothelial cells: role of nuclear factor-kappaB activation by tumor necrosis factor-alpha, H2O2, and high intravascular pressure. *Circulation* 10;111(18):2364-72
- ❖ Cui RR, Li SJ, Liu LJ, Yi L, Liang QH, Zhu X, Liu GY, Liu Y, Wu SS, Liao XB, Yuan LQ, Mao DA, Liao EY (2012) MicroRNA-204 regulates vascular smooth muscle cell calcification in vitro and in vivo. *Cardiovasc Res* 96(2):320-9. doi: 10.1093/cvr/cvs258
- ❖ Cupples LA, D'Agostino RB, Anderson K, Kannel WB (1988) Comparison of baseline and repeated measure covariate techniques in the Framingham Heart Study. *Stat Med* 7(1-2):205-22
- ❖ Cushman M, Lemaitre RN, Kuller LH, Psaty BM, Macy EM, Sharrett AR, Tracy RP (1999) Fibrinolytic activation markers predict myocardial infarction in the elderly. The Cardiovascular Health Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(3):493-8
- ❖ Czermack J (1852) Beschreibung und mikroskopische Untersuchung zweier ägyptischer Mumien. *Sonder-Berichte Akad Wiss Wien* 9:427-469

- ❖ Dall'Acqua W, Carter P (2000) Substrate-assisted catalysis: molecular basis and biological significance. *Protein Sci* 9(1):1-9. Review
- ❖ Dao HH, Essalihi R, Bouvet C, Moreau P (2005) Evolution and modulation of age-related medial elastocalcinosis: impact on large artery stiffness and isolated systolic hypertension. *Cardiovasc Res* 66(2):307-17. Review
- ❖ Davies JD, Carpenter KL, Challis IR, Figg NL, McNair R, Proudfoot D (2005). Adipocytic differentiation and liver x receptor pathways regulate the accumulation of triacylglycerols in human vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 280: 3911–9.
- ❖ Danziger J (2008) Vitamin K-dependent proteins, warfarin, and vascular calcification. *Clin J Am Soc Nephrol* 3(5):1504-10. doi: 10.2215/CJN.00770208.
- ❖ De la Fuente A, Mateos J, Lesende-Rodríguez I, Calamia V, Fuentes-Boquete I, de Toro FJ, Arufe MC, Blanco FJ (2012) Proteome analysis during chondrocyte differentiation in a new chondrogenesis model using human umbilical cord stroma mesenchymal stem cells. *Mol Cell Proteomics* 11(2):M111.010496. doi: 10.1074/mcp.M111.010496.
- ❖ De Paepe A (1998) Heritable collagen disorders: from phenotype to genotype. *Verh K Acad Geneesk Belg*; 65:463-482
- ❖ Dembure PP, Janko AR, Priest JH, Elsas LJ (1987) Ascorbate regulation of collagen biosynthesis in Ehlers-Danlos syndrome, type VI. *Metabolism* 36(7):687-91.
- ❖ Demer LL, Tintut Y (2008) Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation* 117:2938-2948
- ❖ Demer LL (2002) Vascular calcification and osteoporosis: inflammatory responses to oxidized lipids. *Int J Epidemiol* 31(4):737-41. Review
- ❖ Dhingra R, Sullivan L, Fox C, Wang T, D'Agostino RS, Gaziano J, Vasan R (2007) Relations of serum phosphorus and calcium levels to the incidence of cardiovascular disease in the community. *Arch Intern Med* 167:879–885
- ❖ Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, Cleutjens KB, Geusens PP, Kitslaar PJ, Tordoir JH, Spronk HM, Vermeer C, Daemen MJ (2001). Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(12):1998-2003.
- ❖ Di Cesare PE, Nimni ME, Yazdi M, Cheung DT (1994) Effects of lathyritic drugs and lathyritic demineralized bone matrix on induced and sustained osteogenesis. *J Orthop Res* 12(3):395-402
- ❖ Ding W, Li J, Singh J, Alif R, Vazquez-Padron RI, Gomes SA, Hare JM, Shehadeh LA (2015) miR-30e targets IGF2-regulated osteogenesis in bone marrow-derived mesenchymal stem cells, aortic smooth muscle cells, and ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Cardiovasc Res* 106(1):131-42. doi: 10.1093/cvr/cvv030
- ❖ Ding XC, Weiler J, Grosshans H (2009) Regulating the regulators: mechanisms controlling the maturation of microRNAs. *Trends Biotechnol* 27(1):27-36. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.09.006

- ❖ Doherty TM, Asotra K, Fitzpatrick LA, Qiao JH, Wilkin DJ, Detrano RC, Dunstan CR, Shah PK, Rajavashisth TB (2003) Calcification in atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proc Natl Acad Sci*.100: 11201-11206
- ❖ Dong S, Xiong W, Yuan J, Li J, Liu J, Xu X (2013) MiRNA-146a regulates the maturation and differentiation of vascular smooth muscle cells by targeting NF- $\kappa$ B expression. *Mol Med Rep* 8(2):407-12. doi: 10.3892/mmr.2013.1538
- ❖ Du Y, Gao C, Liu Z, Wang L, Liu B, He F, Zhang T, Wang Y, Wang X, Xu M, Luo GZ, Zhu Y, Xu Q, Wang X, Kong W (2012) Upregulation of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-7 by miR-29 repression mediates vascular smooth muscle calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32(11):2580-8. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300206
- ❖ Duan X, Zhou Y, Teng X, Tang C, Qi Y (2009) Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis is activated in vascular calcification. *Biochem Biophys Res Commun* 387:694–699
- ❖ Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G (1996) Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382(6590):448-52
- ❖ Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997) Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89(5):747-54
- ❖ Dweep H, Gretz N, Sticht C (2014) miRWalk database for miRNA-target interactions. *Methods Mol Biol* 1182:289-305. doi: 10.1007/978-1-4939-1062-5\_25
- ❖ Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N (2011) miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *J Biomed Inform* 44(5):839-47. doi: 10.1016/j.jbi.2011.05.002
- ❖ Dweep H, Sticht C, Gretz N (2013) In-Silico Algorithms for the Screening of Possible microRNA Binding Sites and Their Interactions. *Curr Genomics* 14(2):127-36. doi: 10.2174/1389202911314020005
- ❖ Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG (2002) Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med* 8(11):1249-56. Review
- ❖ Eberhard Passarge (2009) Genética texto y atlas. Ed. Médica Panamericana.
- ❖ Eisenstein R., Zeruolis L. (1964). Vitamin-D induced aortic calcification. *Arch Path.* 77: 2735.
- ❖ Eitzinger N, Surmann-Schmitt C, Bösl M, Schett G, Engelke K, Hess A, von der Mark K, Stock M (2012) Ucp1 is not necessary for normal development of the mouse skeleton. *Bone* 50(3):670-80. doi: 10.1016/j.bone.2011.11.017.
- ❖ El-Maadawy S, Kaartinen MT, Schinke T, Murshed M, Karsenty G, McKee MD (2003) Cartilage formation and calcification in arteries of mice lacking matrix Gla protein. *Connect Tissue Res* 44 Suppl 1 : 272-278 doi.org/10.1080/03008200390181762
- ❖ Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks DS (2003) MicroRNA targets in Drosophila. *Genome Biol* 5(1):R1

- ❖ Epple M, Bäuerlein E (2007) Handbook of Biomineralization. Aspects of pathological calcifications. WILEY-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, Weinheim (p. 4, 285-299)
- ❖ Eskildsen TV, Schneider M, Sandberg MB, Skov V, Brønnum H, Thomassen M, Kruse TA, Andersen DC, Sheikh SP (2015) The microRNA-132/212 family fine-tunes multiple targets in Angiotensin II signalling in cardiac fibroblasts. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 16(4):1288-97. doi: 10.1177/1470320314539367
- ❖ Essalihi R, Dao HH, Yamaguchi N, Moreau P (2003) A new model of isolated systolic hypertension induced by chronic warfarin and vitamin K1 treatment. *Am J Hypertens* 16(2):103-10
- ❖ Essalihi, R.; Ouellette, V.; Dao, HH.; McKee, MD.; Moreau, P. (2004) Phenotypic Modulation of Vascular Smooth Muscle Cells During Medial Arterial Calcification: a Role for Endothelin? *J Cardiovasc Pharmacol.* 44(Supl 1): S147-50.
- ❖ Esteller M (2011) Cancer epigenetics for the 21st Century: what's next? *Genes and Cancer* 6(2):604-606]
- ❖ Esteller M (2008) Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 358(11):1148-59. doi: 10.1056/NEJMra072067. Review
- ❖ European Society of Cardiology & American College of Cardiology Committee (2000) Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 21(18):1502-13
- ❖ Evrard S, Delanaye P, Kamel S, Cristol JP, Cavalier E; SFBC/SN joined working group on vascular calcifications (2015) Vascular calcification: from pathophysiology to biomarkers. *Clin Chim Acta* 438:401-14. doi: 10.1016/j.cca.2014.08.034
- ❖ Ewence AE, Bootman M, Roderick HL, Skepper JN, McCarthy G, Epple M (2008). Calcium phosphate crystals induce cell death in human vascular smooth muscle cells: A potential mechanism in atherosclerotic plaque destabilization. *Circ Res* 103: e28 – e34.
- ❖ Fabbri M (2014) Non-coding RNAs and Cancer. Chapter 2 Biogenesis and physiology of microRNAs. Springer Science+Busines Media, LLC2014. Doi: 10.1007/978-1-4614-8444-8\_2
- ❖ Faller M, Guo F (2008) MicroRNA biogenesis: there is more than one way to skin a cat. *Biochimica et Biophysica Acta* 1779(11):663-667]
- ❖ Fang Z, Rajewsky N (2011) The impact of miRNA target sites in coding sequences and in 3'UTRs. *PLoS One* 6(3):e18067. doi: 10.1371/journal.pone.0018067
- ❖ Farzaneh-Far A, Davies JD, Braam LA, Spronk HM, Proudfoot D, Chan SW, O'Shaughnessy KM, Weissberg PL, Vermeer C, Shanahan CM (2001) A polymorphism of the human matrix gammacarboxyglutamic acid protein promoter alters binding of an activating protein-1 complex and is associated with altered transcription and serum levels. *J Biol Chem* 276:32466–32473 (I)

- ❖ Farzaneh-Far A, Proudfoot D, Weissberg PL, Shanahan CM (2000) Matrix gla protein is regulated by a mechanism functionally related to the calcium-sensing receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 277:736–740.
- ❖ Farzaneh-Far A, Shanahan CM (2005) Biology of vascular calcification in renal disease. *Nephron Exp Nephrol* 101(4):e134-8
- ❖ Farzaneh-Far A, Weissberg PL, Proudfoot D, Shanahan CM (2001) Transcriptional regulation of matrix gla protein. *Z Kardiol* 90 (Suppl 3):38–42 (II)
- ❖ Faxon DP, Fuster V, Libby P, Beckman JA, Hiatt WR, Thompson RW, Topper JN, Annex BH, Rundback JH, Fabunmi RP, Robertson RM, Loscalzo J (2004) American Heart Association. Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: pathophysiology. *Circulation* 109(21):2617-25. Review
- ❖ Ferguson JE 3rd, Patterson C (2007) ASB4 is a hydroxylation substrate of FIH and promotes vascular differentiation via an oxygen-dependent mechanism. *Mol Cell Biol* 27(8):6407-6419
- ❖ Ferns GA, Raines EW, Sprugel KH, Motani AS, Reidy MA, Ross R (1991) Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science* 253(5024):1129-32
- ❖ Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, DePinho RA, Teti A, Ducy P, Karsenty G (2010) Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell* 142(2):296-308. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.003
- ❖ Fitzpatrick LA, Severson A, Edwards WD, Ingram RT (1994) Diffuse calcification in human coronary arteries. Association of osteopontin with atherosclerosis. *J Clin Invest* 94(4):1597-604
- ❖ Fleisch H, Bisaz S (1962). Mechanism of calcification: Inhibitory role of pyrophosphate. *Nature* 195: 911
- ❖ Franceschi RT, Xiao G, Jiang D, Gopalakrishnan R, Yang S, Reith E (2003) Multiple signaling pathways converge on the Cbfa1/Runx2 transcription factor to regulate osteoblast differentiation. *Connect Tissue Res* 44 Suppl 1:109-16. Review
- ❖ Franceschi RT (1999) The developmental control of osteoblast-specific gene expression: role of specific transcription factors and the extracellular matrix environment. *Crit Rev Oral Bio Med* 10(1):40-57
- ❖ Freshney RI (2010) Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications, 6th ed. Ed. John Wiley & Sons, Inc
- ❖ Furie B, Furie BC (1990) Molecular basis of vitamin K-dependent gamma-carboxylation. *Blood* 75(9):1753-62. Review
- ❖ Furie B, Bouchard BA, Furie BC (1999) Vitamin K-dependent biosynthesis of gamma-carboxyglutamic acid. *Blood* 93(6):1798-808. Review

- ❖ Fuster JJ, Fernández P, González-Navarro H, Silvestre C, Nabah YN, Andrés V (2010) Control of cell proliferation in atherosclerosis: insights from animal models and human studies. *Cardiovasc Res* 86(2):254-64. doi: 10.1093/cvr/cvp363
- ❖ Fuster V, Ross R, Topol EJ (1997) Atherosclerosis y enfermedad arterial coronaria. Springer-VerlagIbérica. Barcelona, España:17
- ❖ Gacheru SN, Thomas KM, Murray SA, Csiszar K, Smith-Mungo LI, Kagan HM (1997) Transcriptional and post-transcriptional control of lysyl oxidase expression in vascular smooth muscle cells: effects of TGF-beta 1 and serum deprivation. *J Cell Biochem* 65(3):395-407
- ❖ Galvin KM, Donovan MJ, Lynch CA, Meyer RI, Paul RJ, Lorenz JN, Fairchild-Huntress V, Dixon KL, Dunmore JH, Gimbrone MA Jr, Falb D, Huszar D. (2000). A role for smad6 in development and homeostasis of the cardiovascular system. *Nat Genet* 24: 171–174.
- ❖ García del Moral R (1993) Laboratorio de anatomía patológica. 1st ed., Ed., Interamericana-Mc Grawhill
- ❖ Gelse K, Pfander D, Obier S, Knaup KX, Wiesener M, Hennig FF, Swoboda B (2008) Role of hypoxia-inducible factor 1 alpha in the integrity of articular cartilage in murine knee joints. *Arthritis Res Ther* 10(5):R111. doi: 10.1186/ar2508
- ❖ Gelse K, Pöschl E, Aigner T (2003) Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 55(12):1531-46. Review
- ❖ Gerstenfeld L, Beldekas JC, Sonenshein GE, Franzblau C (1984) Processing of procollagen types III and I in cultured bovine smooth muscle cells. *J Biol Chem* 259(14):9158-62
- ❖ Gerstenfeld LC (1999) Osteopontin in skeletal tissue homeostasis: An emerging picture of the autocrine/paracrine functions of the extracellular matrix. *J Bone Miner Res* 14(6):850-5. Review
- ❖ Gheduzzi D, Boraldi F, Annovi G, DeVincenzi CP, Schurgers LJ, Vermeer C, Quaglini D, Ronchetti IP (2007) Matrix Gla protein is involved in elastic fiber calcification in the dermis of pseudoxanthoma elasticum patients. *Lab Invest* 87:998-1008 doi.org/10.1038/labinvest.3700667
- ❖ Giachelli CM, Bae N, Almeida M, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz SM (1993) Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 92(4):1686-96
- ❖ Giachelli CM, Steitz S (2000) Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol* 19(7):615-22. Review
- ❖ Giachelli CM (2004) Vascular calcification mechanisms. *J Am Soc Nephrol* 15(12):2959-64. Review
- ❖ Goetsch C, Rauner M, Pacyna N, Hempel U, Bornstein SR, Hofbauer LC (2011) miR-125b regulates calcification of vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol* Oct;179(4):1594-600. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.06.016
- ❖ González-Conejero R, Corral J, Roldán V, Ferrer F, Sánchez-Serrano I, Sánchez-Blanco JJ, Marín F, Vicente V (2007) The genetic interaction between VKORC1 c1173t and calumenin

- a29809g modulates the anticoagulant response of acenocoumarol. *J Thromb Haemost* 5(8):1701-6
- ❖ Goodwin AM, D'Amore PA (2002). Wnt signaling in the vasculature. *Angiogenesis* 5: 1–9
  - ❖ Grainger DJ (2007) TFG-b and atherosclerosis in man. *Cardiovasc Res* 74:213-222
  - ❖ Grainger DJ (2004) Transforming growth factor beta and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:399-404
  - ❖ Green RS, Lieb ME, Weintraub AS, Gacheru SN, Rosenfield CL, Shah S, Kagan HM, Taubman MB (1995) Identification of lysyl oxidase and other platelet-derived growth factor-inducible genes in vascular smooth muscle cells by differential screening. *Lab Invest* 73(4):476-82
  - ❖ Greenland P, Alpert JS, Beller GA, Benjamin EJ, Budoff MJ, Fayad ZA, Foster E, Hlatky MA, Hodgson JM, Kushner FG, Lauer MS, Shaw LJ, Smith SC Jr, Taylor AJ, Weintraub WS, Wenger NK, Jacobs AK, Smith SC Jr, Anderson JL, Albert N, Buller CE, Creager MA, Ettinger SM, Guyton RA, Halperin JL, Hochman JS, Kushner FG, Nishimura R, Ohman EM, Page RL, Stevenson WG, Tarkington LG, Yancy CW (2010); American College of Cardiology Foundation; American Heart Association. 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 56(25):e50-103. doi:10.1016/j.jacc.2010.09.001.
  - ❖ Gschwind L, Rollason V, Daali Y, Bonnabry P, Dayer P, Desmeules JA (2013) Role of P-glycoprotein in the uptake/efflux transport of oral vitamin K antagonists and rivaroxaban through the Caco-2 cell model. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 113(4):259-65. doi: 10.1111/bcpt
  - ❖ Guadall A, Orriols M, Rodríguez-Calvo R, Calvayrac O, Crespo J, Aledo R, Martínez-González J, Rodríguez C (2011) Fibulin-5 is up-regulated by hypoxia in endothelial cells through a hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1 $\alpha$ )-dependent mechanism. *J Biol Chem* 286:7093-7103
  - ❖ Guang S, Bochner AF, Pavelec DM, Burkhart KB, Harding S, Lachowiec J, Kennedy S (2008) An Argonaute transports siRNAs from the cytoplasm to the nucleus. *Science* 321(5888):537-41. doi: 10.1126/science.1157647. Erratum in: *Science*. 2009 Dec 4;326(5958):1346
  - ❖ Guérin AP, London GM, Marchais SJ, Metivier F (2000) Arterial stiffening and vascular calcifications in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 15(7):1014-21
  - ❖ Gui T, Zhou G, Sun Y, Shimokado A, Itoh S, Oikawa K, Muragaki Y (2012) MicroRNAs that target Ca(2+) transporters are involved in vascular smooth muscle cell calcification. *Lab Invest* 92(9):1250-1259
  - ❖ Gunja-Smith Z, Morales AR, Romanelli R, Woessner JF Jr (1996) Remodeling of human myocardial collagen in idiopathic dilated cardiomyopathy. Role of metalloproteinases and pyridinoline cross-links. *Am J Pathol* 48 (5):1639-1648
  - ❖ Ha-Vinh R, Alanay Y, Bank RA, Campos-Xavier AB, Zankl A, Superti-Furga A, Bonafé L (2004) Phenotypic and molecular characterization of Bruck syndrome (osteogenesis imperfecta

- with contractures of the large joints) caused by a recessive mutation in PLOD2. *Am J Med Genet A* 131(2):115-20
- ❖ Haddad RM, Kennedy CC, Caples SM, Tracz MJ, Boloña ER, Sideras K, Uruga MV, Erwin PJ, Montori VM (2007) Testosterone and cardiovascular risk in men: a systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Mayo Clin Proc* 82(1):29-39. Review
  - ❖ Hansson GK (2005) Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* 352: 1685-95
  - ❖ Hao H, Hirota S, Tsukamoto Y, Imakita M, Ishibashi-Ueda H, Yutani C (1995) Alterations of bone matrix protein mRNA expression in rat aorta in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 1474-1480.
  - ❖ Hara K, Kobayashi M, Akiyama Y (2005) Comparison of inhibitory effects of warfarin on gamma-carboxylation between bone and liver in rats. *J Bone Miner Metab* 23(5):366-72
  - ❖ Hassan MQ, Gordon JA, Beloti MM, Croce CM, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB (2010). A network connecting Runx2, SATB2, and the miR-23a~27a~24-2 cluster regulates the osteoblast differentiation program. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(46):19879-84. doi: 10.1073/pnas.1007698107
  - ❖ Hassan MQ, Maeda Y, Taipaleenmaki H, Zhang W, Jafferji M, Gordon JA, Li Z, Croce CM, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB (2012). miR-218 directs a Wnt signaling circuit to promote differentiation of osteoblasts and osteomimicry of metastatic cancer cells. *J Biol Chem* 287(50):42084-92. doi: 10.1074/jbc.M112.377515.
  - ❖ Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM (1989) Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev* 69:990-1047
  - ❖ Hausser J, Syed AP, Bilen B, Zavolan M (2013) Analysis of CDS-located miRNA target sites suggests that they can effectively inhibit translation. *Genome Res* 23(4):604-15. doi: 10.1101/gr.139758.112
  - ❖ Hautala T, Byers MG, Eddy RL, Shows TB, Kivirikko KI, Myllylä R (1992) Cloning of human lysyl hydroxylase: complete cDNA-derived amino acid sequence and assignment of the gene (PLOD) to chromosome 1p36.3---p36.2. *Genomics* 13(1):62-9
  - ❖ Hayashi M, Maeda S, Aburatani H, Kitamura K, Miyoshi H, Miyazono K, Imamura T (2008) Pitx2 prevents osteoblastic transdifferentiation of myoblasts by bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem* 283(1):565-71
  - ❖ He L, Hannon GJ (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5(7):522-31. Review. Erratum in: *Nat Rev Genet*. 2004 Aug;5(8):631
  - ❖ Heiss A, DuChesne A, Denecke B, Grötzinger J, Yamamoto K, Renné T, Jahnen-Dechent W (2003) Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles. *J Biol Chem* 278(15):13333-41

- ❖ Hernández-Romero D, Ruiz-Nodar JM, Marín F, Tello-Montoliu A, Roldán V, Mainar L, Pérez-Andreu V, Antón AI, Bonaque JC, Valdés M, Vicente V, González-Conejero R (2010) CALU A29809G polymorphism in coronary atherothrombosis: Implications for coronary calcification and prognosis. *Ann Med* 42:439-446. doi: 10.3109/07853890.2010.499131
- ❖ Hill TP, Später D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C (2005) Canonical Wnt/beta-catenin signalling prevents osteoblast differentiating into chondrocytes. *Dev Cell* 8:727-738
- ❖ Hjalt TA, Amendt BA, Murray JC (2001) PITX2 regulates procollagen lysyl hydroxylase (PLOD) gene expression: implications for the pathology of Rieger syndrome. *J Cell Biol* 152(3):545-52
- ❖ Hoffmann U, Brady TJ, Muller J (2003) Use of New Imaging Techniques to Screen for Coronary Artery Disease. *Circulation* 108: e50-e53
- ❖ Hong HH, Pischon N, Santana RB, Palamakumbura AH, Chase HB, Gantz D, Guo Y, Uzel MI, Ma D, Trackman PC (2004) A role for lysyl oxidase regulation in the control of normal collagen deposition in differentiating osteoblast cultures. *Journal of cellular physiology* 200(1):53-62
- ❖ Honoré B (2009) The rapidly expanding CREC protein family: members, localization, function, and role in disease. *Bioessays* 31:262-277 doi: 10.1002/bies.200800186
- ❖ Honoré B, Vorum H (2000) The CREC family, a novel family of multiple EF-hand, low-affinity Ca (2+)-binding proteins localised to the secretory pathway of mammalian cells. *FEBS Lett* 466:11-18 doi.org/10.1016/s0014-5793(99)01780-9.
- ❖ Houben RJ, Jin D, Stafford DW, Proost P, Ebberink RH, Vermeer C, Soute BA (1999) Osteocalcin binds tightly to the gamma-glutamylcarboxylase at a site distinct from that of the other known vitamin K-dependent proteins. *Biochem J* 341 ( Pt 2):265-9
- ❖ House SJ, Potier M, Bisailon J, Singer HA, Trebak M (2008) The non-excitabile smooth muscle: calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease. *Pflugers Arch* 456:769-785
- ❖ Howe AM, Webster WS (2000) Warfarin exposure and calcification of the arterial system in the rat. *Int J Exp Pathol* 81(1):51-6
- ❖ Hruska K, Mathew S, Lund R, Qiu P, Pratt R (2008) Hyperphosphatemia of chronic kidney disease. *Kidney Int* 74:148-157
- ❖ Hruska KA, Mathew S, Saab G (2005) Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circ Res* 97(2):105-14. Review
- ❖ Hsu SD, Tseng YT, Shrestha S, Lin YL, Khaleel A, Chou CH, Chu CF, Huang HY, Lin CM, Ho SY, Jian TY, Lin FM, Chang TH, Weng SL, Liao KW, Liao IE, Liu CC, Huang HD (2014) miRTarBase update 2014: an information resource for experimentally validated miRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res* 42(Database issue):D78-85. doi: 10.1093/nar/gkt1266
- ❖ Hsu SD, Lin FM, Wu WY, Liang C, Huang WC, Chan WL, Tsai WT, Chen GZ, Lee CJ, Chiu CM, Chien CH, Wu MC, Huang CY, Tsou AP, Huang HD (2011) miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res* 39(Database issue):D163-9. doi: 10.1093/nar/gkq1107

- ❖ Hu H, Hilton MJ, Tu X, Yu K, Ornitz DM, Long F (2005) Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development* 132:49-60 doi.org/10.1242/dev.01564
- ❖ Hu HY, Yan Z, Xu Y, Hu H, Menzel C, Zhou YH, Chen W, Khaitovich P (2009) Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. *BMC Genomics* 10:413. doi: 10.1186/1471-2164-10-413
- ❖ Hu Z, Wang Y, Sun Z, Wang H, Zhou H, Zhang L, Zhang S, Cao X (2015) miRNA-132-3p inhibits osteoblast differentiation by targeting Ep300 in simulated microgravity. *Sci Rep* 5:18655. doi: 10.1038/srep18655
- ❖ Hubbard BR, Ulrich MMW, Jacobs M, Vermeer C, Walsh C, Furie B, Furie BC (1989) Vitamin K-dependent carboxylase: Affinity purification from bovine liver using a synthetic propeptide containing the g-carboxylation recognition site. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 86:6893
- ❖ Hung HF, Wang BW, Chang H, Shyu KG (2008) The molecular regulation of resistin expression in cultures vascular smooth muscle cells under hypoxia. *J Hypertens* 26(12):2349-2360
- ❖ Hunt JL, Fairman R, Mitchell ME, Carpenter JP, Golden M, Khalapyan T, Wolfe M, Neschis D, Milner R, Scoll B, Cusack A, Mohler ER 3<sup>rd</sup> (2002) Bone formation in carotid plaques: a clinicopathological study. *Stroke* 33(5):1214-9
- ❖ Hurtado PA, Vora S, Sume SS, Yang D, St Hilaire C, Guo Y, Palamakumbura AH, Schreiber BM, Ravid K, Trackman PC (2008) Lysyl oxidase propeptide inhibits smooth muscle cell signaling and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 366(1):156-61
- ❖ Hwang HW, Wentzel EA, Mendell JT (2007) A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science* 315(5808):97-100
- ❖ Idelevich A, Rais Y, Monsonego-Ornan E (2011) Bone Gla protein increases HIF-1alpha-dependent glucose metabolism and induces cartilage and vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* Sep;31(9):e55-71. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.230904
- ❖ Iribarren C, Sidney S, Sternfeld B, Browner WS (2000) Calcification of the aortic arch: risk factors and association with coronary heart disease, stroke, and peripheral vascular disease. *JAMA* 283(21):2810-5
- ❖ Israel DI, Nove J, Kerns KM, Moutsatsos IK, Kaufman RJ (1992). Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells. *Growth Factors*. 7(2):139-50.
- ❖ Iyemere VP, Proudfoot D, Weissberg PL, Shanahan CM (2006) Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification. *J Intern Med* 260(3):192-210. Review
- ❖ Jahnen-Dechent W, Schinke T, Trindl A, Müller-Esterl W, Sablitzky F, Kaiser S, Blessing M (1997) Cloning and targeted deletion of the mouse fetuin gene. *J Biol Chem* 272(50):31496-503
- ❖ Jamaluddin MS, Weakley SM, Zhang L, Kougiyas P, Lin PH, Yao Q, Chen C (2011) miRNAs: roles and clinical applications in vascular disease. *Expert Rev Mol Diagn* 11(1):79-89. doi: 10.1586/erm.10.103. Review

- ❖ Jiang Q, Wang Y, Hao Y, Juan L, Teng M, Zhang X, Li M, Wang G, Liu Y (2009) miR2Disease: a manually curated database for microRNA deregulation in human disease. *Nucleic Acids Res* 37:D98-104
- ❖ Johnson K, Polewski M, van Etten D, Terkeltaub R. (2005). Chondrogenesis mediated by PPI depletion promotes spontaneous aortic calcification in NPP1<sup>-/-</sup> mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 686–691.
- ❖ Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J (2006) Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res* 99(10):1044-1059.Review. Erratum in: *Circ Res*. 2009;105(6):e8
- ❖ Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, Giachelli CM (2000) Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 87: E10-E17(I)
- ❖ Jono S, Peinado C, Giachelli CM (2000). Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Biol Chem* 275: 20197–20203 (II)
- ❖ Jover E, Marín F, Roldán V, Montoro-García S, Valdés M, Lip GY (2013) Atherosclerosis and thromboembolic risk in atrial fibrillation: focus on peripheral vascular disease. *Ann Med* 45(3):274-90
- ❖ Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP (2007) Collagens at a glance. *J Cell Sci* 120(Pt 12):1955-8. Review
- ❖ Kagan HM, Li W (2003) Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem* 88(4):660-72. Review
- ❖ Kalajzic I, Staal A, Yang WP, Wu Y, Johnson SE, Feyen JH, Krueger W, Maye P, Yu F, Zhao Y, Kuo L, Gupta RR, Achenie LE, Wang HW, Shin DG, Rowe DW (2005) Expression profile of osteoblast lineage at defined stages of differentiation. *J Biol Chem* 280:24618-24626 doi.org/10.1074/jbc.m413834200
- ❖ Kapustin A, Davies JD, Reynolds JL, McNair R, Jones GT, Sidibe A, Schurgers LJ, Skepper JN, Proudfoot D, Mayr M, Shanahan CM (2011) Calcium Regulates Key Components of Vascular Smooth Muscle Cell-Derived Matrix Vesicles to Enhance Mineralization. *Circ Res* 109:e1–e12 (I)
- ❖ Kapustin AN, Shanahan CM (2011) Osteocalcin: a novel vascular metabolic and osteoinductive factor? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(10):2169-71. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.233601 (II)
- ❖ Kariminejad A, Bozorgmehr B, Najafi A, Khoshaeen A, Ghalandari M, Najmabadi H, Kariminejad MH, Vanakker OM, Hosen MJ, Malfait F, Quagliano D, Florijn RJ, Bergen AA, Hennekam RC (2014) Retinitis pigmentosa, cutis laxa, and pseudoxanthoma elasticum-like skin manifestations associated with GGCX mutations. *J Invest Dermatol* 134(9):2331-8. doi: 10.1038/jid.2014.191

- ❖ Katare R, Riu F, Mitchell K, Gubernator M, Campagnolo P, Cui Y, Fortunato O, Avolio E, Cesselli D, Beltrami AP, Angelini G, Emanuelli C, Madeddu P (2011) Transplantation of human pericyte progenitor cells improves the repair of infarcted heart through activation of an angiogenic program involving micro-RNA-132. *Circ Res* 109(8):894-906. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.251546
- ❖ Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E (2007) The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet* 39(10):1278-84
- ❖ Ketteler M, Westenfeld R, Schlieper G, Brandenburg V (2005) Pathogenesis of vascular calcification in dialysis patients. *Clin Exp Nephrol* 9(4):265-70. Review
- ❖ Khoury Z, Gottlieb S, Stern S, Keren A (1997) Frequency and distribution of atherosclerotic plaques in the thoracic aorta as determined by transesophageal echocardiography in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 79(1):23-7
- ❖ Kim CW, Song H, Kumar S, Nam D, Kwon HS, Chang KH, Son DJ, Kang DW, Brodie SA, Weiss D, Vega JD, Alberts-Grill N, Griendling K, Taylor WR, Jo H (1993) Bone morphogenic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 91:1800-1809 doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300287
- ❖ Kim DH, Saetrom P, Snøve O Jr, Rossi JJ (2008) MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(42):16230-5. doi: 10.1073/pnas.0808830105
- ❖ Kim SH, Turnbull J, Guimond S (2011) Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol* 209(2):139-51. doi: 10.1530/JOE-10-0377
- ❖ Kim SK, Nam JW, Rhee JK, Lee WJ, Zhang BT (2006) miTarget: microRNA target gene prediction using a support vector machine. *BMC Bioinformatics* 7:411
- ❖ Kimura R, Kokubo Y, Miyashita K, Otsubo R, Nagatsuka K, Otsuki T, Sakata T, Nagura J, Okayama A, Minematsu K, Naritomi H, Honda S, Sato K, Tomoike H, Miyata T (2006) Polymorphisms in vitamin K-dependent gamma-carboxylation-related genes influence interindividual variability in plasma protein C and protein S activities in the general population. *Int J Hematol* 84(5):387-97
- ❖ King CR, Deych E, Milligan P, Eby C, Lenzini P, Grice G, Porche-Sorbet RM, Ridker PM, Gage BF (2010) Gamma-glutamyl carboxylase and its influence on warfarin dose. *Thromb Haemost* 104(4):750-4. doi: 10.1160/TH09-11-0763
- ❖ Kivirikko KI, Myllylä R (1985) Post-translational processing of procollagens. *Ann N Y Acad Sci* 460:187-201
- ❖ Kirsch E, Krieg T, Remberger K, Fendel H, Bruckner P, Müller PK (1981) Disorder of collagen metabolism in a patient with osteogenesis imperfecta (lethal type): increased degree of hydroxylation of lysine in collagen types I and III. *Eur J Clin Invest* 11(1):39-47

- ❖ Kiviranta I, Jurvelin J, Tammi M, Säämänen AM, Helminen HJ (1985) Microspectrophotometric quantitation of glycosaminoglycans in articular cartilage sections stained with Safranin O. *Histochemistry* 82(3):249-55.
- ❖ Knobloch JE, Suttie JW (1987) Vitamin K-dependent carboxylase. Control of enzyme activity by the "propeptide" region of factor X. *J Biol Chem* 262(32):15334-7
- ❖ Knott L, Whitehead CC, Fleming RH, Bailey AJ (1995) Biochemical changes in the collagenous matrix of osteoporotic avian bone. *Biochem J* 310 ( Pt 3):1045-51
- ❖ Koga T, Matsui Y, Asagiri M, Kodama T, de Crombrughe B, Nakashima K, Takayanagi H (2005) NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nat Med* 11(8):880-5
- ❖ Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T (1997) Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* ;89(5):755-64
- ❖ Komori T (2011) Signaling networks in RUNX2-dependent bone development. *J Cell Biochem* 112(3):750-5. doi: 10.1002/jcb.22994. Review
- ❖ Komori T (2010) Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res* 339(1):189-195
- ❖ Koos R, Mahnken AH, Mühlenbruch G, Brandenburg V, Pflueger B, Wildberger JE, Kühl HP (2005) Relation of oral anticoagulation to cardiac valvular and coronary calcium assessed by multislice spiral computed tomography. *Am J Cardiol* 96(6):747-9
- ❖ Kowal RC, Richardson JA, Miano JM, Olson EN (1999) EVEC, a novel epidermal growth factor-like repeat-containing protein upregulated in embryonic and diseased adult vasculature. *Circ Res* 84(10):1166-76
- ❖ Köwitz J, Knippel M, Schuhr T, Mach J (1997) Alteration in the extent of collagen I hydroxylation, isolated from femoral heads of women with a femoral neck fracture caused by osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 60(6):501-5
- ❖ Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N (2005) Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37(5):495-500
- ❖ Krol J, Loedige I, Filipowicz W (2010) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11(9):597-610. doi: 10.1038/nrg2843
- ❖ Kuboki Y, Kudo A, Mizuno M, Kawamura M (1992) Time-dependent changes of cross-links and their precursors in the culture of osteogenic cells. *Calcif Tissue Int* 50(5):473-480
- ❖ Kuller LH, Velentgas P, Barzilay J, Beauchamp NJ, O'Leary DH, Savage PJ (2000) Diabetes mellitus: subclinical cardiovascular disease and risk of incident cardiovascular disease and all-cause mortality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(3):823-9
- ❖ Kumar MS, Owens GK (2003) Combinatorial control of smooth muscle-specific gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(5):737-47. Review

- ❖ Laczny C, Leidinger P, Haas J, Ludwig N, Backes C, Gerasch A, Kaufmann M, Vogel B, Katus HA, Meder B, Stähler C, Meese E, Lenhof HP, Keller A (2012) miRTrail--a comprehensive webserver for analyzing gene and miRNA patterns to enhance the understanding of regulatory mechanisms in diseases. *BMC Bioinformatics* 13:36. doi: 10.1186/1471-2105-13-36
- ❖ Laemmli Reino Unido (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685
- ❖ Lagos D, Pollara G, Henderson S, Gratrix F, Fabani M, Milne RS, Gotch F, Boshoff C (2010) miR-132 regulates antiviral innate immunity through suppression of the p300 transcriptional co-activator. *Nat Cell Biol* 12(5):513-9. doi: 10.1038/ncb2054
- ❖ Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294(5543):853-8
- ❖ Lakatta EG, Levy D (2003) Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease. *Circulation* 107(2):346-354
- ❖ Lakatta EG, Levy D (2003) Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a 'set up' for vascular disease. *Circulation* 107(1):139-146
- ❖ Landis WJ (1995) The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix. *Bone* 16(5):533-44
- ❖ Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294(5543):858-62
- ❖ Lee JS, Morrisett JD, Tung CH (2012) Detection of hydroxyapatite in calcified cardiovascular tissues. *Atherosclerosis* 224(2):340-7
- ❖ Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G (2007) Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130(3):456-69
- ❖ Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75(5):843-54
- ❖ LeGeros RZ, Contiguglia SR, Alfrey AC (1973). Pathological calcifications associated with uremia: two types of calcium phosphate deposits. *Calcif Tissue Res.* 13(3):173-85.
- ❖ Leng GC, Lee AJ, Fowkes FG, Whiteman M, Dunbar J, Housley E, Ruckley CV (1996) Incidence, natural history and cardiovascular events in symptomatic and asymptomatic peripheral arterial disease in the general population. *Int J Epidemiol* 25(6):1172-81
- ❖ Lenkala D, Gamazon ER, LaCroix B, Im HK, Huang RS (2015). MicroRNA biogenesis and cellular proliferation. *Transl Res* 166(2):145-51. doi: 10.1016/j.trsl.2015.01.012
- ❖ Li F, Cai Z, Chen F, Shi X, Zhang Q, Chen S, Shi J, Wang DW, Dong N (2012) Pioglitazone attenuates progression of aortic valve calcification via down-regulating receptor for advanced glycation end products. *Basic Res Cardiol* 107(6):306. doi: 10.1007/s00395-012-0306-0

- ❖ Li LC, Okino ST, Zhao H, Pookot D, Place RF, Urakami S, Enokida H, Dahiya R (2006) Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(46):17337-42
- ❖ Li P, Zhu N, Yi B, Wang N, Chen M, You X, Zhao X, Solomides CC, Qin Y, Sun J (2013) MicroRNA-663 regulates human vascular smooth muscle cell phenotypic switch and vascular neointimal formation. *Circ Res* 113(10):1117-27. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301306
- ❖ Li X, Yang HY, Giachelli CM (2006) Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 98(7):905-12
- ❖ Li Y, Qiu C, Tu J, Geng B, Yang J, Jiang T, Cui Q (2013) HMDD v2.0: a database for experimentally supported human microRNA and disease associations. *Nucl. Acids Res* doi: 10.1093/nar/gkt1023
- ❖ Li Z, Hassan MQ, Jafferji M, Aqeilan RI, Garzon R, Croce CM, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB (2009) Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 284(23):15676-84. doi: 10.1074/jbc.M809787200
- ❖ Li Z, Hassan MQ, Volinia S, van Wijnen AJ, Stein JL, Croce CM, Lian JB, Stein GS (2008) A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(37):13906-11
- ❖ Lian JB, Stein GS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, Hassan MQ, Gaur T, Lengner CJ, Young DW (2006) Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord* 7:1-16
- ❖ Liao XB, Zhang ZY, Yuan K, Liu Y, Feng X, Cui RR, Hu YR, Yuan ZS, Gu L, Li SJ, Mao DA, Lu Q, Zhou XM, de Jesus Perez VA, Yuan LQ (2013) MiR-133a modulates osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 154(9):3344-3352
- ❖ Liberman M, Johnson RC, Handy DE, Loscalzo J, Leopold JA (2011) Bone morphogenetic protein-2 activates NADPH oxidase to increase endoplasmic reticulum stress and human coronary artery smooth muscle cell calcification. *Biochem Biophys Res Commun* 413(3):436-41
- ❖ Lin L, He Y, Xi BL, Zheng HC, Chen Q, Li J, Hu Y, Ye MH, Chen P, Qu Y (2016) miR-135a Suppresses Calcification in Senescent VSMCs by Regulating KLF4/STAT3 Pathway. *Curr Vasc Pharmacol* 14(2):211-8
- ❖ Lindner V, Reidy MA (1991) Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:3739-3743
- ❖ Lomashvili K, Garg P, O'Neill WC (2006). Chemical and hormonal determinants of vascular calcification in vitro. *Kidney Int*. 69(8):1464-1470.
- ❖ Lomashvili KA, Cobbs S, Hennigar RA, Hardcastle KI, O'Neill WC (2004). Phosphate-induced vascular calcification: role of pyrophosphate and osteopontin. *J Am Soc Nephrol*. 15(6):1392-401.

- ❖ Lomashvili KA, Garg P, Narisawa S, Millan JL, O'Neill WC (2008) Upregulation of alkaline phosphatase and pyrophosphate hydrolysis: potential mechanism for uremic vascular calcification. *Kidney Int* 73(9): 1024-30
- ❖ Lomashvili KA, Khawandi W, O'Neill WC (2005) Reduced plasma pyrophosphate levels in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 16: 2495-2500
- ❖ Lomashvili KA, Wang X, Wallin R, O'Neill WC (2011) Matrix Gla protein metabolism in vascular smooth muscle and role in uremic vascular calcification. *J Biol Chem* 286:28715-28722 doi: 10.1074/jbc.M111.251462
- ❖ London GM, Drueke TB (1997) Atherosclerosis and arteriosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int* 51(6):1678-95. Review
- ❖ London GM, Guérin AP, Marchais SJ, Métivier F, Pannier B, Adda H (2003) Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant* 18(9):1731-40
- ❖ Long F (2008) Targeting intercellular signals for bone regeneration from bone marrow mesenchymal progenitors. *Cell Cycle* 7(14):2106-11
- ❖ Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G (1997) Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix Gla protein. *Nature* 385:78-81
- ❖ M'Baya-Moutoula E, Louvet L, Metzinger-Le Meuth V, Massy ZA, Metzinger L (2015) High inorganic phosphate concentration inhibits osteoclastogenesis by modulating miR-223. *Biochim Biophys Acta* 1852(10 Pt A):2202-12. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.08.003
- ❖ Mackenzie NC, Staines KA, Zhu D, Genever P, Macrae VE (2014) miRNA-221 and miRNA-222 synergistically function to promote vascular calcification. *Cell Biochem Funct* 32(2):209-16. doi: 10.1002/cbf.3005
- ❖ Madhavan MV, Tarigopula M, Mintz GS, Maehara A, Stone GW, Généreux P (2014) Coronary artery calcification: pathogenesis and prognostic implications. *J Am Coll Cardiol* 63(17):1703-14. doi: 10.1016/j.jacc.2014.01.017. Review
- ❖ Majesky MW (2007) Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:11248-1258
- ❖ Manfioletti G, Brancolini C, Avanzi G, Schneider C (1993) The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol Cell Biochem* 13:4976
- ❖ Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stannek P, Walter C, Glinka A, Niehrs C (2002) Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* 417: 664-667
- ❖ Maragkakis M, Vergoulis T, Alexiou P, Reczko M, Plomaritou K, Gousis M, Kourtis K, Koziris N, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG (2011) DIANA-microT Web server upgrade supports Fly and Worm miRNA target prediction and bibliographic miRNA to disease association. *Nucleic Acids Res* 39(Web Server issue):W145-8. doi: 10.1093/nar/gkr294

- ❖ Margolis JR, Chen JT, Kong Y, Peter RH, Behar VS, Kisslo JA (1980) The diagnostic and prognostic significance of coronary artery calcification. A report of 800 cases. *Radiology* 137(3):609-16
- ❖ Martin EC, Qureshi AT, Dasa V, Freitas MA, Gimble JM, Davis TA (2016) MicroRNA regulation of stem cell differentiation and diseases of the bone and adipose tissue: Perspectives on miRNA biogenesis and cellular transcriptome. *Biochimie* 124:98-111. doi: 10.1016/j.biochi.2015.02.012
- ❖ Martínez-González J, Llorente-Cortés V, Badimon L (2001) Cellular and molecular biology of atherosclerotic lesions. *Rev Esp Cardiol* 54(2):218-31. Review
- ❖ Maurel E, Shuttleworth CA, Bouissou H (1982) Lathyrism: aortic and cutaneous collagen in the rat. *Connect Tissue Res* 10(2):137-43
- ❖ Massagué J, Wotton D (2000) Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 19(8): 1745–1754
- ❖ Masuda Y, Naito S, Aoyagi Y, Yamada Z, Uda T, Morooka N, Watanabe S, Inagaki Y (1990) Coronary artery calcification detected by CT: clinical significance and angiographic correlates. *Angiology* 41(12):1037-1047
- ❖ Mathew S, Lund RJ, Strebeck F, Tustison KS, Geurs T, Hruska KA (2007) Reversal of the adynamic bone disorder and decreased vascular calcification in chronic kidney disease by sevelamer carbonate therapy. *J Am Soc Nephrol* 18:122–130
- ❖ Mathur RV, Shortland JR, el-Nahas AM (2001) Calciphylaxis. *Postgrad Med J* 77(911):557-61. Review
- ❖ Johnsson MS, Nancollas GH (1992) The role of brushite and octacalcium phosphate in apatite formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 3(1-2):61-82. Review
- ❖ Mazzini MJ, Schulze PC (2006) Proatherogenic pathways leading to vascular calcification. *Eur J Radiol* 57(3):384-9
- ❖ McCullough PA, Chinnaiyan KM, Agrawal V, Danielewicz E, Abela GS (2008) Amplification of atherosclerotic calcification and Mönckeberg's sclerosis: spectrum of the same disease process. *Adv Chronic Kidney Dis* 15(4):396-412
- ❖ Medici D, Shore EM, Lounev VY, Kaplan FS, Kalluri R, Olsen BR (2010) Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells. *Nat Med* 16(12):1400-6. doi: 10.1038/nm.2252. Epub 2010 Nov 21. Erratum in: *Nat Med*. 2011 Apr;17(4):514
- ❖ Meier M, Weng LP, Alexandrakis E, Rüschoff J, Goeckenjan G (2001) Tracheobronchial stenosis in Keutel syndrome. *Eur Respir J* 17: 566–569
- ❖ Merlet E, Atassi F, Motiani RK, Mougenot N, Jacquet A, Nadaud S, Capiod T, Trebak M, Lompré AM, Marchand A (2013) miR-424/322 regulates vascular smooth muscle cell phenotype and neointimal formation in the rat. *Cardiovasc Res* 98(3):458-68
- ❖ Miranda KC, Huynh T, Tay Y, Ang YS, Tam WL, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I (2006) A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* 126(6):1203-17

- ❖ Mizobuchi M, Towler D, Slatopolsky E (2009) Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 20(7):1453-64
- ❖ Moe SM, Chen NX (2004). Pathophysiology of vascular calcification in chronic kidney disease. *Circ Res.* 95(6):560-7. Review.
- ❖ Moe SM, Duan D, Doehle BP, O'Neill KD, Chen NX (2003). Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels. *Kidney Int.* 63(3):1003-1011.
- ❖ Moe SM, O'Neill KD, Duan D, Ahmed S, Chen NX, Leapman SB, Fineberg N, Kopeccky K (2002). Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins. *Kidney Int.* 61(2):638-647.
- ❖ Mohler ER 3rd, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane MG, Kaplan FS (2001) Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation* 103(11):1522-8
- ❖ Molostvov G, James S, Fletcher S, Bennett J, Lehnert H, Bland R, Zehnder D (2007) Extracellular calcium-sensing receptor is functionally expressed in human artery. *Am J Physiol Renal Physiol* 293:F946-955
- ❖ Mönckeberg JG (1903) Überdiereine Media verkalkungder Extremitätenarterienhundir Verhaltenzur Arteriosklerose. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 171:141-167
- ❖ Monroe DG, McGee-Lawrence ME, Oursler MJ, Westendorf JJ (2012) Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. *Gene* 492(1):1-18.doi: 10.1016/j.gene.2011.10.044. Review
- ❖ Montes de Oca A, Madueño JA, Martinez-Moreno JM, Guerrero F, Muñoz-Castañeda J, Rodriguez-Ortiz ME, Mendoza FJ, Almaden Y, Lopez I, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E (2010) Highphosphate-induced calcification is related to SM22 $\alpha$  promoter methylation in vascular smooth muscle cells. *J Bone Miner Res* 25:1996-2005
- ❖ Mori K, Shioi A, Jono S, Nishizawa Y, Morii H (1998) Expression of matrix Gla protein (MGP) in an in vitro model of vascular calcification. *FEBS Lett* 433: 19-22
- ❖ Mourani PM, Garl PJ, Wenzlau JM, Carpenter TC, Stenmark KR, Weiser-Evans MC (2004) Unique, highly proliferative growth phenotype expressed by embryonic and neointimal smooth muscle cells is driven by constitutive Akt, mTOR, and p70S6K signaling and is actively repressed by PTEN. *Circulation* 109(10):1299-306
- ❖ Mukherjee A, Rotwein P (2009) Akt promotes BMP2-mediated osteoblast differentiation and bone development. *J Cell Sci* 122:716-726 doi: 10.1242/jcs.042770
- ❖ Mundlos S (1999) Cleidocranial dysplasia: clinical and molecular genetics. *J Med Genet* 36(3):177-82. Review
- ❖ Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR (1997) Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89(5):773-9

- ❖ Munroe PB, Olgunturk RO, Fryns JP, Van Maldergem L, Ziereisen F, Yuksel B, Gardiner RM, Chung E (1999) Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome. *Nat Genet* 21(1):142-4
- ❖ Murakami T, Saito A, Hino S, Kondo S, Kanemoto S, Chihara K, Sekiya H, Tsumagari K, Ochiai K, Yoshinaga K, Saitoh M, Nishimura R, Yoneda T, Kou I, Furuichi T, Ikegawa S, Ikawa M, Okabe M, Wanaka A, Imaizumi K (2009) Signalling mediated by the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in bone formation. *Nat Cell Biol* 11:1205–1211
- ❖ Murray CJ, Lopez AD (1997) Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349(9064):1498-504
- ❖ Murry CE, Gipaya CT, Bartosek T, Benditt EP, Schwartz SM (1997) Monoclonality of smooth muscle cells in human atherosclerosis. *Am J Pathol* 151(3):697-705
- ❖ Murshed M, Schinke T, McKee MD, Karsenty G (2004) Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J Cell Biol* 165(5):625-30
- ❖ Murshed M, Harmey D, Millan JL, McKee MD, Karsenty, G (2005) Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes Dev* 19(9): 1093–1104
- ❖ Myllyharju J, Kivirikko KI (2004) Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* 20(1):33-43. Review
- ❖ Myllyharju J (2008) Prolyl 4-hydroxylases, key enzymes in the synthesis of collagens and regulation of the response to hypoxia, and their roles as treatment targets. *Ann Med* 40(6):402-17. doi: 10.1080/07853890801986594. Review
- ❖ Myllyharju J (2003) Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis. *Matrix Biol* 22(1):15-24. Review
- ❖ Myllyharju J, Kivirikko KI (2001) Collagens and collagen-related diseases. *Ann Med* 33(1):7-21
- ❖ Myllyharju J (2013) Prolyl 4-hydroxylases, master regulators of the hypoxia response. *Acta Physiol* 208: 148-165 (invited review)
- ❖ Nabavi N, Urukova Y, Cardelli M, Aubin JE, Harrison RE (2008) Lysosome dispersion in osteoblasts accommodates enhanced collagen production during differentiation. *J Biol Chem* 283(28):19678-90
- ❖ Nagata K (2003) HSP47 as a collagen-specific molecular chaperone: function and expression in normal mouse development. *Semin Cell Dev Biol* 14(5):275-282
- ❖ Nakashima K, de Crombrughe B (2003) Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genet* 19(8):458-66
- ❖ Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 108: 17–2

- ❖ Nakazawa T, Nakajima A, Seki N, Okawa A, Kato M, Moriya H, Amizuka N, Einhorn TA, Yamazaki M (2004) Gene expression of periostin in the early stage of fracture healing detected by cDNA microarray analysis. *J Orthop Res* 22:520-525 doi.org/10.1532/ijh97.06082
- ❖ Neuville P, Geinoz A, Benzonana G, Redard M, Gabbiani F, Ropraz P, Gabbiani G (1997) Cellular retinol-binding protein-1 is expressed by distinct subsets of rat arterial smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Am J Pathol* 150(2):509-21
- ❖ Neven E, Persy V, Dauwe S, De Schutter T, De Broe ME, D'Haese PC (2010) Chondrocyte rather than osteoblast conversion of vascular cells underlies medial calcification in uremic rats. *Arterioscler Throm Vasc Biol* 30(9):1741-1750
- ❖ New SE, Aikawa E (2011) Molecular imaging insights into early inflammatory stages of arterial and aortic valve calcification. *Circ Res* 108(11):1381-91
- ❖ Nishio Y, Dong Y, Paris M, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Drissi H (2006) Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene. *Gene* 372: 62-70
- ❖ Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K, Maeda N, Kuriyama H, Nagaretani H, Matsuda M, Kondo H, Furuyama N, Kihara S, Nakamura T, Tochino Y, Funahashi T, Matsuzawa Y (2002) Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes* 51(9):2734-41
- ❖ Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG; TASC II Working Group, Bell K, Caporusso J, Durand-Zaleski I, Komori K, Lammer J, Liapis C, Novo S, Razavi M, Robbs J, Schaper N, Shigematsu H, Sapoval M, White C, White J; Clement D, Creager M, Jaff M, Mohler E 3rd, Rutherford RB, Sheehan P, Sillesen H, Rosenfield K (2007) Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Eur J VascEndovasc Surg* 33 (Suppl 1): S1-75
- ❖ Norton GR, Tsotetsi J, Trifunovic B, Hartford C, Candy GP, Woodiwiss AJ (1997) Myocardial stiffness is attributed to alterations in cross-linked collagen rather than total collagen or phenotypes in spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 96:1991-1998
- ❖ Notbohm H, Nokelainen M, Myllyharju J, Fietzek PP, Müller PK, Kivirikko KI (1999) Recombinant human type II collagens with low and high levels of hydroxylysine and its glycosylated forms show marked differences in fibrillogenesis in vitro. *J Biol Chem* 274(13):8988-92
- ❖ O'Neill WC, Sigrist MK, McIntyre CW (2010) Plasma pyrophosphate and vascular calcification in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 25(1):187-91. doi: 10.1093/ndt/gfp362
- ❖ O'Neill WC (2007). The fallacy of the calcium phosphorus product. *Kidney Int* 72:792-796 (I)
- ❖ Ohashi K, Nagata K, Toshima J, Nakano T, Arita H, Tsuda H, Suzuki K, Mizuno K (1995) Stimulation of the Sky receptor tyrosine kinase by the product of growth arrest-specific gene 6. *J Biol Chem* 270:22681
- ❖ Ohnesorge B, Becker CR, Flohr T, Reiser M (2002) Clinical application and evaluation. En: Multi-slice CT in cardiac imaging. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, p. 61-96

- ❖ Ohnesorge B, Flohr T, Fischbach R, Kopp AF, Knez A, Schröder S, Schöpf UJ, Crispin A, Klotz E, Reiser MF, Becker CR (2002) Reproducibility of coronary calcium quantification in repeat examinations with retrospectively ECG-gated multisection spiral CT. *EurRadiol* 12:1532-1540
- ❖ O'Neill WC (2007). Vascular calcification: not so crystal clear. *Kidney Int* 71(4):282-283 (II)
- ❖ Orriols M, Guadall A, Galán M, Martí-Pàmies I, Varona S, Rodríguez-Calvo R, Briones AM, Navarro MA, de Diego A, Osada J, Martínez-González J, Rodríguez C. Lysyl oxidase (LOX) in vascular remodelling (2014) Insight from a new animal model. *Thromb Haemost* 112(4):812-824
- ❖ Ortuño MJ, Susperregui AR, Artigas N, Rosa JL, Ventura F (2013) Osterix induces Coll1a1 gene expression through binding to Sp1 sites in the bone enhancer and proximal promoter regions. *Bone* 52(2):548-56. doi: 10.1016/j.bone.2012.11.007
- ❖ Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ (1997) Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89(5):765-71
- ❖ Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR (2004) Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 84(3):767-801. Review
- ❖ O'Young J, Liao Y, Xiao Y, Jalkanen J, Lajoie G, Karttunen M, Goldberg HA, Hunter GK (2011) Matrix Gla protein inhibits ectopic calcification by a direct interaction with hydroxyapatite crystals. *J Am Chem Soc* 133:18406-18412 doi: 10.1021/ja207628k
- ❖ Palaniswamy C, Sekhri A, Aronow WS, Kalra A, Peterson SJ (2011) Association of warfarin use with valvular and vascular calcification: a review. *Clin Cardiol* 34(2):74-81. doi: 10.1002/clc.20865. Review
- ❖ Panizo S, Naves-Díaz M, Carrillo-López N, Martínez-Arias L, Fernández-Martín JL, Ruiz-Torres MP, Cannata-Andía JB, Rodríguez I (2016) MicroRNAs 29b, 133b, and 211 Regulate Vascular Smooth Muscle Calcification Mediated by High Phosphorus. *J Am Soc Nephrol* 27(3):824-34. doi: 10.1681/ASN.2014050520
- ❖ Panizo S, Cardus A, Encinas M, Parisi E, Valcheva P, López-Ongil S, Coll B, Fernandez E, Valdivielso JM (2009) RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. *Circ Res* 104(9):1041-8. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.189001
- ❖ Papadopouli AE, Klonaris CN, Theocharis SE. (2008) Role of OPG/RANKL/RANK axis on the vasculature. *Histol Histopathol* 23(4): 497-506
- ❖ Patti A, Gennari L, Merlotti D, Dotta F, Nuti R (2013) Endocrine actions of osteocalcin. *Int J Endocrinol* 846480 doi: 10.1155/2013/846480
- ❖ Payne SL, Hendrix MJ, Kirschmann DA (2007) Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer--a prospect. *J Cell Biochem* 101(6):1338-54. Review
- ❖ Peacock JD, Levay AK, Gillaspie DB, Tao G, Lincoln J (2010) Reduced sox9 function promotes heart valve calcification phenotypes in vivo. *Circ Res* 106(4):712-9

- ❖ Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren M, Albus C, Benlian P, Boysen G, Cifkova R, Deaton C, Ebrahim S, Fisher M, Germano G, Hobbs R, Hoes A, Karadeniz S, Mezzani A, Prescott E, Ryden L, Scherer M, Syväne M, Scholte op Reimer WJ, Vrints C, Wood D, Zamorano JL, Zannad F; European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR); ESC Committee for Practice Guidelines (CPG) (2012) European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur Heart J* 33(13):1635-701. Erratum in: *Eur Heart J* 2012;33(17):2126
- ❖ Pletcher MJ, Sibley CT, Pignone M, Vittinghoff E, Greenland P (2013) Interpretation of the coronary artery calcium score in combination with conventional cardiovascular risk factors: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Circulation* 128(10):1076-84. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002598
- ❖ Pischon N, Mäki JM, Weisshaupt P, Heng N, Palamakumbura AH, N'Guessan P, Ding A, Rdalanski R, Renz H, Bronckers TA, Myllyharju J, Kielbassa AM, Klebeer BM, Bernimoulin JP, Trackman PC (2009) Lysil oxidase (lox) gene deficiency affects osteoblastic phenotype. *Calcif Tissue Int* 85:119-126
- ❖ Place RF, Li LC, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R (2008) MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(5):1608-13. doi: 10.1073/pnas.0707594105
- ❖ Price PA, Fraser JD, Metz-Virca G (1987) Molecular cloning of matrix Gla protein: implications for substrate recognition by the vitamin K-dependent gamma-carboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84(23):8335-9
- ❖ Price PA, Faus SA, Williamson MK (1998) Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18(9):1400-7
- ❖ Price PA, Nguyen TM, Williamson MK (2003) Biochemical characterization of the serum fetuin-mineral complex. *J Biol Chem* 278(24):22153-60
- ❖ Price PA, Chan WS, Jolson DM, Williamson MK. (2006) The elastic lamellae of devitalized arteries calcify when incubated in serum. Evidence for a serum calcification factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1079-1085
- ❖ Price PA, Faus SA, Williamson MK. (2000) Warfarin-induced artery calcification is accelerated by growth and vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 317– 327
- ❖ Price PA, Thomas GR, Pardini AW, Figueira WF, Caputo JM, Williamson MK (2002) Discovery of a high molecular weight complex of calcium, phosphate, fetuin, and matrix gamma-carboxyglutamic acid protein in the serum of etidronate-treated rats. *J Biol Chem* 277: 3926-3934
- ❖ Price PA (1989) Gla-containing proteins of bone. *Connect Tissue Res* 21(1-4):51-7; discussion 57-60. Review

- ❖ Prockop DJ, Kivirikko KI (1984) Heritable diseases of collagen. *N Engl J Med* 311(6):376-86. Review
- ❖ Prockop DJ, Sieron AL, Li SW (1998) Procollagen N-proteinase and procollagen C-proteinase. Two unusual metalloproteinases that are essential for procollagen processing probably have important roles in development and cell signaling. *Matrix Biol* 16(7):399-408. Review
- ❖ Prockop DJ (1990) Mutations that alter the primary structure of type I collagen. The perils of a system for generating large structures by the principle of nucleated growth. *J Biol Chem* 265(26):15349-52. Review
- ❖ Proudfoot D, Davies JD, Skepper JN, Weissberg PL, Shanahan CM (2002) Acetylated low-density lipoprotein stimulates human vascular smooth muscle cell calcification by promoting osteoblastic differentiation and inhibiting phagocytosis. *Circulation* 106(24):3044-50
- ❖ Proudfoot D, Shanahan CM (2006) Molecular mechanisms mediating vascular calcification: role of matrix Gla protein. *Nephrology (Carlton)* 11:455-461 doi.org/10.1111/j.1440-1797.2006.00660.x
- ❖ Qi HH, Ongusaha PP, Myllyharju J, Cheng D, Pakkanen O, Shi Y, Lee SW, Peng J, Shi Y (2008) Prolyl 4-hydroxylation regulates Argonaute 2 stability. *Nature* 455(7211):421-4. doi: 10.1038/nature07186
- ❖ Qiao JH, Mertens RB, Fishbein MC, Geller SA (2003) Cartilaginous metaplasia incalcified diabetic peripheral vascular disease: morphologic evidence of chondral ossification. *Hum Pathol* 34(4):402-7
- ❖ Qiao W, Chen L, Zhang M (2014) MicroRNA-205 regulates the calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Cell Physiol Biochem* 33(6):1945-53
- ❖ Rahman SU, Lee MS, Baek JH, Ryoo HM, Woo KM. The prolyl hydroxylase inhibitor dimethylxalylglycine enhances dentin sialophosphoprotein expression through VEGF-induced Runx2 stabilization. *PLoS One*. 2014 Nov 4;9(11):e112078. doi: 10.1371/journal.pone.0112078
- ❖ Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, Stock SR, Donovan J, Springett M, Orszulak T, Fullerton DA, Tajik AJ, Bonow RO, Spelsberg T (2003) Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation* 107(17):2181-4
- ❖ Rangrez AY, M'Baya-Moutoula E, Metzinger-Le Meuth V, Hénaut L, Djelouat MS, Benchitrit J, Massy ZA, Metzinger L (2012) Inorganic phosphate accelerates the migration of vascular smooth muscle cells: evidence for the involvement of miR-223. *PLoS One* 7(10):e47807. doi: 10.1371/journal.pone.0047807
- ❖ Rani S, Barbe M, Barr A, Litvin J (2009) Periostin-like-factor and periostin in an animal model of work-related musculoskeletal disorder. *Bone* 44: 502–512
- ❖ Rasaputra KS, Liyanage AB, Lay JO Jr, McCarthy FM, Rath NC (2010) Tibial dyschondroplasia-associated proteomic changes in chicken growth plate cartilage. *Avian Dis* 54(4):1166-71

- ❖ Ravindran S, Gao Q, Ramachandran A, Blond S, Predescu SA, George A (2011) Stress chaperone GRP-78 functions in mineralized matrix formation. *J Biol Chem* 286:8729-8739 doi: 10.1074/jbc.M110.179341
- ❖ Rawadi G, Vayssière B, Dunn F, Baron R, Roman-Roman S (2003) BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res* 18:1842-1853 doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.10.1842
- ❖ Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, Giegerich R (2004) Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA* 10(10):1507-17
- ❖ Reid JD, Andersen ME (1993) Medial calcification (whitlockite) in the aorta. *Atherosclerosis* 101(2):213-24
- ❖ Rennenberg RJ, Kessels AG, Schurgers LJ, Van Engelshoven JM, de Leeuw PW, Kroon AA (2009) Vascular calcifications as a marker of increased cardiovascular risk: a meta-analysis. *Vasc Health Risk Manag* 5:185-197
- ❖ Reynolds JL, Skepper JN, McNair R, Kasama T, Gupta K, Weissberg PL, Jahnen-Dechent W, Shanahan CM (2005) Multifunctional roles for serum protein fetuin-a in inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification. *J Am Soc Nephrol* 16(10):2920-30
- ❖ Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, Jahnen-Dechent W, Weissberg PL, Shanahan CM (2004) Human vascular smooth muscle cells undergo vesiclemediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 15:2857-2867
- ❖ Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL, Blough DK, Thummel KE, Veenstra DL, Rettie AE (2005) Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med* 352(22):2285-93
- ❖ Rifas L, Arackal S, Weitzmann MN. (2003) Inflammatory T cells rapidly induce differentiation of human bone marrow stromal cells into mature osteoblasts. *J Cell Biochem* 88: 650-659
- ❖ Risteli M, Ruotsalainen H, Salo AM, Sormunen R, Sipilä L, Baker NL, Lamandé SR, Vimpri-Kauppinen L, Myllylä R (2009) Reduction of lysyl hydroxylase 3 causes deleterious changes in the deposition and organization of extracellular matrix. *J Biol Chem* 284(41):28204-11. doi: 10.1074/jbc.M109.038190
- ❖ Risteli M (2008) Substrate specificity of Lysyl Hydroxylase isoforms and multifunctionality of Lysyl Hydroxylase 3. *Acta Univ Oul A* 511
- ❖ Robinson C (2007) Self-oriented assembly of nano-apatite particles: a subunit mechanism for building biological mineral crystals. *J Dent Res* 86(8):677-9

- ❖ Rodríguez C, Raposo B, Martínez-González J, Casaní L, Badimon L (2002) Low density lipoproteins downregulate lysyl oxidase in vascular endothelial cells and the arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(9):1409-14
- ❖ Rodríguez C, Alcudia JF, Martínez-González J, Guadall A, Raposo B, Sánchez-Gómez S, Badimon L (2009) Statins normalize vascular lysyl oxidase down-regulation induced by proatherogenic risk factors. *Cardiovasc Res* 83(3):595-603. doi: 10.1093/cvr/cvp136
- ❖ Rodríguez C, Martínez-González J, Raposo B, Alcudia JF, Guadall A, Badimon L (2008) Regulation of lysyl oxidase in vascular cells: lysyl oxidase as a new player in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 79(1):7-13. doi:10.1093/cvr/cvn102. Epub 2008 May 9. Review. (I)
- ❖ Rodríguez C, Rodríguez-Sinovas A, Martínez-González J (2008) Lysyl oxidase as a potential therapeutic target. *Drug News Perspect* 21(4):218-24. doi:10.1358/dnp.2008.21.4.1213351. Review. (II)
- ❖ Rodríguez-Carballo E, Ulsamer A, Susperregui AR, Manzanares-Céspedes C, Sánchez-García E, Bartrons R, Rosa JL, Ventura F (2011) Conserved regulatory motifs in osteogenic gene promoters integrate cooperative effects of canonical Wnt and BMP pathways. *J Bone Miner Res* 26(4):718-29. doi: 10.1002/jbmr.260
- ❖ Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Soliman EZ, Sorlie PD, Sotoodehnia N, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB (2012); American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 125(1):188-97. doi: 10.1161/CIR.0b013e3182456d46. Erratum in: *Circulation*. 2012 Jun 5;125(22):e1001
- ❖ Ross R, Klebanoff SJ (1971) The smooth muscle cell. I. In vivo synthesis of connective tissue proteins. *J Cell Biol* 50(1):159-71 (I)
- ❖ Ross R (1999) Atherosclerosis- an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126
- ❖ Ross R (1971) The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J Cell Biol* 50(1):172-86 (II)
- ❖ Ross, MH, Pawlina W (2011) *Histology*. Lippincott Williams & Wilkins. 6th edition. P.218
- ❖ Roth JA, Boudreau D, Fujii MM, Farin FM, Rettie AE, Thummel KE, Veenstra DL (2014) Genetic risk factors for major bleeding in patients treated with warfarin in a community setting. *Clin Pharmacol Ther* 95(6):636-43. doi:10.1038/clpt.2014.26
- ❖ Roy ME, Nishimoto SK. (2002) Matrix Gla protein binding to hydroxyapatite is dependent on the ionic environment: calcium enhances binding affinity but phosphate and magnesium decrease affinity. *Bone* 31(2): 296-302
- ❖ Rubinacci A (2009) Expanding the functional spectrum of vitamin K in bone. Focus on: "Vitamin K promotes mineralization, osteoblast to osteocyte transition, and an anti-catabolic

- phenotype by -carboxylation-dependent and -independent mechanisms". *Am J Physiol Cell Physiol* 297: C1336–C1338
- ❖ Ruepp A, Kowarsch A, Schmidl D, Buggenthin F, Brauner B, Dunger I, Fobo G, Frishman G, Montrone C, Theis FJ (2010) PhenomiR: a knowledgebase for microRNA expression in diseases and biological processes. *Genome Biology* 11:R6
  - ❖ Rumberger JA, Brundage BH, Rader DJ, Kondos G (1999) Electron beam computed tomographic coronary calcium scanning: a review and guidelines for use in a asymptomatic persons. *Mayo Clin Proc* 74:243-252
  - ❖ Rutsch F, Nitschke Y, Terkeltaub R (2011) Genetics in arterial calcification: pieces of a puzzle and cogs in a wheel. *Circ Res* 109(5):578-92. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.247965. Review
  - ❖ Rutsch F, Vaingankar S, Johnson K, Goldfine I, Maddux B, Schauerte P, Kalhoff H, Sano K, Boisvert WA, Superti-Furga A, Terkeltaub R. (2001) PC-1 nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in idiopathic infantile arterial calcification. *Am J Pathol* 158(2): 543-554
  - ❖ Ryan LM, Kurup I, Cheung HS (1991) Stimulation of cartilage inorganic pyrophosphate elaboration by ascorbate. *Matrix* 11(4):276-281
  - ❖ Ryoo HM, Lee MH, Kim YJ (2006) Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene* 366(1):51-7
  - ❖ Sage AP, Lu J, Tintut Y, Demer LL (2011) Hyperphosphatemia-induced nanocrystals upregulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteopontin genes in mouse smooth muscle cells in vitro. *Kidney Int* 79(4):414-22
  - ❖ Sage AP, Tintut Y, Demer LL (2010) Regulatory mechanisms in vascular calcification. *Nat Rev Cardiol* 7:528-536 doi: 10.1038/nrcardio.2010.115
  - ❖ Sagel J, Colwell JA, Crook L, Laimins M (1975) Increased platelet aggregation in early diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 82(6):733-738
  - ❖ Saito A, Hino S, Murakami T, Kanemoto S, Kondo S, Saitoh M, Nishimura R, Yoneda T, Furuichi T, Ikegawa S, Ikawa M, Okabe M, Imaizumi K (2009) Regulation of endoplasmic reticulum stress response by a BBF2H7-mediated Sec23a pathway is essential for chondrogenesis. *Nat Cell Biol* 11:1197–1204
  - ❖ Sales G, Coppe A, Bisognin A, Biasiolo M, Bortoluzzi S, Romualdi C (2010) MAGIA, a web-based tool for miRNA and Genes Integrated Analysis. *Nucleic Acids Res* 38(Web Server issue):W352-9. doi: 10.1093/nar/gkq423
  - ❖ Sambrook JF, Russell DW (2010) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Vols 1,2 and 3. Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press
  - ❖ Sammels E, Parys JB, Missiaen L, De Smedt H, Bultynck G (2010) Intracellular Ca<sup>2+</sup> storage in health and disease: a dynamic equilibrium. *Cell Calcium* 47:297–314

- ❖ Santibañez JF, Quintanilla M, Bernabeu C (2011) TGF- $\beta$ /TGF- $\beta$  receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 121(6):233-51. doi: 10.1042/CS20110086. Review
- ❖ Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R (2002) Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 8(4):403-9
- ❖ Schafer C, Heiss A, Schwarz A, Westenfeld R, Ketteler M, Floege J, Muller-Esterl W, Schinke T, Jahn-Dechent W (2003) The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest* 112(3):357-66
- ❖ Schinke T, McKee MD, Karsenty G (1999) Extracellular matrix calcification: where is the action? *Nat Genet* 21(2):150-1
- ❖ Schinke T, Anling M (2007) Mineralization of bone: an active or passive process? In: Handbook of Biomineralization, edited by Epple M, Baeuerlein E. Weinheim (Alemania): Wiley-VCH Verlag p 3-17
- ❖ Schinke T, McKee MD, Kiviranta R, Karsenty G (1998) Molecular determinants of arterial calcification. *Ann Med* 30(6):538-41
- ❖ Schlieper G, Aretz A, Verberckmoes SC, Krüger T, Behets GJ, Ghadimi R, Weirich TE, Rohrman D, Langer S, Tordoir JH, Amann K, Westenfeld R, Brandenburg VM, D'Haese PC, Mayer J, Ketteler M, McKee MD, Floege J (2010) Ultrastructural analysis of vascular calcifications in uremia. *J Am Soc Nephrol* 21(4):689-96. doi: 10.1681/ASN.2009080829
- ❖ Schlieper G, Westenfeld R, Krüger T, Cranenburg EC, Magdeleyns EJ, Brandenburg VM, Djuric Z, Damjanovic T, Ketteler M, Vermeer C, Dimkovic N, Floege J, Schurgers LJ (2011) Circulating non-phosphorylated carboxylated matrix gla protein predicts survival in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 22(2):387-395 doi: 10.1681/ASN.2010040339
- ❖ Schnall-Levin M, Rissland OS, Johnston WK, Perrimon N, Bartel DP, Berger B (2011) Unusually effective microRNA targeting within repeat-rich coding regions of mammalian mRNAs. *Genome Res* 21(9):1395-403. doi: 10.1101/gr.121210.111
- ❖ Schoppet M, Al-Fakhri N, Franke FE, Katz N, Barth PJ, Maisch B, Preissner KT, Hofbauer LC (2004) Localization of osteoprotegerin, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in Mönckeberg's sclerosis and atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab* 89(8):4104-12
- ❖ Schori TR, Stungis GE (2004) Long-term warfarin treatment may induce arterial calcification in humans: case report. *Clin Invest Med* 27(2):107-9
- ❖ Schurgers LJ, Aebert H, Vermeer C, Bültmann B, Janzen J (2004) Oral anticoagulant treatment: friend or foe in cardiovascular disease? *Blood* 104(10):3231-2
- ❖ Schurgers LJ, Teunissen KJ, Knapen MH, Kwaijtaal M, van Diest R, Appels A, Reutelingsperger CP, Cleutjens JP, Vermeer C (2005) Novel conformation-specific antibodies against matrix gamma-carboxyglutamic acid (Gla) protein: undercarboxylated matrix Gla protein as marker for vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(8):1629-33

- ❖ Schurgers LJ, Dissel PE, Spronk HM, Soute BA, Dhore CR, Cleutjens JP, Vermeer C (2001) Role of vitamin K and vitamin K-dependent proteins in vascular calcification. Role of vitamin K and vitamin K-dependent proteins in vascular calcification. *Z Kardiol* 90 Suppl 3:57-63 doi.org/10.1007/s003920170043
- ❖ Schurgers LJ (2013) Vitamin K: key vitamin in controlling vascular calcification in chronic kidney disease. *Kidney Int* 83(5):782-4. doi:10.1038/ki.2013.26
- ❖ Schwartz SM, Campbell GR, Campbell JH (1986) Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ Res* 58(4):427-44. Review
- ❖ S Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ER (1995) The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 77(3):445-65. Review
- ❖ Seemayer TA, Thelmo WL, Morin J (1973) Cartilaginous transformation of the aorticvalve. *Am J Clin Pathol* 60(5):616-20
- ❖ Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME (1999) Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Mönckeberg sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation* 100:2168-2176 (I)
- ❖ Shanahan CM, Weissberg PL (1999) Smooth muscle cell phenotypes in atherosclerotic lesions. *Curr Opin Lipidol* 10(6):507-13. Review (II)
- ❖ Shanahan CM, Proudfoot D, Tyson KL, Cary NR, Edmonds M, Weissberg PL (2000) Expression of mineralisation-regulating proteins in association with human vascular calcification. *Z Kardiol* 89 Suppl 2:63-8. Review
- ❖ Shanahan CM, Cary NR, Metcalfe JC, Weissberg PL (1994) High expression of genes for calcification regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 93:2393–2402
- ❖ Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM (2011) Arterial Calcification in Chronic Kidney Disease: Key Roles for Calcium and Phosphate. *Circ Res* 109(6): 697–711
- ❖ Shanahan CM, Weissberg PL, Metcalfe JC (1993) Isolation of gene markers of differentiated and proliferating vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 73(1):193-204
- ❖ Shanahan CM (2006) Vascular calcification--a matter of damage limitation? *Nephrol Dial Transplant* 21(5):1166-9
- ❖ Shanahan CM, Weissberg PL (1998) Smooth muscle cell heterogeneity: patterns of gene expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* Mar 18(3):333-8. Review
- ❖ Shao JS, Cai J, Towler DA (2006) Molecular mechanisms of vascular calcification:lessons learned from the aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(7):1423-30
- ❖ Shear MJ, Kramer B (1928) Composition of bone. III. Physiochemical mechanism. *J Biol Chem* 79:125-145

- ❖ Shemesh J, Motro M, Morag-Koren N, Tenenbaum A, Apter S, Weiss A, Grossman E (2011) Coronary artery calcification predicts long-term mortality in hypertensive adults. *Am J Hypertens* 24(6):681-6. doi: 10.1038/ajh.2011.28
- ❖ Shen J, Yang M, Jiang H, Ju D, Zheng JP, Xu Z, Liao TD, Li L (2011) Arterial injury promotes medial chondrogenesis in Sm22 knockout mice. *Cardiovasc Res* 90(1):28-37
- ❖ Shi Y, O'Brien JE, Fard A, Mannion JD, Wang D, Zalewski A (1996) Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries. *Circulation* 94(7):1655-64
- ❖ Shin V, Zebboudj AF, Boström K (2004). Endothelial cells modulate osteogenesis in calcifying vascular cells. *J Vasc Res.* 41(2):193-201.
- ❖ Shindyapina AV, Mkrtychyan GV, Gneteeva T, Buiuclic S, Tancowny B, Kulka M, Aliper A, Zhavoronkov A (2014) Mineralization of the connective tissue: a complex molecular process leading to age related loss-of-function. *Rejuvenation Res* 17(2):116-33
- ❖ Shioi A, Katagi M, Okuno Y, Mori K, Jono S, Koyama H, Nishizawa Y (2002). Induction of bone-type alkaline phosphatase in human vascular smooth muscle cells: roles of tumor necrosis factor-alpha and oncostatin M derived from macrophages. *Circ Res.* 91(1):9-16.
- ❖ Shioi A, Nishizawa Y, Jono S, Koyama H, Hosoi M, Morii H (1995). Glycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 2003–2009
- ❖ Shirdel EA, Xie W, Mak TW, Jurisica I (2011) NAViGaTing the Micronome. Using Multiple MicroRNA Prediction Databases to Identify Signalling Pathway-Associated MicroRNAs. *PLoS ONE* 6(2): e17429. doi:10.1371/journal.pone.0017429
- ❖ Shroff RC, McNair R, Skepper JN, Figg N, Schurgers LJ, Deanfield J, Rees L, Shanahan CM (2010) Chronic mineral dysregulation promotes vascular smooth muscle cell adaptation and extracellular matrix calcification. *J Am Soc Nephrol* 21:103–112.
- ❖ Shu B, Zhang M, Xie R, Wang M, Jin H, Hou W, Tang D, Harris SE, Mishina Y, O'Keefe RJ, Hilton MJ, Wang Y, Chen D (2011) BMP2, but not BMP4, is crucial for chondrocyte proliferation and maturation during endochondral bone development. *J Cell Sci* 124(Pt 20):3428-40. doi: 10.1242/jcs.083659
- ❖ Smajilovic S, Tfelt-Hansen J (2007) Calcium acts as a first messenger through the calcium-sensing receptor in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*; 75(3):457-467
- ❖ Smiley JD, Yeager H, Ziff M (1962) Collagen metabolism in osteolathyrism in chick embryos: site of action of beta-amino-propionitrile. *J Exp Med* 116:45-54
- ❖ Snell-Bergeon JK, Budoff MJ, Hokanson JE (2013) Vascular calcification in diabetes: mechanisms and implications. *Curr Diab Rep* 13(3):391-402. Review
- ❖ Son BK, Kozaki K, Iijima K, Eto M, Nakano T, Akishita M, Ouchi Y (2007) Gas6/Axl-PI3K/Akt pathway plays a central role in the effect of statins on inorganic phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 556(1-3):1-8

- ❖ Son BK, Kozaki K, Iijima K, Eto M, Kojima T, Ota H, Senda Y, Maemura K, Nakano T, Akishita M, Ouchi Y (2006) Statins protect human aortic smooth muscle cells from inorganic phosphate-induced calcification by restoring Gas6-Axl survival pathway. *Circ Res* 98:1024–1031. doi.org/10.1161/01.res.0000218859.90970.8d
- ❖ Songpatanasilp T, Chailurkit LO, Chantprasertyothin S, Ongphiphadhanakul B, Taechakraichana N (2011) Effect of GGCX gene polymorphism on the responses of serum undercarboxylated osteocalcin and bone turnover markers after treatment with vitamin K2 (menatetrenone) among postmenopausal Thai women. *J Bone Miner Metab* 29(5):606-14. doi: 10.1007/s00774-011-0263-y
- ❖ Soltoff-Schiller B, Goldfischer S, Adamany AM, Wolinsky H (1976) Endocytosis by vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. Roles of vesicles and lysosomes. *Am J Pathol* 83(1):45-60
- ❖ Soute BA, Ulrich MM, Watson AD, Maddison JE, Ebberink RH, Vermeer C (1992) Congenital deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors due to a defective vitamin K-dependent carboxylase in Devon Rex cats. *Thromb Haemost* 68(5):521-5
- ❖ Speer MY, McKee MD, Guldberg RE, Liaw L, Yang HY, Tung E, Karsenty G, Giachelli CM (2002) Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *J Exp Med* 196(8):1047-55
- ❖ Speer MY, Giachelli CM (2004). Regulation of cardiovascular calcification. *Cardiovasc Pathol*. 13(2):63-70. Review.
- ❖ Speer MY, Yang HY, Brabb T, Leaf E, Look A, Lin WL, Frutkin A, Dichek D, Giachelli CM (2009) Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. *Circ Res* 104(6):733-41
- ❖ Spronk H. M., Soute B. A., Schurgers L. J., Cleutjens J. P., Thijssen H. H., De Mey J. G., Vermeer C. (2001) Matrix Gla protein accumulates at the border of regions of calcification and normal tissue in the media of the arterial vessel wall. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 485–490
- ❖ Stanley TB, Wu SM, Houben RJ, Mutucumarana VP, Stafford DW (1998) Role of the propeptide and gamma-glutamic acid domain of factor IX for in vitro carboxylation by the vitamin K-dependent carboxylase. *Biochemistry* 37(38):13262-8
- ❖ Stanley TB, Jin DY, Lin PJ, Stafford DW (1999) The propeptides of the vitamin K-dependent proteins possess different affinities for the vitamin K-dependent carboxylase. *J Biol Chem* 274(24):16940-4
- ❖ Stanton C, Taylor R, Wallin R (1991) Processing of prothrombin in the secretory pathway. *Biochem J* 277 ( Pt 1):59-65
- ❖ Starega-Roslan J, Koscianska E, Kozłowski P, Krzyzosiak WJ (2011) The role of the precursor structure in the biogenesis of microRNA. *Cell Mol Life Sci* 68(17):2859-71. doi: 10.1007/s00018-011-0726-2

- ❖ Stary HC (1992) Composition and classification of human atherosclerotic lesions. *Virchows Arch A PatholAnatHistopathol* 421:277-90
- ❖ Stary HC (2000) Natural history of calcium deposits in atherosclerosis progression and regression. *Z Kardiol* 89 Suppl 2:28-35. Review
- ❖ Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW (1995) A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 92(5):1355-1374
- ❖ Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW (1994). A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *ArteriosclerThromb* 14(5):840-56. Review
- ❖ Stein GS, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, Javed A, Zaidi SK, Young DW, Choi JY, Pockwinse SM (2004) Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene* 23(24):4315-29. Review
- ❖ Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebersold R, Schinke T, Karsenty G, Giachelli CM (2001) Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res* 89(12):1147-54
- ❖ Steitz SA, Speer MY, McKee MD, Liaw L, Almeida M, Yang H, Giachelli CM. (2002) Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol* 161: 2035–2046
- ❖ Sun Y, Byon CH, Yuan K, Chen J, Mao X, Heath JM, Javed A, Zhang K, Anderson PG, Chen Y (2012) Smooth muscle cell-specific runx2 deficiency inhibits vascular calcification. *Circ Res* 111(5):543-52. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.267237
- ❖ Suokas M, Myllyla R, Kellokumpu S (2000) A single C-terminal peptide segment mediates both membrane association and localization of lysyl hydroxylase in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 275(23):17863-8
- ❖ Surmann-Schmitt C, Dietz U, Kireva T, Adam N, Park J, Tagariello A, Onnerfjord P, Heinegård D, Schlötzer-Schrehardt U, Deutzmann R, von der Mark K, Stock M (2008) Ucma, a novel secreted cartilage-specific protein with implications in osteogenesis. *J Biol Chem* 283(11):7082-93.
- ❖ Surmann-Schmitt C, Stock M, Eitzinger N, Adam N, Dietz U, von der Mark K (2008) Role of Ucma, a novel cartilage specific protein in cartilage matrix and development; 2008 [cited 2011 Dec 4]. Available from: <http://www.molmed.uni-erlangen.de/Ressourcen/REPORT2008.pdf>.
- ❖ Suttie JW (1985) Vitamin K-dependent carboxylase. *Annu Rev Biochem* 54:459-77. Review

- ❖ Suzuki A, Ghayor C, Guicheux J, Magne D, Quillard S, Kakita A, Ono Y, Miura Y, Oiso Y, Itoh M, Caverzasio J (2006) Enhanced expression of the inorganic phosphate transporter Pit-1 is involved in BMP-2-induced matrix mineralization in osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 21:674–683
- ❖ Sweatt A, Sane DC, Hutson SM, Wallin R (2003) Matrix Gla protein (MGP) and bone morphogenetic protein-2 in aortic calcified lesions of aging rats. *J Thromb Haemost* 1(1):178-85
- ❖ Tagariello A, Luther J, Streiter M, Didt-Koziel L, Wuelling M, SurmannSchmitt C, Stock M, Adam N, Vortkamp A, Winterpacht A (2008) Ucma: a novel secreted factor represents a highly specific marker for distal chondrocytes. *Matrix Biol* 27:3–11
- ❖ Takaluoma K, Hyry M, Lantto J, Sormunen R, Bank RA, Kivirikko KI, Myllyharju J, Soininen R (2007) Tissue-specific changes in the hydroxylysine content and cross-links of collagens and alterations in fibril morphology in lysyl hydroxylase 1 knock-out mice. *J Biol Chem* 282(9):6588-96
- ❖ Takasu J, Takanashi K, Naito S, Onishi M, Miyazaki A, Aoyagi Y, Morooka N, Masuda Y, Inagaki Y (1992) Evaluation of morphological changes of the atherosclerotic aorta by enhanced computed tomography. *Atherosclerosis* 97(2-3):107-21
- ❖ Tamamura Y, Otani T, Kanatani N, Koyama E, Kitagaki J, Komori T, Yamada Y, Costantini F, Wakisaka S, Pacifici M, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M (2005) Developmental regulation of Wnt/beta-catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification. *J Biol Chem* 280:19185-19195 doi.org/10.1074/jbc.m414275200
- ❖ Tantisattamo E, Han KH, O'Neill WC (2015) Increased vascular calcification in patients receiving warfarin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35(1):237-42. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304392
- ❖ ten Dijke P, Fu J, Schaap P, Roelen BA (2003). Signal transduction of bone morphogenetic proteins in osteoblast differentiation. *J Bone Joint Surg Am.* 85-A Suppl 3:34-8. Review.
- ❖ Thijssen HH, Flinois JP, Beaune PH (2000) Cytochrome P4502C9 is the principal catalyst of racemic acenocoumarol hydroxylation reactions in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 28(11):1284-90
- ❖ Thygesen K, Alpert JS, White HD; Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction, Jaffe AS, Apple FS, Galvani M, Katus HA, Newby LK, Ravkilde J, Chaitman B, Clemmensen PM, Dellborg M, Hod H, Porela P, Underwood R, Bax JJ, Beller GA, Bonow R, Van der Wall EE, Bassand JP, Wijns W, Ferguson TB, Steg PG, Uretsky BF, Williams DO, Armstrong PW, Antman EM, Fox KA, Hamm CW, Ohman EM, Simoons ML, Poole-Wilson PA, Gurfinkel EP, Lopez-Sendon JL, Pais P, Mendis S, Zhu JR, Wallentin LC, Fernández-Avilés F, Fox KM, Parkhomenko AN, Priori SG, Tendera M, Voipio-Pulkki LM, Vahanian A, Camm AJ, De Caterina R, Dean V, Dickstein K, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hellemans I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, Zamorano JL, Morais J, Brener S, Harrington R, Morrow D, Lim M, Martinez-Rios MA,

- Steinhubl S, Levine GN, Gibler WB, Goff D, Tubaro M, Dudek D, Al-Attar N (2007) Universal definition of myocardial infarction. *Circulation* 116(22):2634-53
- ❖ Timins ME, Pinski R, Sider L, Bear G (1991) The functional significance of calcification of coronary arteries as detected on CT. *J Thorac Imaging* 7(1):79-82
  - ❖ Tintut Y, Alfonso Z, Saini T, Radcliff K, Watson K, Boström K, Demer LL. (2003) Multilineage potential of cells from the artery wall. *Circulation* 108: 2505–2510
  - ❖ Tintut Y, Parhami F, Bostrom K, Jackson SM, Demer LL. (1998) cAMP stimulates osteoblast-like differentiation of calcifying vascular cells: potential signaling pathway for vascular calcification. *J Biol Chem* 273: 7547–7553
  - ❖ Tjäderhane L, Vered M, Pääkkönen V, Peteri A, Mäki JM, Myllyharju J, Dayan D, Salo T (2013) The expression and role of Lysyl oxidase (LOX) in dentinogenesis. *Int Endod J* 46(6):581-9. doi: 10.1111/iej.12031
  - ❖ Tohmonda T, Miyauchi Y, Ghosh R, Yoda M, Uchikawa S, Takito J, Morioka H, Nakamura M, Iwawaki T, Chiba K, Toyama Y, Urano F, Horiuchi K (2011) The IRE1alpha-XBP1 pathway is essential for osteoblast differentiation through promoting transcription of Osterix. *EMBO Rep* 12:451–457
  - ❖ Tokunaga F, Wakabayashi S, Koide T (1995) Warfarin causes the degradation of protein C precursor in the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* 34(4):1163-70
  - ❖ Tonelli M, Curhan G, Pfeffer M, Sacks F, Thadhani R, Melamed ML, Wiebe N, Muntner P (2009) Relation between alkaline phosphatase, serum phosphate, and all-cause or cardiovascular mortality. *Circulation* 120:1784–1792
  - ❖ Topouzis S, Majesky MW (1996) Smooth muscle lineage diversity in the chick embryo. Two types of aortic smooth muscle cell differ in growth and receptor-mediated transcriptional responses to transforming growth factor-beta. *Dev Biol* 178(2):430-45
  - ❖ Towler DA (2005). Inorganic pyrophosphate: a paracrine regulator of vascular calcification and smooth muscle phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25(4):651-4. Review.
  - ❖ Trelstad RL (1974). Human aorta collagens: evidence for three distinct species. *Biochem Biophys Res Commun* 57(3):717-25
  - ❖ Trion A, Schutte-Bart C, Bax WH, Jukema JW, van der Laarse A (2008) Modulation of calcification of vascular smooth muscle cells in culture by calcium antagonists, statins, and their combination. *Mol Cell Biochem* 308(1-2):25-33
  - ❖ Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM (2003) Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(3):489-94
  - ❖ Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM (2003). Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23(3):489-94.

- ❖ Uchiyama S, Shibata Y, Hirabayashi T, Mihara B, Hamashige N, Kitagawa K, Goto S, Origasa H, Shimada K, Kobayashi H, Isozaki M, Ikeda Y; J-TRACE Investigators (2010). Risk factor profiles of stroke, myocardial infarction, and atrial fibrillation: a Japanese Multicenter Cooperative Registry. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 19(3):190-197
- ❖ Ufer M (2005) Comparative pharmacokinetics of vitamin K antagonists: warfarin, phenprocoumon and acenocoumarol. *Clin Pharmacokinet* 44(12):1227-46. Review
- ❖ Ulsamer A, Ortuño MJ, Ruiz S, Susperregui AR, Osses N, Rosa JL, Ventura F (2008) BMP-2 induces Osterix expression through up-regulation of Dlx5 and its phosphorylation by p38. *J Biol Chem* 283(7):3816-26
- ❖ Uzawa K, Yeowell HN, Yamamoto K, Mochida Y, Tanzawa H, Yamauchi M (2003) Lysine hydroxylation of collagen in a fibroblast cell culture system. *Biochem Biophys Res Commun* 305(3):484-7
- ❖ Uzawa K, Grzesik WJ, Nishiura T, Kuznetsov SA, Robey PG, Brenner DA, Yamauchi M (1999) Differential expression of human lysyl hydroxylase genes, lysine hydroxylation, and cross-linking of type I collagen during osteoblastic differentiation in vitro. *J Bone Miner Res* 14(8):1272-80
- ❖ Valdivielso JM (2011). Vascular calcification: types and mechanisms. *Nefrologia* 31(2):142-7. doi: 10.3265/Nefrologia.pre2010.Nov.10754. Review. Spanish
- ❖ Valtavaara M, Papponen H, Pirttilä AM, Hiltunen K, Helander H, Myllylä R (1997) Cloning and characterization of a novel human lysyl hydroxylase isoform highly expressed in pancreas and muscle. *J Biol Chem* 272(11):6831-4
- ❖ Valtavaara M, Szpirer C, Szpirer J, Myllylä R (1998) Primary structure, tissue distribution, and chromosomal localization of a novel isoform of lysyl hydroxylase (lysyl hydroxylase 3). *J Biol Chem* 273(21):12881-6. Erratum in: *J Biol Chem* 2000 Jul 7;275(27):20956
- ❖ Van Campenhout A, Golledge J. Osteoprotegerin, vascular calcification and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2009 Jun;204(2):321-9. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.09.033.
- ❖ Varga A, Gruber N, Forster T, Piros G, Havasi K, Jebelovszki E, Csanády M (2004) Atherosclerosis of the descending aorta predicts cardiovascular events: a transesophageal echocardiography study. *Cardiovasc Ultrasound* 22;2:21
- ❖ Varnum BC, Young C, Elliott G, Garcia A, Baratley TD, Fridell Y-W, Hunt RW, Trail G, Clogston C, Toso RJ, Yanagihara D, Bennett L, Sylber M, Merewether LA, Tseng A, Escobar E, Liu ET, Yamane HK (1995) Axl receptor tyrosine kinase is stimulated by the vitamin K-dependent protein encoded by growth-arrest-specific gene 6. *Nature* 373:623
- ❖ Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318(5858):1931-4
- ❖ Vattikuti R, Towler DA (2004) Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *Am J PhysiolEndocrinol Metab* 286:E686-E696

- ❖ Vecsler M, Loebstein R, Almog S, Kurnik D, Goldman B, Halkin H, Gak E (2006) Combined genetic profiles of components and regulators of the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system affect individual sensitivity to warfarin. *Thromb Haemost* 95(2):205-11
- ❖ Verberckmoes SC, Persy V, Behets GJ, Neven E, Hufkens A, Zebger-Gong H, Müller D, Haffner D, Querfeld U, Bohic S, De Broe ME, D'Haese PC (2007) Uremia-related vascular calcification: more than apatite deposition. *Kidney Int* 71(4):298-303
- ❖ Viegas CSB, Simes DC, Laizé V, Williamson MK, Price PA, Cancela ML (2008) Gla-rich protein (GRP), a new vitamin K-dependent protein identified from sturgeon cartilage and highly conserved in vertebrates. *J Biol Chem* 283:36655–64
- ❖ Villa-Bellosta R, Bogaert YE, Levi M, Sorribas V (2007) Characterization of phosphate transport in rat vascular smooth muscle cells: implications for vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(5):1030-6
- ❖ Villa-Bellosta R, Levi M, Sorribas V (2009) Vascular smooth muscle cell calcification and SLC20 inorganic phosphate transporters: effects of PDGF, TNF-alpha, and Pi. *Pflugers Arch* 458(6):1151-61. doi:10.1007/s00424-009-0688-5
- ❖ Villa-Bellosta R, Millan A, Sorribas V (2011) Role of calcium-phosphate deposition in vascular smooth muscle cell calcification. *Am J Physiol Cell Physiol* 300(1):C210-20. doi: 10.1152/ajpcell.00229.2010 (I)
- ❖ Villa-Bellosta R, Rivera-Torres J, Osorio FG, Acín-Pérez R, Enriquez JA, López-Otín C, Andrés V (2013) Defective extracellular pyrophosphate metabolism promotes vascular calcification in a mouse model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome that is ameliorated on pyrophosphate treatment. *Circulation* 127(24):2442-51
- ❖ Villa-Bellosta R, Sorribas V (2011) Calcium phosphate deposition with normal phosphate concentration. –Role of pyrophosphate-. *Circ J* 75(11):2705-2710 (II)
- ❖ Virchow R (1989) Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI- Atheromatous affection of arteries. *Nutr Rev* 47:23-25
- ❖ Vlachos IS, Kostoulas N, Vergoulis T, Georgakilas G, Reczko M, Maragkakis M, Paraskevopoulou MD, Prionidis K, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG (2012) DIANA miRPath v.2.0: investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways. *Nucleic Acids Res* 40(Web Server issue):W498-504. doi: 10.1093/nar/gks494
- ❖ Vlachos IS, Paraskevopoulou MD, Karagkouni D, Georgakilas G, Vergoulis T, Kanellos I, Anastasopoulos IL, Maniou S, Karathanou K, Kalfakakou D, Fevgas A, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG (2015) DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. *Nucleic Acids Res* 43(Database issue):D153-9. doi: 10.1093/nar/gku1215
- ❖ Vora SR, Palamakumbura AH, Mitsi M, Guo Y, Pischon N, Nugent MA, Trackman PC (2010) Lysyl oxidase propeptide inhibits FGF-2-induced signaling and proliferation of osteoblasts. *J Biol Chem* 285(10):7384-93. doi: 10.1074/jbc.M109.033597

- ❖ Vorum H, Liu X, Madsen P, Rasmussen HH, Honoré B (1998) Molecular cloning of a cDNA encoding human calumenin, expression in *Escherichia coli* and analysis of its Ca<sup>2+</sup>-binding activity. *Biochim Biophys Acta* 1386(1):121-31
- ❖ Vorum H, Hager H, Christensen BM, Nielsen S, Honoré B (1999) Human calumenin localizes to the secretory pathway and is secreted to the medium. *Exp Cell Res* 248(2):473-481 doi.org/10.1006/excr.1999.4431
- ❖ Vorum H, Jacobsen C, Honoré B (2000) Calumenin interacts with serum amyloid P component. *FEBS Lett* 465:129-134 doi.org/10.1016/s0014-5793(99)01734-2
- ❖ Waddington CH (1942) The epigenotype. *Endeavour* 1:18-20
- ❖ Wadelius M, Chen LY, Eriksson N, Bumpstead S, Ghori J, Wadelius C, Bentley D, McGinnis R, Deloukas P (2007) Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism. *Hum Genet* 121(1):23-34
- ❖ Wallin R, Cain D, Hutson SM, Sane DC, Loeser R (2000) Modulation of the binding of matrix Gla protein (MGP) to bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). *Thromb Haemost* 84(6):1039-44
- ❖ Wajih N, Hutson SM, Wallin R (2006) siRNA silencing of calumenin enhances functional factor IX production. *Blood* 108(12):3757-60
- ❖ Wajih N, Sane DC, Hutson SM, Wallin R (2004) The inhibitory effect of calumenin on the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system: characterization of the system in normal and warfarin-resistant rats. *J Biol Chem* 279:25276-25283 doi.org/10.1074/jbc.m401645200
- ❖ Wallin R, Hutson SM, Cain D, Sweatt A, Sane DC (2001) A molecular mechanism for genetic warfarin resistance in the rat. *FASEB J* 15(13):2542-4
- ❖ Wallin R, Cain D, Sane DC (1999) Matrix Gla protein synthesis and gamma-carboxylation in the aortic vessel wall and proliferating vascular smooth muscle cells--a cell system which resembles the system in bone cells. *Thromb Haemost* 82(6):1764-7
- ❖ Wallin R, Hutson SM (2004) Warfarin and the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. *Trends Mol Med* 10(7):299-302. Review
- ❖ Wallin R, Cain D, Hutson SM, Sane DC, Loeser R. (2000). Modulation of the binding of matrix Gla protein (MGP) to bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). *Thromb Haemost* 84: 1039–1044
- ❖ Walmsley AR, Batten MR, Lad U, Bulleid NJ (1999) Intracellular retention of procollagen within the endoplasmic reticulum is mediated by prolyl 4-hydroxylase. *J Biol Chem* 274(21):14884-92
- ❖ Wanet A, Tacheny A, Arnould T, Renard P (2012) miR-212/132 expression and functions: within and beyond the neuronal compartment. *Nucleic Acids Res* 40(11):4742-53. doi: 10.1093/nar/gks151
- ❖ Wang Q, Feng H, Zheng P, Shen B, Chen L, Liu L, Liu X, Hao Q, Wang S, Chen J, Teng J (2012) The intracellular transport and secretion of calumenin-1/2 in living cells. *PLoS One* 7:e35344 doi: 10.1371/journal.pone.0035344

- ❖ Weilbaecher KN, Guise TA, McCauley LK (2011) Cancer to bone: a fatal attraction. *Nat Rev Cancer* 11(6):411-25. doi: 10.1038/nrc3055. Review
- ❖ Weiser-Evans MC, Quinn BE, Burkard MR, Stenmark KR (2000) Transient reexpression of an embryonic autonomous growth phenotype by adult carotid artery smooth muscle cells after vascular injury. *J Cell Physiol* 182(1):12-23 (I)
- ❖ Weiser-Evans MC, Schwartz PE, Grieshaber NA, Quinn BE, Grieshaber SS, Belknap JK, Mourani PM, Majack RA, Stenmark KR (2000) Novel embryonic genes are preferentially expressed by autonomously replicating rat embryonic and neointimal smooth muscle cells. *Circ Res* 87(7):608-15 (II)
- ❖ Weissberg PL, Clesham GJ, Bennett MR (1996) Is vascular smooth muscle cell proliferation beneficial? *Lancet* 347(8997):305-7. Review
- ❖ Wen P, Cao H, Fang L, Ye H, Zhou Y, Jiang L, Su W, Xu H, He W, Dai C, Yang J (2014) miR-125b/Ets1 axis regulates transdifferentiation and calcification of vascular smooth muscle cells in a high-phosphate environment. *Exp Cell Res* 322(2):302-12. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.01.025
- ❖ Wenstrup RJ, Willing MC, Starman BJ, Byers PH (1990) Distinct biochemical phenotypes predict clinical severity in nonlethal variants of osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 46(5):975-82
- ❖ Wexler L, Brundage B, Crouse J, Detrano R, Fuster V, Maddahi J, Rumberger J, Stanford W, White R, Taubert K (1996) Coronary artery calcification: pathophysiology, epidemiology, imaging methods, and clinical implications. A statement for health professionals from the American Heart Association. Writing Group. *Circulation* 94(5):1175-92
- ❖ Whitlon DS, Sadowski JA, Suttie JW (1978) Mechanism of coumarin action: significance of vitamin K epoxide reductase inhibition. *Biochemistry* 17(8):1371-7
- ❖ Wibrand K, Panja D, Tiron A, Ofte ML, Skaftnesmo KO, Lee CS, Pena JT, Tuschl T, Bramham CR (2010) Differential regulation of mature and precursor microRNA expression by NMDA and metabotropic glutamate receptor activation during LTP in the adult dentate gyrus in vivo. *Eur J Neurosci* 31(4):636-45. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07112.x
- ❖ Wight TN, Ross R (1975) Proteoglycans in primate arteries. I. Ultrastructural localization and distribution in the intima. *J Cell Biol* 67(3):660-74
- ❖ Wilson PW, Kauppila LI, O'Donnell CJ, Kiel DP, Hannan M, Polak JM, Cupples LA (2001) Abdominal aortic calcific deposits are an important predictor of vascular morbidity and mortality. *Circulation* 103(11):1529-34
- ❖ Wilson R, Norris EL, Brachvogel B, Angelucci C, Zivkovic S, Gordon L, Bernardo BC, Stermann J, Sekiguchi K, Gorman JJ, Bateman JF (2012) Changes in the chondrocyte and extracellular matrix proteome during post-natal mouse cartilage development. *Mol Cell Proteomics* 11:1-18 doi: 10.1074/mcp.M111.014159
- ❖ Winkel TA, Hoeks SE, Schouten O, Zeymer U, Limbourg T, Baumgartner I, Bhatt DL, Steg PG, Goto S, Röther J, Cacoub PP, Verhagen HJ, Bax JJ, Poldermans D (2010) Prognosis of atrial fibrillation in patients with symptomatic peripheral arterial disease: data from the REduction of

- Atherothrombosis for Continued Health (REACH) Registry. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 40(1):9-16
- ❖ Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 11(3):228-34. doi: 10.1038/ncb0309-228. Review
  - ❖ Wissler RW (1968) The arterial medial cell, smooth muscle or multifunctional mesenchyme? *J Atheroscler Res* 8(2):201-13
  - ❖ Wong N, Wang X (2015) miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res* 43(Database issue):D146-52. doi: 10.1093/nar/gku1104
  - ❖ Wu SS, Lin X, Yuan LQ, Liao EY (2015) The Role of Epigenetics in Arterial Calcification. *Biomed Res Int* 2015:320849. doi: 10.1155/2015/320849
  - ❖ Wu W, Bancroft JD, Suttie JW (1996) Differential effects of warfarin on the intracellular processing of vitamin K-dependent proteins. *Thromb Haemost* 76(1):46-52
  - ❖ Xiao F, Zuo Z, Cai G, Kang S, Gao X, Li T (2009) miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res* 37(Database issue):D105-10. doi: 10.1093/nar/gkn851
  - ❖ Xiao G, Jiang D, Ge C, Zhao Z, Lai Y, Boules H, Phimphilai M, Yang X, Karsenty G, Franceschi RT. (2005). Cooperative interactions between activating transcription factor 4 and Runx2/Cbfa1 stimulate osteoblast-specific osteocalcin gene expression. *J Biol Chem* 280: 30689–30696
  - ❖ Xie J, Yu F, Li D, Zhu X, Zhang X, Lv Z (2016) MicroRNA-218 regulates cisplatin (DPP) chemosensitivity in non-small cell lung cancer by targeting RUNX2. *Tumour Biol* 37(1):1197-204. doi: 10.1007/s13277-015-3831-2
  - ❖ Yabe D, Taniwaki M, Nakamura T, Kanazawa N, Tashiro K, Honjo T (1998) Human calumenin gene (CALU): cDNA isolation and chromosomal mapping to 7q32. *Genomics* 49(2):331-3
  - ❖ Yabe D, Nakamura T, Kanazawa N, Tashiro K, Honjo T (1997) Calumenin, a Ca<sup>2+</sup>-binding protein retained in the endoplasmic reticulum with a novel carboxyl-terminal sequence, HDEF. *J Biol Chem* 272(29):18232-9
  - ❖ Yamauchi M, Young DR, Chandler GS, Mechanic GL (1988) Cross-linking and new bone collagen synthesis in immobilized and recovering primate osteoporosis. *Bone* 9(6):415-8
  - ❖ Yamauchi M, Banes AJ, Kuboki Y, Mechanic GL (1981) A comparative study of the distribution of the stable crosslink, pyridinoline, in bone collagens from normal, osteoblastoma, and vitamin D-deficient chicks. *Biochem Biophys Res Commun* 102(1):59-65
  - ❖ Yamauchi M, Katz EP, Otsubo K, Teraoka K, Mechanic GL (1989) Cross-linking and stereospecific structure of collagen in mineralized and nonmineralized skeletal tissues. *Connect Tissue Res* 21(1-4):159-67; discussion 168-9
  - ❖ Yamauchi M, Katz EP (1993) The post-translational chemistry and molecular packing of mineralizing tendon collagens. *Connect Tissue Res* 29(2):81-98

- ❖ Yang H, Curinga G, Giachelli CM (2004) Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro. *Kidney Int* 66:2293–2299
- ❖ Yao Y, Bennett BJ, Wang X, Rosenfeld ME, Giachelli C, Lusic AJ, Boström KI (2010) Inhibition of bone morphogenetic proteins protects against atherosclerosis and vascular calcification. *Circ Res* 107(4):485-94. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.219071
- ❖ Yao Y, Nowak S, Yochelis A, Garfinkel A, Boström KI (2007) Matrix GLA protein, an inhibitory morphogen in pulmonary vascular development. *J Biol Chem* 282(41):30131-42
- ❖ Ito Y (2004) Oncogenic potential of the RUNX gene family: 'overview'. *Oncogene* 23(24):4198-208. Review
- ❖ Yoshiko Y, Candelieri GA, Maeda N, Aubin JE (2007) Osteoblast autonomous Pi regulation via Pit1 plays a role in bone mineralization. *Mol Cell Biol* 27:4465–4474.
- ❖ Zebboudj AF, Imura M, Boström K (2002) Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 277(6):4388-94
- ❖ Zebboudj AF, Shin V, Boström K. (2003). Matrix GLA protein and BMP-2 regulate osteoinduction in calcifying vascular cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 90: 756-765.
- ❖ Zhang B, Ginsburg D (2004) Familial multiple coagulation factor deficiencies: new biologic insight from rare genetic bleeding disorders. *J Thromb Haemost* 2(9):1564-72. Review
- ❖ Zhang Y, Xie RL, Gordon J, LeBlanc K, Stein JL, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein GS (2012) Control of mesenchymal lineage progression by microRNAs targeting skeletal gene regulators Trps1 and Runx2. *J Biol Chem* 287(26):21926-35. doi: 10.1074/jbc.M112.340398
- ❖ Zhang Y, Xie RL, Croce CM, Stein JL, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein GS (2011) A program of microRNAs controls osteogenic lineage progression by targeting transcription factor Runx2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(24):9863-8. doi: 10.1073/pnas.101849310
- ❖ Zhang YE (2009) Non-Smad pathways in TGF- $\beta$  signaling. *Cell Res* 19:128-139
- ❖ Zhu D, Mackenzie NC, Farquharson C, Macrae VE (2012) Mechanisms and clinical consequences of vascular calcification. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3:95
- ❖ Zhu D, Mackenzie NC, Millán JL, Farquharson C, MacRae VE (2011) The appearance and modulation of osteocyte marker expression during calcification of vascular smooth muscle cells. *PLoS One* 6(5):e19595



## **Sección XII. Anexos**

---



**ANEXO I. PROGRAMAS DE PREDICCIÓN DE miRNA, SUS DIANAS Y CARACTERÍSTICAS DE LOS ALGORITMOS DESARROLLADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN *in silico* DE POTENCIALES SITIOS DE REGULACIÓN Y miRNA.** Adaptado de Dweep HHH y colaboradores (2013)

Contenido	Programa	Especies	Algoritmos	Ventajas	Desventajas	Fuente
Información general	miRBase					<a href="http://www.mirbase.org">http://www.mirbase.org</a>
Información validada interacciones miRNA-diana	miRecords			Combina resultados de otras aplicaciones e integra información bibliográfica y validada experimentalmente. Integra la información de 11 programas de predicción establecidos		<a href="http://www.mirecords.biolead.org">http://www.mirecords.biolead.org</a> (Xiao F y cols., 2009)
	miRTarBase			Integra información sobre funcionalidad, vías moleculares, relación con otros miRNA genes (incluidos los transcritos con <i>splicing</i> alternativo), sistemas		<a href="http://www.mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw">http://www.mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw</a> (Hsu SD y cols., 2011; Hsu SD y cols., 2014)

				biológicos, asociación con patologías		
	TarBase 7.0			Puntúa la predicción de las interacciones seleccionadas. Ofrece literatura disponible y link con PubMed.		<a href="http://www.microna.gr/tarbase">http://www.microna.gr/tarbase</a>  (Vlachos IS y cols., 2014)
Predicción de dianas para miRNA	Diana microT v4	Humano, ratón, gusano, mosca	Complementariedad de la región ' <i>seed</i> ', características termodinámicas	Prefiere la estructura del mRNA diana que la complementariedad del ' <i>seed</i> '. Interfaz sencilla de utilizar. Puede predecir 1 o más miRNAs y 1 o más genes diana como input. La versión actualizada permite predecir CDS y 5'-UTR, además de 3'-UTR en su versión DIANA-microT- CDS	Ausencia de cooperatividad y multiplicidad de los sitios de unión de miRNAs. Filtro conservativo	<a href="http://www.diana.cslab.ntua.gr/microT">http://www.diana.cslab.ntua.gr/microT</a>  (Maragkakis M y cols., 2011)
	miRDB	Humano, ratón, rata,	Clasificación SVM	Interfaz basada en la edición de	No se pueden modificar los	<a href="http://www.mirdb.org">http://www.mirdb.org</a>

	perro, pollo		Wikipedia para las anotaciones funcionales	términos de la búsqueda	(Wong N y cols., 2014)
			Predicción simultanea de sitios de unión en 3'-UTR, 5'-UTR, CDS y promotores		
miRWalk	Humano, ratón, rata	Complementariedad de la región ' <i>seed</i> ', modelo estadístico	Predicciones basadas en 10 bases de datos diferentes e información exclusiva mediante la integración de información sobre genes, enfermedades, líneas celulares, vías moleculares, etc.	Ausencia de valoración de la energía libre	<a href="http://www.mirwalk.uni-hd.de">http://www.mirwalk.uni-hd.de</a> (Dweep H y cols., 2011; Dweep H y cols., 2015)
miRanda 4.0	Humano, ratón, ata, mosca, gusano	Complementariedad, energía libre, conservación evolutiva	Ofrece información sobre los patrones específicos de expresión de miRNA en diferentes tejidos. Validación utilizando dianas	Poca precisión. Filtros conservativos	<a href="http://www.microrna.org">http://www.microrna.org</a> (Enright A y cols., 2003)

			conocidas de miRNA		
miTarget		Complementariedad de la región 'seed', energía libre, clasificación SVM ( <i>Support Vector Machine</i> )	Dianas de miRNA validadas en la literatura	Filtro simple para la modificación de los términos de búsqueda	<a href="http://cebit.snu.ac.kr/miTarget">http://cebit.snu.ac.kr/miTarget</a> (Kim SK y cols., 2006)
PicTar	Vertebrados, moscas, gusanos	Complementariedad de la región 'seed', energía libre, conservación, HMM	Considera la conservación interespecífica para reducir los falsos positivos	Predicción de sitios no conservativos	<a href="http://pictar.mdc-berlin.de">http://pictar.mdc-berlin.de</a> (Krek y cols., 2005)
PITA	Humano, ratón, mosca, gusano	Complementariedad de la región 'seed', energía libre	Considera la estructuras secundarias para predecir posibles dianas.	Baja eficiencia de algoritmos existentes	<a href="http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07">http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07</a> (Kertesz y cols., 2007)
RNA22	Humano, ratón, mosca, gusano	Patrones de reconocimiento	Estudio interactivo, sin considerar los filtros interespecíficos	Baja eficiencia de algoritmos existentes	<a href="http://cbsrv.watson.ibm.com/rna22.html">http://cbsrv.watson.ibm.com/rna22.html</a> (Miranda KC y cols., 2006)
RNAhybrid		Complementariedad de la región 'seed', energía libre, modelo estadístico	Extensión de los programas clásicos de estructuras secundarias de	Incapaz de distinguir sitios funcionales y no funcionales	<a href="http://bibisery.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid">http://bibisery.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid</a> (Rechmsmeier M y cols., 2004)

		RNA			
TargetScanHuman	Humano, Ratón, gusano, mosca, pez	Complementariedad con 3'UTR y sus ortólogos. Conservación evolutiva con humano, chimpancé, Rhesus, ratón, rata, vaca, perro, zari güeya, pollo y rana	Cribados amplios para sitios conservados y poco conservados de 6-8 nucleótidos. Permite utilizar como input tanto los miRNA como las dianas	Restringido a la complementariedad del 'seed' y conservación	<a href="http://www.targetscan.org">http://www.targetscan.org</a>  (Agarwal V y cols., 2015)
Magia	Humano	Modelo estadístico. Algoritmos para la combinación de patrones de expresión	Determinaciones cruzadas de miRNAs, dianas y expresión génica. Predicción de dianas, análisis integrado de patrones de expresión, rutas de regulación post-traducciona l y visualización. Anotación funcional y enriquecimiento analítico	Poca concordancia con los resultados de las bases de datos individuales que integra: TargetScan, PITA y PicTar	<a href="http://gencomp.bio.unipd.it/magia/start/">http://gencomp.bio.unipd.it/magia/start/</a>  (Sales G y cols., 2010)
DIANA-miRPath v3.0	Humano, ratón, rata, mosca,		Análisis de rutas controladas por un miRNA. Combina		<a href="http://www.microrna.gr/miRPathv2">http://www.microrna.gr/miRPathv2</a>

	gusano, pollo, pez		datos bioquímicos con regulación miRNA- dependiente y analiza ambos conjuntamente. Integra la información de DIANA-TarBase v7.0, DIANA- microT-CDS y Target Scan Interfaz sencilla y comprensible. También permite buscar los potenciales miRNA regulando una ruta concreta	(Vlachos IS y cols., 2012)
MaMi		Energía libre de hibridación, estructura del miRNA y su diana	Servidor clásico basado en la energías de hibridación. Posible customización de parámetros químicos	<a href="http://mami.med.harvard.edu/">http://mami.med.harvard.edu/</a>
mirDIP			Combina las predicciones de 6 bases de datos. Predicciones más robustas	<a href="http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/">http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/</a>  (Shirdel EAY cols., 2011)

	miRGator v3.0	Alineamiento, valora la estructura secundaria	Interpretación funcional, patrones de expresión y predicción de dianas	<a href="http://mirgator.kobic.re.kr/">http://mirgator.kobic.re.kr/</a>  (Cho S y cols., 2013)
Interacciones miRNA- patología	HMDD			<a href="http://cmbi.bjmu.edu.cn/hmdd">http://cmbi.bjmu.edu.cn/hmdd</a>  (Li Y y cols2013)
	miR2Disease			<a href="http://www.miR2disease.org">http://www.miR2disease.org</a>  (Jiang Q y cols., 2009)
	PhenomiR			<a href="http://mips.helmholtz-muenchen.de/phenomir">http://mips.helmholtz-muenchen.de/phenomir</a>  (Ruepp A y cols., 2010)
	miRTrail			<a href="http://www.bioinf.uni-sb.de">http://www.bioinf.uni-sb.de</a>  (Laczny C y cols., 2012)

## ANEXO II. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES, REACTIVOS DE TRABAJO, TAMPONES Y MEDIOS DE CULTIVO. LISTADOS DE ANTICUERPOS Y CEBADORES UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO

### 1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y REACTIVOS DE TRABAJO

#### 1.1. SOLUCIÓN FIJADORA

Formol al 4% preparado en PBS 1X. Preparar en fresco. El formol se adquirió de GroupT3 (GroupT3, Sentmant, Barcelona, España)

#### 1.2. SOLUCIONES DESCALCIFICADORAS

##### 1.2.1. Solución descalcificadora suave utilizada en muestras histológicas.

Ácido fórmico al 31,5% en solución acuosa de citrato sódico al 20% (concentración final de citrato sódico 13%)

##### 1.2.2. Solución descalcificadora utilizada en monocapas celulares

Se preparó ácido clorhídrico (HCl 32%, 8,77M, Panreac AppliChem, Castellar del Vallés, Barcelona, España) a 0,6M preparado en agua ultra-pura.

#### 1.3. SOLUCIÓN ALIZARIN RED PARA VALORACIÓN DE CALCIO EN MUESTRAS HISTOLÓGICAS

Solución	Reactivo	Cantidad	C <sub>F</sub>
Solución Alizarin Red*, pH4,1-4,3 ajustado con NH <sub>4</sub> OH 10%	Alizarin Red S	2g	2%
	Agua destilada	100mL	-
Acetona	Acetona	100%	100%
Acetona-Xileno (1:1)	Acetona 100%	50mL	50%
	Xileno	50ml	50%

\* El pH es crítico, por lo que la solución Alizarin Red (Panreac AppliChem, Castellar del Vallés, Barcelona, España) no debe utilizarse transcurrido 1 mes de su preparación. C<sub>F</sub>, concentración final

#### 1.4. SOLUCIÓN TAMPONADA DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> AL 3%

Se prepara H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% diluyendo 30 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (stock) (Panreac AppliChem, Castellar del Vallés, Barcelona, España) en 70 mL de TBS 1X

### 1.5. SOLUCIONES DE BLOQUEO ANTIGÉNICO

A continuación se distinguen las diferentes soluciones de bloqueo utilizadas en esta Tesis dependiendo de la aplicación:

- a. **Técnicas IHQ:** Se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma, San Luis, MO, EEUU) al 1% en TBST 1X.
- b. **Técnicas ICQ:** Se utilizó suero bovino fetal (SBF) (Gibco® Life technologies, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU) al 5% en PBST 1X para células permeabilizadas y SBF al 5% en PBS 1X para células no permeabilizadas
- c. **Técnicas Western blot:** La elección de la solución de bloqueo dependió del anticuerpo (ver Tabla adjuntada a continuación)

Solución de bloqueo	Diluyente Anticuerpo	Anticuerpo
Leche desnatada 5% (w/v) en TBST	Leche desnatada 5% (w/v) en TBST (0,05% Tween 20)	SM22- $\alpha$ c-11 1:500, calumenina, $\beta$ -actina 1:10000
Leche desnatada 5% (w/v) en PBST	Leche desnatada 5% (w/v) en PBST (0,1% Tween 20)	OCN c8 1:200
BSA 3% (w/v) en TBST	BSA 1% (w/v) en TBST (0,05% Tween 20)	cMGP 1:2500

Se utilizó Leche Asturiana en polvo desnatada. Tween 20 fue adquirido de Sigma-Aldrich (Sigma, San Luis, MO, EEUU); Tris Base fue adquirido de AppliChem (Panreac AppliChem, Castellar del Vallés, Barcelona, España); el HCl para ajustar pH fue adquirido de AppliChem-Panreac (Panreac AppliChem, Castellar del Vallés, Barcelona, España); el PBS fue adquirido de BioMérieux (Marcy l'Etoile, Francia)

### 1.6. SOLUCIÓN DILUYENTE DE ANTICUERPOS

a. **Técnicas IHQ:** BSA al 1% en PBST 1X. El anticuerpo se añade a la titulación optimizada.

b. **Técnicas ICQ:** BSA al 1% en PBST 1X para células permeabilizadas y BSA al 1% en PBS 1X para células no permeabilizadas

d. **Técnicas Western blot:** se utilizó la misma solución de bloqueo (*Anexo I, epígrafe 1.6c*)

### **1.7. SOLUCIÓN CRISTAL VIOLETA PARA ENSAYO DE VIABILIDAD**

Para un  $V_F = 500\text{mL}$  se prepararon 0,5g cristal violeta (Sigma, San Luis, MO, EEUU) (0.1%), 54,75 mL formaldehído 37% (4%) y se completó con agua ultra-pura hasta 500 mL

### **1.8. SOLUCIÓN DE NITRATO DE PLATA**

Se preparó nitrato de plata (Sigma, San Luis, MO, EEUU) al 3% en agua ultra-pura.

### **1.9. SOLUCIÓN TIOSULFATO DE SODIO**

Se preparó tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) (Sigma, San Luis, MO, EEUU) al 5% en agua ultra-pura

### **1.10. SOLUCIÓN DE SAFRANINA**

Se preparó safranina ( $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{Cl}$ ) (Sigma, San Luis, MO, EEUU) al 0,3% en etanol preparado al 10% en agua ultra-pura

### **1.11. SOLUCIÓN AZUL COOMASIE, $V_F = 500\text{ML}$**

Se preparó con 0,25 g Coomasie Blue R-250, 50 mL ácido acético glacial (10%), 125 mL 2-propanol (25%), 325 mL agua ultra-pura

### **1.12. SOLUCIÓN DE DECOLORACIÓN DE LA TINCIÓN AZUL COOMASIE**

Se preparó una mezcla de ácido acético glacial, metanol absoluto y agua ultra-pura en proporciones volumétricas 20:45:35

### **1.13. REACTIVO A DEL ENSAYO BCA**

Se utilizó el reactivo A de Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU) cuya composición es: BCA 1%, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2%, tartrato sódico 0,16% (estabilización del cromóforo de Biuret), NaOH 0,4%, NaHCO<sub>3</sub> 0,95%. Ajustar pH 11,25 con NaOH.

#### **1.14. REACTIVO B DEL ENSAYO BCA**

Se preparó CuSO<sub>4</sub> (Panreac AppliChem, Castellar del Vallés, Barcelona, España) al 4% en agua ultra-pura

#### **1.15. REACTIVO BCIP/NBT**

Se disolvió una pastilla/tableta de Sigma Fast BCIP/NBT Tablets (Sigma, San Luis, MO, EEUU) en 10 mL agua ultra-pura

### **2. PREPARACIÓN DE TAMPONES**

#### **2.1. TAMPÓN TE I (TRIS-EDTA)**

##### **2.1.1. Tampón TE I, 1L**

Se utilizó este tampón alcalino (pH 9,0) para el desenmascaramiento antigénico en técnicas IHQ. Para un volumen final de 1L, se preparó 1,21 g Tris Base (10 mM), 0,37 g EDTA (1 mM), 0,05% Tween 20 y se completó con agua ultra-pura hasta 1L. Guardar a 15-25°C ≤ 3 meses o a +4°C para periodos mayores

##### **2.1.2. Tampón TE II**

Se utilizó este tampón para eluir las preparaciones plasmídicas. Venía incluido en los kits de preparaciones plasmídicas. Composición: Tris Base (10 mM), EDTA (1 mM), pH 7,5 y preparado con agua ultra-pura libre de RNAsas

#### **2.2. TAMPÓN PBS 1X, pH 7.4, 1L**

Se prepararon 7,650 g NaCl (131 mM), 0,724 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (5,1 mM), 0,210 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,7 mM). Llevar a 1L con agua ultra-pura. Guardar ≤,2 meses a +4°C.

#### **2.3. TAMPÓN PBST 1X, pH 7.4, 1L**

Se preparó PBS 1X, 0,1% Tween 20. Se llevó a 1L con agua ultra-pura. Guardar  $\leq 2$  meses a  $+4^{\circ}\text{C}$ .

**2.4. TAMPÓN TBS 1X (TRIS BUFFERED SALINE), PH 7.5, V<sub>F</sub> 1L**

Se preparó 1,210 g Tris (10 mM), 5,844 g NaCl (100 mM). Ajustar pH a 7,5 con HCl. Enrasar a 1L con agua ultra-pura. Guardar  $\leq 2$  meses a  $+4^{\circ}\text{C}$

**2.5. TAMPÓN TBST 1X (TRIS BUFFERED SALINE TWEEN20), PH 7.5, V<sub>F</sub> 1L**

Tampón TBS 1X, 0,05% Tween 20. Guardar  $\leq 3$  meses a  $15-25^{\circ}\text{C}$  o a  $+4^{\circ}\text{C}$  para periodos mayores

**2.6. TAMPÓN TBE 5X (10X TRIS/BORIC ACID/EDTA TBE, BIO-RAD)**

54 g Tris Base, 27,5 g ácido bórico, 20 mL EDTA 0,5M (10 mM). Ajustar pH 8. Completar con agua ultra-pura hasta 1L. Utilizar como TBE 1X diluyendo en agua ultra-pura: 200 mL TBE 5X + 800 mL agua ultra-pura

**2.7. TAMPÓN TAE 10X**

48,4 g Tris Base, 11,42 mL ácido acético glacial, 100 mL EDTA 0,5M (10 mM), Ajustar pH 8,0. Completar con agua ultra-pura hasta 1L. Utilizar como TAE 1X diluyendo en agua ultra-pura: 100 mL TBE 5X + 900 mL agua ultra-pura

**2.8. TAMPÓN TRIS-HCL 1,5M, pH 8,8, V<sub>F</sub> = 100mL**

Se prepararon 18,17 g Tris Base en agua ultra-pura. Se ajustó el pH a 8,8. Enrasar hasta 100 mL con agua ultra-pura

**2.9. TAMPÓN TRIS-HCL 0,5M, PH 6,8, V<sub>F</sub> = 100mL**

Se prepararon 6,057 g Tris Base en agua ultra-pura. Se ajustó el pH a 6,8. Enrasar hasta 100 mL con agua ultra-pura.

**2.10. TAMPÓN LAEMMLI DE CARGA 6X, V<sub>F</sub> = 100mL**

La preparación de del tampón concentrado a 6X consta de Tris-HCl 0,75 M pH 6,8; SDS 6%, Glicerol 30%, Azul de Bromofenol R-250 0,018%,  $\beta$ -mercaptoetanol 6%. Se alicuotó y conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Usar a 1X.

### 2.11. TAMPÓN DE RECORRIDO 10X PARA ELECTROFORESIS SDS-PAGE, $V_F = 1L$

10X	1X
Tris Base 250 mM	Tris Base 25 mM
Glicina 1,92 M	Glicina 192 mM
SDS 1%	SDS 0,1%
pH 8,3	pH 8,3
Completar con agua ultra-pura hasta 1L    Completar con agua ultra-pura hasta 1L	

Se usó a 1X para desarrollar la electroforesis SDS-PAGE diluyendo 70 mL del tampón 10X en 630 mL de agua ultra-pura. 700 mL son suficientes para dos geles SDS-PAGE tipo MiniProtean II.

### 2.12. TAMPÓN DE TRANSFERENCIA SEMI-SECA 10X, $V_F = 1L$

10X	1X
Tris Base 250 mM	Tris Base 25 mM
Glicina 1,92 M	Glicina 192 mM
	Metanol 20%
pH 8,3	pH 8,3
Completar con agua ultra-pura hasta 1L    Completar con agua ultra-pura hasta 1L	

Se usó a 1X para realizar la transferencia

### 2.13. TAMPÓN OSTEOGÉNICO (TAMPÓN SÖRENSEN FOSFATO, pH 7,4)

Reactivo	Concentración stock	Mezcla
$Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$ (Scharlau)	0,2 M	81%
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (Scharlau)	0,2 M	19%

Se diluyó 1 volumen de tampón Sörensen fosfato 0,2 M en 1 volumen de agua ultra-pura para obtener el stock a 0,1 M. Se filtró con dispositivos de 0,22  $\mu m$  y se conservó a  $+4^\circ C$  durante  $\leq 3$  meses.

### 2.14. TAMPONES DE LISIS PARA LA SOLUBILIZACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL

Todos los tampones de lisis se suplementaron con inhibidores de proteasas inmediatamente antes de ser utilizados.

Tampón de lisis	Reactivos	C <sub>F</sub>	Uso
<b>Tampón I</b>	NaOH	0,1 M	Extracción de proteína total en monocapas descalcificadas. El SDS es un detergente aniónico similar al deoxicolato de sodio, por lo que facilita la extracción de proteína total y su desnaturalización
	SDS	0,1 %	
	EDTA	5 mM	
<b>Tampón II (RIPA)</b>	NaCl	150 mM	El deoxicolato de sodio (detergente iónico) junto con el SDS permite la disrupción de la membrana nuclear y en consecuencia la extracción de proteína total en monocapas celulares no descalcificadas.
	Tris-HCl, pH 8.0	50 mM	
	Nonidet-P4/Tritón X-100	1 % (w/v)	
	Deoxicolato de sodio	0,5 %	
	SDS	0,1 %	
	EDTA	1 mM	
	EGTA	5 mM	

### 3. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS Y CÉLULAS ANIMALES

#### 3.1. MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS

##### 3.1.1. Medio Luria Broth o LB (1L) (Cat. 1551.00, Laboratorios Conda)

10 g Triptona, 5 g extracto de levadura, 10 g NaCl, pH 7,2, ajustar NaOH, Completar con agua ultra-pura hasta 1L. Autoclavar

##### 3.1.2. Medio LB selectivo

Medio LB suplementado con Ampicilina 100 µg/mL (Stock Ampicilina a 10 mg/mL se prepara a 1/100 en el medio LB). Se utilizó Kanamicina para pEGFP-c1

##### 3.1.3. Medio LB-agar (1L) (Cat. 1083.00, Laboratorios Conda)

10 g Triptona, 5 g extracto de levadura, 10 g NaCl, 15 g agar bacteriológico. Ajustar pH con NaOH. Completar con agua ultra-pura hasta 1L. Autoclavar.

#### **3.1.4. Medio LB-agar (Lennox) selectivo**

Preparar 35 g de LB-agar en 1L de agua ultra-pura. Mezclar bien y calentar agitando frecuentemente. Llevar a ebullición durante 1 min para completar la disolución. Autoclavar (121 °C, 15-20 min). Enfriar a 45-50°C. Incorporar el antibiótico (Ampicilina 100 µg/mL (Stock Ampicilina a 10mg/mL se prepara a 1/100 en el medio LB)] y mezclar bien. Dispensar en placas estériles. Dejar enfriar para solidificar (adquiere un color ámbar ligeramente opalescente), cerrar las placas y almacenar a 8-15°C. Se utilizó Kanamicina para pEGFP-c1.

#### **3.1.5. Medio SOB (1L) (Cat. 1541.00, Laboratorios Conda, Madrid)**

20 g Bacto triptona (2% (w/v)), 5 g extracto de levadura (0,5% (w/v)), 2 mL NaCl 5 M (10 mM), 25 mL KCl 100 mM (2,5 mM). Autoclavar. Agregar 10 mL MgCl<sub>2</sub> 1 M (10 mM) y 10 mL MgSO<sub>4</sub> 1M (10 mM) estériles.

#### **3.1.6. Medio SOC**

Medio SOB suplementado con glucosa (Sigma, San Luis, MO, EEUU) 20 mM finales.

#### **3.1.7. Medio de criopreservación bacteriana**

Para preparar viales de 1 mL: 800 mL del medio LB conteniendo la suspensión bacteriana + 200 mL de glicerol 99% estéril (glicerol al 20% final). Mezclar por inversión 4-5 veces. Criopreservación de los viales a -80°C.

### **3.2. MEDIOS DE CULTIVO PARA CÉLULAS ANIMALES**

Todos los reactivos se atemperan en baño a 37° C antes de empezar. Trabajo bajo cabina de flujo laminar bioseguridad tipo II (Telstar BioII Advance). No se utilizaron antibióticos durante la realización de transfecciones ni suero bovino fetal (SBF) dependiendo del agente lipotransfectante utilizado. Se realizó proceso de inactivación de las proteínas del complemento presentes en el suero (descomplementación) mediante descongelación del SBF (Gibco® Life technologies,

Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU) a +4° C durante toda la noche e inmersión en baño termostático a 56° C durante 30 min. Se alicuotó y conservó a -20° C, para su posterior uso en fresco.

### 3.2.1. Medio completo para el cultivo y mantenimiento de células animales

Línea celular	Reactivo	Porcentaje volumen
BAEC, HepG2	RPMI 1640	88%
HUVEC EA.hy-926	DMEM 4,5g/L glucosa	88%
CMLV	M199, L-Glut	78%
BAEC, HepG2, HUVEC EA.hy-926	SBF	10%
CMLV		20%
	L-Glutamina (Lonza)	1% (1 mM)
	Penicilina/Estreptomina (Lonza)	1% (100 U/mL Penicilina, 100 µg/mL Estreptomina)

El medio RPMI se obtuvo de Lonza, el medio DMEM 4,5g/L glucosa se obtuvo de Biowest, el medio M199 se obtuvo de Sigma-Aldrich. La L-glutamina y antibióticos se obtuvieron de Lonza.

### 3.2.2. Medio de criopreservación de células animales

Reactivo	Concentración (%) (v/v)
SBF	92,5%
DMSO	7,5 %

DMSO, dimetil sulfóxido (Sigma, San Luis, MO, EEUU)

Se debe utilizar pre-enfriado a unos +4° C para ralentizar el metabolismo celular y evitar la toxicidad celular del DMSO.

El proceso de criopreservación se realizó sobre pellets celulares cuantificados y resuspendidos con 1mL *medio de criopreservación*. Cada stock contenía entre  $1-2 \times 10^6$  células/mL. Los stocks se identificaron con el número de pase, la línea celular, el

número de células y la fecha. La criopreservación se realizó a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante  $\leq 3$  meses (utilización a corto plazo) o en Nitrógeno líquido para periodos  $> 3$  meses.

### 3.2.3. Medio de arresto para CMLV

M199 97,6%, SBF 0,4%, L-glutamina 1 mM, 100 U/mL penicilina, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  estreptomina. La restricción de factores de crecimiento y mitógenos del medio de arresto induce el cese de la división celular y su entrada en la fase  $G_0$  del ciclo celular.

### 3.2.4. Medios osteogénicos

Reactivo	Condición	Concentración final
M199	-	94 %
SBF	-	4 %
L-Glutamina	-	2 mM
Penicilina/Estreptomina	-	100 U/mL Penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Estreptomina
Tampón Sörensen 0,1 M, pH 7,4	HPM	2,6 mM

HPM, hiperfosfatemia

## 4. LISTADO INHIBIDORES DE PROTEASAS

Reactivo	Enzimas	Concentración	Almacenaje
PMSF	Serinproteasas	1 mM	$-20^{\circ}\text{C}$
Cocktail inhibidor de proteasas (P8340, Sigma, San Luis, MO, EEUU)	Ser- y Cys- proteasas, proteasas ácidas, aminopeptidasas	1/100	$-20^{\circ}\text{C}$
EDTA (Sigma, San Luis, MO, EEUU)	Metaloproteasas	5 mM	$15-25^{\circ}\text{C}$
EGTA (Sigma, San Luis, MO, EEUU)	$\text{Ca}^{2+}$ -proteasas	1 mM	$15-25^{\circ}\text{C}$

PMSF, fluoruro de fenilmetilsulfonilo; EDTA, ácido etildiaminotetraacético.

El stock de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (Sigma, San Luis, MO, EEUU), PMSF, se preparó a 100 mM en metanol absoluto, se alicuotó y conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El EDTA se preparó a 100 mM en agua, ajustando a pH 8,0 para disolverlo.

## 5. LISTADO DE ANTICUERPOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO

### 5.1. ANTICUERPOS PRIMARIOS

Anti-SM22- $\alpha$  c-11 (sc-271719, Santa Cruz); anti-calumenina (ab125273, Abcam); anti-osteocalcina c-8 (sc-774495, Santa Cruz); anti-cMGP (ALX- 804-643, Alexis® Biochemicals); anti-ucMGP (ALX-804-642, Alexis® Biochemicals) y  $\beta$ -actina (Clon Ac-15, A5441, Sigma, San Luis, MO, EEUU)

## **5.2. ANTICUERPOS SECUNDARIOS**

Anti-IgG de ratón (NA931V, GE Healthcare); anti-IgG de conejo (NA9340V, GE Healthcare).

## 6. LISTADO DE CEBADORES PARA PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

Gen	Especie	Secuencia transcritos NCBI	Exones amplificados*	Ensayo	Catálogo	Proteína codificada	Función
<i>GAPDH</i>	<i>Homo sapiens</i>	(NM_001256799, NM_002046, NM_001289745, NM_001289746)	6/7	Hs_GAPDH_1_SG	QT00079247	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	<i>housekeeping gene</i>
<i>TAGLN</i>	<i>Homo sapiens</i>	(NM_001001522, NM_003186)	3/4/5	Hs_TAGLN_2_SG	QT01678516	Transgelina, <i>smooth muscle 22-alpha</i> (SM22- $\alpha$ )	Marcador fenotípico de célula muscular y fibroblastos
<i>BGLAP</i>	<i>Homo sapiens</i>	(NM_199173)	n/a	Hs_BGLAP_1_SG	QT00232771	<i>Bone Gla protein</i> , osteocalcina (OCN)	Proteína no colagénica, producida por osteoblastos
<i>CALU</i>	<i>Homo sapiens</i>	(NM_001199671, NM_001219)	NM_001199673, 2/3	Hs_CALU_1_SG	QT00003087	Calumenina (Calu)	Chaperona miembro de la familia CERC. Capacidad de unión a Ca <sup>2+</sup> . Regulación endógena de la GGCX
<i>BMP2</i>	<i>Homo sapiens</i>	(NM_001200)	2/3	Hs_BMP2_1_SG	QT00012544	<i>Bone morphogenetic protein-2</i> (BMP-2)	Inducción de diferenciación osteoblástica. Desarrollo óseo y cartilaginoso.
<i>RUNX2</i>	<i>Homo sapiens</i>	(NM_001015051, NM_004348, XM_006715231, XM_006715234)	NM_001024630, NM_001278478, XM_006715233, 3/4	Hs_RUNX2_1_SG	QT00020517	<i>Runt-related transcription factor 2</i> o <i>core-binding factor subunit alpha-1</i> (Runx2/cbfa1)	Factor de transcripción que regula la expresión de genes implicados en la diferenciación osteoblástica
<i>SP7</i>	<i>Homo sapiens</i>	(NM_001173467, NM_001300837)	NM_152860, n/a	Hs_SP7_1_SG	QT00213514	Osterix (Osx)	Factor de transcripción maestro

Mecanismos Fisiopatológicos del Remodelado y la Calcificación Arterial en la Cardiopatía Isquémica

							de la diferenciación osteoblástica.
<i>DKK2</i>	<i>Homo sapiens</i>	(NM_014421)	2/3	Hs_DKK2_1_SG	QT00038073	<i>Dickkopf-related protein 2 (Dkk2)</i>	Interviene la vía Wnt/ $\beta$ -catenina.
<i>CTNNB1</i>	<i>Homo sapiens</i>	(NM_001098209, NM_001904, XM_001133664, XM_001133675, XM_006712983, XM_006712985)	6/7	Hs_CTNNB1_1_SG	QT00077882	$\beta$ -catenina <i>cadherin-associated protein beta 1</i>	En presencia de Wnt, se acumula en el núcleo co-activando factores transcripcionales de la familia TCF/LEF y conduciendo a la activación de genes como SP7, BGLAP, etc.
<i>COL1A1</i>	<i>Homo sapiens</i>	(NM_000088, XM_005257058, XM_005257059, XM_006721703)	1/2	Hs_COL1A1_1_SG	QT00037793	Colágeno tipo I cadena $\alpha 1$ (Colla1)	Componente mayoritario del colágeno tipo I
<i>COL1A2</i>	<i>Homo sapiens</i>	(NM_000089)	2/3/4	Hs_COL1A2_1_SG	QT00072058	Colágeno tipo I cadena $\alpha 2$ (Colla2)	Componente minoritario del colágeno tipo I.
<i>PLOD1</i>	<i>Homo sapiens</i>	(NM_000302)	5/6	Hs_PLOD1_1_SG	QT00012768	Prolil-lisil oxidasa (Plod1)	Enzima intracelular que hidroxila Lys y Pro en proteínas colagénicas. Esencial para la formación de interacciones estables ( <i>cross-linking</i> ) del colágeno
<i>LOX</i>	<i>Homo sapiens</i>	(NM_001178102, NM_002317)	3/4	Hs_LOX_1_SG	QT00017311	Lisil oxidasa (Lox)	Enzima extracelular que hidroxilar Lys. Esencial para el ensamblaje e interacción estable de colágeno y elastina.

<i>MIR132</i>	<i>Homo sapiens</i>	miRNA maduro: hsa-miR-132-3p (MIMAT0000426: 5'U AACAGUCUACAGCCAUGGUCG)		Hs_miR-132-1	MS00003458		Ver tabla miRNAs
<i>MIR218-1</i>	<i>Homo sapiens</i>	miRNA maduro: hsa-miR-218-5p (MIMAT0000275: 5'UUGUGCUUGAUCUAACCAUGU)		Hs_miR-218_1	MS00006769		Ver tabla miRNAs
<i>RNUU6-6P</i>	<i>Homo sapiens</i>	NR_002752		Hs_RNU6-2_11	MS00033740		Ver tabla miRNAs
<i>Tbp</i>	<i>Mus musculus</i>	(NM_013684)	7/8/9	Mm_Tbp_1_SG	QT00198443	TATA box binding protein	<i>House Keeling gene</i>
<i>Tagln</i>	<i>Mus musculus</i>	(NM_011526)	1/2	Mm_Tagln_1_SG	QT00165179	Transgelina, smooth muscle 22-alpha (SM22- α)	
<i>Bglap</i>	<i>Mus musculus</i>	(NM_001037939, NM_007541)	n/a	Mm_Bglap_1_SG	QT00259406	<i>Bone Gla protein,</i> osteocalcina (OCN)	
<i>Bmp2</i>	<i>Mus musculus</i>	(NM_007553, XM_006498619)	n/a	Mm_Bmp2_1_SG	QT01054277	<i>Bone morphogenetic protein-2</i> (BMP-2)	
<i>Runx2</i>	<i>Mus musculus</i>	(NM_001145920, NM_001146038, NM_001271627, NM_006523540, XM_006523541, XM_006523542, XM_006523543, XM_006523544, XM_006523545)	5/6	Mm_Runx2_1_SG	QT00102193	<i>Runt-related transcription factor 2</i> o <i>core-binding factor subunit alpha-1</i> (Runx2/cbfa1)	
<i>Calu</i>	<i>Mus musculus</i>	(NM_007594, NM_184053, NM_001285412)	6/7	Mm_Calu_1_SG	QT00144557	Calumenina (Calu)	
<i>Catnb1</i>	<i>Mus musculus</i>	(NM_001165902, XM_006511927)	NM_007614, 6/7	Mm_Catnb1_1_SG	QT00160958	β-catenina o <i>cadherin-</i>	

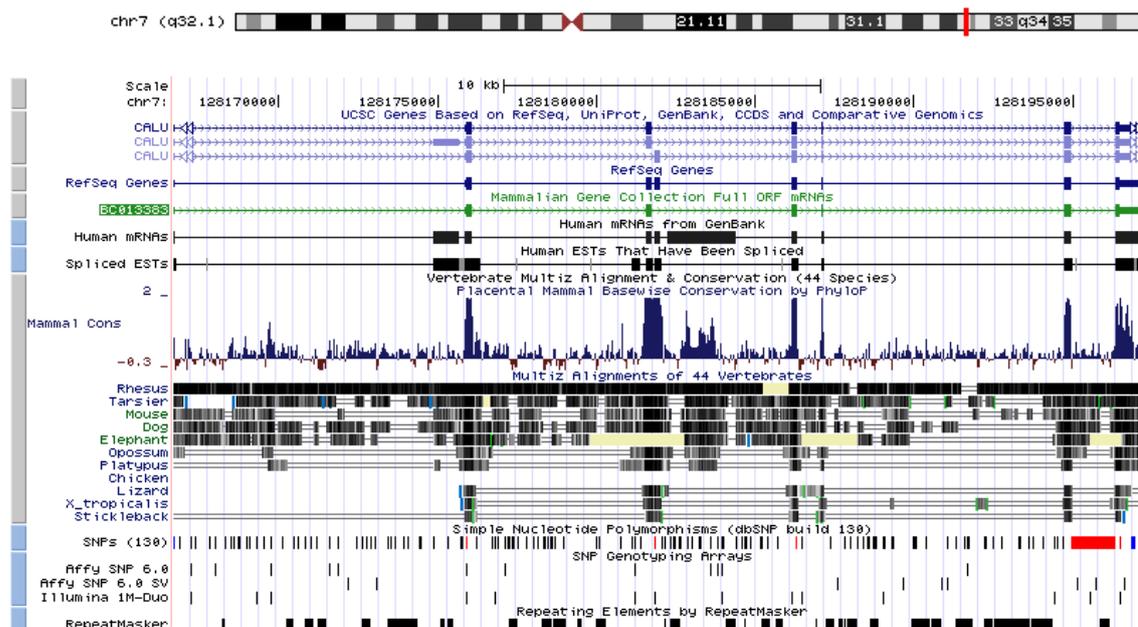
**Mecanismos Fisiopatológicos del Remodelado y la Calcificación Arterial en la Cardiopatía Isquémica**

						<i>associated protein beta 1</i>
<i>Col1a1</i>	<i>Mus musculus</i>	(NM_007742)	1/2	Mm_Col1_1_SG	QT00162204	Colágeno tipo I cadena $\alpha$ 1 (Col1a1)
<i>Plod1</i>	<i>Mus musculus</i>	(NM_011122)	10/11	Mm_Plod1_1_SG	QT00117593	Prolil-lisil oxidasa (Plod1)
<i>Lox</i>	<i>Mus musculus</i>	(NM_010728, NM_001286182)	NM_001286181, 3/4	Mm_Lox_1_SG	QT00098028	Lisil oxidasa (Lox)
<i>Loxl1</i>	<i>Mus musculus</i>	(NM_010729)	n/a	Mm_Loxl_1_SG	QT00288736	Lisil oxidasa like-1 (Loxl1)

\* Número de exones de acuerdo con Ensembl Transcript

### ANEXO III. SECUENCIA DEL CLON MGC CLONE BC013383.2 Y ALINEAMIENTO CON DNA GENÓMICO

BC013383 – Calumenina *Homo sapiens*, mRNA (cDNA clone MGC:2001 IMAGE:3507961), secuencia de DNA codificante (cds) completa. Referencia de la secuencia: NM\_001219.3



#### Alineamiento de BC013383 y el chr7:128166683-128197421 (cDNA BC013383)

Las regiones combinadas de las regiones codificantes del cDNA y secuencias genómicas aparecen en azul y mayúscula. Las regiones UTR del cDNA y DNA genómico aparecen en rojo y mayúsculas. En azul celeste (codificante) o naranja (UTR) se indican las bases de los límites de unión entre ambas secuencias (frecuentemente sitios de *splicing*)

```

GCGGCCACGG CATCTGTGC TGTGGGGGCT ACGAGGAAAG ATCTAATTAT 50
CATGGACCTG CGACAGTTC TTATGTGCCT GTCCTGTGC ACAGCCTTTG 100
CCTTGAGCAA ACCCACAGAA AAGAAGGACC GTGTACATCA TGAGCCTCAG 150
CTCAGTGACA AGGTCACAA TGATGCTCAG AGTTTGTATT ATGACCATGA 200
TGCCTTCTTG GGTGCTGAAG AAGCAAAGAC CTTTGATCAG CTGACACCAG 250
AAGAGAGCAA GGAAAGGCTT GAAAGATTG TAAGTAAAT AGATGGCGAC 300
AAGGACGGGT TTGTCCTGT GGATGAGCTC AAAGACTGGA TTAATTTGC 350
ACAAAAGCGC TGGATTTACG AGGATGTAGA GCGACAGTGG AAGGGGCATG 400

```

**Mecanismos Fisiopatológicos del Remodelado y la Calcificación Arterial en la Cardiopatía Isquémica**

ACCTCAATGA	GGACGGCCTC	GTTTCCTGGG	AGGAGTATAA	AAATGCCACC	450
TACGGCTACG	TTTTAGATGA	TCCAGATCCT	GATGATGGAT	TTAACTATAA	500
ACAGATGATG	GTTAGAGATG	AGCGGAGGTT	TAAAATGGCA	GACAAGGATG	550
GAGACCTCAT	TGCCACCAAG	GAGGAGTTCA	CAGCTTTTCT	GCACCCTGAG	600
GAGTATGACT	ACATGAAAGA	TATAGTAGTA	CAGGAAACAA	TGGAAGATAT	650
AGATAAGAAT	GCTGATGGTT	TCATTGATCT	AGAAGAGTAT	ATTGGTGACA	700
TGTACAGCCA	TGATGGGAAT	ACTGATGAGC	CAGAATGGGT	AAAGACAGAG	750
CGAGAGCAGT	TTGTTGAGTT	TCGGGATAAG	AACCGTGATG	GGAAGATGGA	800
CAAGGAAGAG	ACCAAAGACT	GGATCCTTCC	CTCAGACTAT	GATCATGCAG	850
AGGCAGAAGC	CAGGCACCTG	GTCTATGAAT	CAGACCAAAA	CAAGGATGGC	900
AAGCTTACCA	AGGAGGAGAT	CGTTGACAAG	TATGACTTAT	TTGTTGGCAG	950
CCAGGCCACA	GATTTTGGGG	AGGCCTTAGT	ACGGCATGAT	GAGTTCTGAG	1000
CTACGGAGGA	ACCCTCATTT	CCTCAAAAGT	AATTTATTTT	TACAGCTTCT	1050
GGTTTCACAT	GAAATTGTTT	GCGCTACTGA	GACTGTTACT	ACAAACTTTT	1100
TAAGACATGA	AAAGGCGTAA	TGAAAACCAT	CCCGTCCCCA	TTCCTCCTCC	1150
TCTCTGAGGG	ACTGGAGGGA	AGCCGTGCTT	CTGAGGAACA	ACTCTAATTA	1200
GTACACTTGT	GTTTGTAGAT	TTACACTTTG	TATTATGTAT	TAACATGGCG	1250
TGTTTATTTT	TGTATTTTTC	TCTGGTTGGG	AGTATGATAT	GAAGGATCAA	1300
GATCCTCAAC	TCACACATGT	AGACAAACAT	TAGCTCTTTA	CTCTTTCTCA	1350
ACCCCTTTTA	TGATTTTAAT	AATTCTCACT	TAACTAATTT	TGTAAGCCTG	1400
AGATCAATAA	GAAATGTTCA	GGAGAGAGGA	AAGAAAAAAA	ATATATGCTC	1450
CACAATTTAT	ATTTAGAGAG	AGAACACTTA	GTCTTGCTTG	TCAAAAAGTC	1500
CAACATTTCA	TAGGTAGTAG	GGGCCACATA	TTACATTCAG	TTGCTATAGG	1550
TCCAGCAACT	GAACCTGCCA	TTACCTGGGC	AAGGAAAGAT	CCCTTTGCTC	1600
TAGGAAAGCT	TGGCCCAAT	TGATTTTCTT	CTTTTTCCCC	CTGTAGGACT	1650
GACTGTTGGC	TAATTTTGTC	AAGCACAGCT	GTGGTGGGAA	GAGTTAGGGC	1700
CAGTGTCTTG	AAAATCAATC	AAGTAGTGAA	TGTGATCTCT	TTGCAGAGCT	1750
ATAGATAGAA	ACAGCTGGAA	AACTAAAGGA	AAAATACAAG	TGTTTTCGGG	1800
GCATACATTT	TTTTTCTGGG	TGTGCATCTG	TTGAAATGCT	CAAGACTTAA	1850
TTATTTGCCT	TTTGAAATCA	CTGTAAATGC	CCCCATCCGG	TTCTCTTCT	1900
TCCCAGGTGT	GCCAAGGAAT	TAATCTTGGT	TTCACTACAA	TTAAAATTCA	1950
CTCCTTTCCA	ATcaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2000
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa			

---

**ANEXO IV. SECUENCIA FASTA DEL mRNA CODIFICANTE DE CALUMENINA**

Se incluyen exones 3', 5'y CDS (todos en mayúsculas) e intrones (minúsculas)

```

>hg18_mgcGenes_BC013383_0    range=chr7:128166683-
128166722      5'pad=0      3'pad=0      strand=+
repeatMasking=none

GCGGCCACGGCATCCTGTGCTGTGGGGGCTACGAGGAAAG

>hg18_mgcGenes_BC013383_1    range=chr7:128166723-
128175862      5'pad=0      3'pad=0      strand=+
repeatMasking=none

gtaagtacggtgatgccagccccttcaccactgcctcatctttattcgc
tttctttctgtccccggtcttgttcttggcgcggcaggggactgcctcac
tcggtgccgctgtctctgctggcgccccgggtcccaggcctgatgctgctg
gagatcccgggaccctctgtgtgcagcctgggatggaggccgcccgcctg
cttaccgcgctctggaagggggctggtccggtggaactctgtcccgt
tgggtactgttctgtgcctggttctgctgctcctggctcctccatctctag
gtcacgccactcaccgagtctctggcaccagaggggtcattttttgcctcc
ggaaggtcggagggcatttggatagtgatttgaagagttccttgccgc
ctccactcaccatcctgcttgtatctgccagctccgcccgaaggccacat
ccccacagtaggggtgcatctgccaaggctcgtgttcactcacctaaagggt
gcagaaacaaggggggagagaacgagtgacgacactaggtgatatctatg
attttaaagaaaagctgaatgttttagagcttccatatttggctacgtact
tcagttagcgcgacggaaaatagtttttaaagctttattggggaattaattt
ttgttacgtttttgttgccttctagccccatatacctactgatttttagca
tgctgcggtcagaaataaacttaattccctatagctgccgcgattaagcg
tagagtggcttgagtttcaaagctgcttttgcacaaaggccaagctc
cgtgggtctcctgctaaaacttttgagcctgtgatctgaattcctaagtg
tataaaattctagaatagtgctcttcgagaattgagttgcttcatcttct
gggtgtggaccatgaagtcaacgtaataatggaataagggtggcttct
agttgtttttgttctagtagcttattcagcttggaggcagagaaccttg
gaatctctgttaaattagctctgccatagaatggaacttgacacaagacaa
atgcaagtttgacctcactcagtagatttaattaaccaaataccaaacga
cagtaatcactgaagaatttatatagttataatccaaatgagggaccagat
ataacctctaagttgtatttgtcaagaaaatgagtttgccaagacctaat
ctgaggttttactgtgattgggggggtgggggggttccaataggattcctt
tgagaatcacaagtaggaaagccatgagctcacaaaaatgtattgagtat
gcctgagtgaaatagtagtcaatatagctttgaaaccaactcattgtcact
ctcaatgtaatcattgtttgttttcatcctcagtgatgtgtcaagaag

```

tacttattgatagcacttaatatccattagagcagttattgggatctatat  
attggtgttatttttttaaattttattttatttttagagttgaggggtctcagt  
atgttgaccaggtggagccttgaactcccatgctcaagcagtcctcctgc  
ctcagcctcccaagtagctgagactagaggtatataacaccacaccctag  
tacattggtgttaacacagattttctgtaacgtaggtataaccagggatat  
tgaaaggacagaggtgtagccaaggatagccactggaaatgctagctagg  
ccacaaggccctagattctcactctctgaactcttaagtatggatggtgc  
tgatgcagtaattttatgtattagagtttaagacagctgaaataacactttt  
gcctgttcttggtgattgccagatccagtaaacggaattggaagttgga  
gaacacaggcagggcaggaaccacattgctgccaagtaccgccaattaat  
tcagtaagatgtattaatccagtaaaatgtattgggtatcaaaaaagtgca  
agacaatgtattagggacaatataggggtaataattttgtattagaatgat  
atgtagacattcttccagaaatgtcgattctaaaggggagctaaggagac  
aacttaaggtaacctatggtcattgtttttgagtgggttcagacgagtttt  
atagaagtttagattggatcataccctttttgtccaaaagagaaaaaga  
taacagatcacttccagctagagtgatcatagtaggtaggtcttctagga  
tcttaaattttatattatagacatctggcactgaaggaagtttgagctaaaa  
taactaccaatttctcaacagtgctcacgcatgttacacatgcacagcaaa  
attacaactagaaaccaaggctcctatccctacatttcaaatagcatttc  
tctcacaattgattatgtattaaggcttgctcaacgaaaaggaaacttttt  
tctctcagaatttctagaacttttttctttaaaaagttttttattctgta  
gccagaaaaatttaaagtttgctgctgggttgctttgggtatagaactaat  
gaagcttgagtaatagtttcagacattctcagggtttttcttctgcagcc  
agattttacacttctattatctcagctgtcttataaatgtattccctcca

tcacacaatataattagaatgtattgatgaacagatgtaacttcatcact  
agagagacgttaaataaattatgtgttggtatcatgactttttatcaaadc  
atgaaggatgccatcactttttatgtgatagtcattgggtatagtaactaa  
gtttgtaagtaaagaatgtcagatagataacaagataacttcattttcga  
gatctcataacctgggccttagtatagttaaattgctatcagctctgttcc  
ctgtaatctccaattgaagtagacagttaaacaatgagatcctgcttttg  
ctgctgttatggagaaataaatgccttttctggtgaatatccatccagctc  
agagaactggaattttactaccacaccatttctcccaattgttaacatt  
gagcaatgggtctttgggtcaaccataataactggttgatcactcagtggt  
aacgttcttgtgaagttgaatttaaacatctaaatttccctgaaacaatt  
taagtattctgtgaccaatggcactttacccaaattgaaagtttgggcca  
tgtattgctcgcaataactgggtccaatggatacactatggacactaaggac  
aaaaacttcttgaaagctctaagttcttacctgaagggtggggtagga  
gaagtgataagaatttagagcttttaaggacatttttggtatggatcgaag  
aaaccaatttctaagactcattattataaaatcacacttaaccagtta  
ggcttttctctttataaattactggaacgattcatgaaaacaactttata  
gaagaccattattgggtgacataactaactacaaaaggatgatagctact  
ggatataattttctgttctaattcttttggtttgtgtctaactgctgtcca  
ataaaaatataatacaagccacatatgtaatttttaaattttcaggtgaaa  
atctaaaacaggtgaaagtaatttttaataatgtttaatctaatacatata  
aaataccattctttcaatatgaaatgtaacacttataccaatcgcaattc  
acactagccacatttcaagtgcttagtagtcacatgtggctagtggtctac  
tgtactgggcagtcagggcctagattttttttttttcccaagaaaaaat  
attagatgttacccttctggtgaagaggacagaatttttagagagagaaac

tcatttgagaaatgggaggtgggaaattcagttttcacaaccattgggt  
tactttctagatcacatgataaaagctcacacagctaagtcttttgttta  
tgtgtatcatatttttcctaataattatgttgtccattatgtccatagtat  
atccattggaccagtattgtgatcagtatgtatggcccaatggatacaca  
aagatctttccagctggaagtgatctgtacctattcctctaaactttttt  
tttactttttggacaaaagtatccaatttaaactttttttttttctttttt  
tttttttgagacagggctctgttccctcaccaaggctggagtgtgggtggc  
atgatcatgactcactgtaacctcgtgtctccggggctcaggcgatcctc  
ccacttcagcttccccggtagctgggactatagctgcgccaccacacca  
gctaattttttgtatttttgggtggagatgggattgcctaggctggctctg  
aacaccagcattccatccgcttggccctcaaagtgctgggattacagg  
cttgagccactgctgctggcccagtctaaacttttataaagtgttgaagt  
gggtgaggaaaatgagaagggccattaactttgtatcattttggtttcaat  
ttggttgaaaagacaaagatgcttcagaaatgaagtgtactggctggctca  
tggttagctcacacctgtaatcccgacactttgggaggccgagacgggaga  
atcacttgaggtcaggagtttgagaccaacctggacaacatgggtgaaacc  
ctgtatctactaaaaatacaaaaattattcgggcgtggtagaccatgcct  
gtaatcccagctattgaggaggctgaggcaggagaatcacttgaaccag  
gaggtggaggttgcagtgagccaagatcacaccactgcactccatcctgg  
gcaacagagacagactcagctctcaacaaaagaaaacgaagtgcactaaag  
tagattttcaaagctgtgtatgaagttatttttactgttccctttcaca  
tcttcccacgtaagatatcctttgtcttagatgtcctttgtttctgcttg  
aacatacatgctccatacaaaaaccataggttttagataaatctagta  
cagtttttggtatggatgggtgtttttgttttttagtgtctatattcataa

aacaagagggctttgttaaagtttctaataagccaggagttgttatatag  
tgggcacaaaggacgttttgtttttttttaagtagaacttctttaaagtg  
cagatttttcattcctcctgcagaaagataaagaagtaagatggacca  
ttggctttgtccatctgggtccttgatgaccgttgtaggcagtttcatca  
atagtaaggaagccaggtttcagggtagcattggacagtgaggaagcaga  
ggcagcagggtagaaaactgtgggtgagggaaagggaggagcaagcatgaa  
ggaacagcacagctctgggaaagactgtgggtagtggagacctgagaagca  
ctgattgacagaatggaggagcctgtttaagggatgagattgaaagtta  
ttcaggagaggggaaaggaaggagaaatgggtgagtgataaagctaaatca  
cttggcttctactctttggaattctggatccttgatcaagatattaag  
cctgaaacataaatgtagttttccctctaaatcacagagtaaaccaatct  
attacatttctgtatgctacatgtctcaaaacttggtagcagtatcctttc  
caggaccagattatgtagagtgcataagtatttattcatattgtaatat  
ttggggttggaagaattgttagggattatgctatattttattttgaga  
atgtaatcatttgtaaaattttcctaaagataaagtcccttaggcataa  
ggaaaatcctttgttgcagtgactcttgattttacttgattctgcaagcc  
tctgtcactatacatattgttgggatatatcccaaacatcaacaacata  
taattctgtttttgtttccaaagtttgtttatctaaagaattatttgt  
ttataggctgggtatgggtggcttacgactgtaatcccagcactttgggag  
gccagggtggaggatcgcttgagaccagctctgggcaacatagtgagact  
ctacaacatttttttttttaatttgctgtgcatgggtggtacacacttg  
tattcccagctacttgggaggctgaagtgggaggatggctctgagcccag  
aggaccagactgcagtgagctatcatcacaccactatatctagcctgggt  
gacagagtaagaccctgtctcaaaaaagaattgtttatagtttgagata

gaagtttcattttgcccctgaagtaaaggcatactcactttaaagtgtgtat  
ttatagagccgctaaatctcggattttctgtttactctttaaactgatttg  
attgatcagttgaattattggaggggtcagccagagtggtgttcacccaga  
gcaatattttacaagtgggtgcacacagaaagctaataaacatgagagtg  
gctgttcatacaaattagacagtacagcaggatacagtattaaagttcac  
tttcacaccaatcttaccagcccaccccattcctgtctcttctcccatga  
accttgaggttaccactgtttacacatgggtatttgtctttgcacacat  
ttatgtgcatgttataattttatacaaaaataaaaacaagctggggagattgt  
ttaattttgttttgctttttatgtaaagagatcttgacggtgttttgaa  
ccttgctttttttgcttacttgacatacttgggtgaattttccatttcac  
tgcagatagatgcatctcgttcttttttttttttttacattcttttttttg  
aggaagggctctcgtctgtcactgaagtgcagtggtgagatctcagctca  
ctgcagcctctgcctcccgggttcagtaacttctcgtgcctcagcctcct  
gagtagctgggactacaggcgtgtgccaccacaccagctaagttttgta  
tttttagtagagacagggtttcaccgtatttcccagggtggtctcgaact  
cctgacctcaagtgatcctcccgcctcggcctcccaaagtgtctgggatta  
caggcatgagccaccatgctgggtgcttttttttatttttttttgagatag  
gatctctgtcaccacagctggagtgagtggtacaatctcagctaactgc  
aacctccacctgggtgggttcaagctatcctcccacctcagcctcctgagt  
agctgagactacaggtgtatgccaccatgccagctaatttttgatattt  
tagtagagacagtgtttcgctatcaccaggcttgtcttaaactcccgga  
tgcaagtgatccgctgcattagcctcccaaagtcttgggattacaggcg  
tgaaccaccacccccggcctcatgtcattcttttttttttttttttttt  
ttttgagacggagtctcactctgtagcccaggctggagtgtagaggtgct

atctcggctcactgcaagctctgcctcctggggttcacgccattctcctgc  
cacagcctcccaagtagctgggactacaggcaccaccaccacgcccggc  
taattttttgtattttagtagagacggggttttaccgtgttagccagga  
tgatctcgatctcctgaccttgtgatccaccgcctcggcctcccagtg  
gctgggattacaagcatgagccactgcgcccggccattctttttaacct  
ttgtgtatttttccataatcgagatttaataatattttaccaattctctgt  
ttttatttgttttccgatttttttaatacattgtgaactgtcatcattgaac  
atcttaataacaagtatctttgtctgtaaagtgtgggtattttgatgggatt  
gaatgaaacaatggtgagaaacatagccaagttctaacttgataggaat  
agagtaataagtaaccatcttctaccatttctctatgggtttcatggct  
tgctttcacattgcttcttctgatggattttcctaagtcttaaccttcac  
gtcatcagtaacagtaacttatttgagactggggcacttgggaatgactg  
cccccaacccccgccccattatctccttaggtacttttctgtttgtct  
tactgtgttgcgtatttactctagaacactttccactctctactgatat  
gtcctcctctgccatttcaggacctcccacctccccactgagctgcct  
tcccagtgatgaaagaaaaatgtaaagcctgaaaaccttcttcttga  
tttttaatttttttttttccctctaagaccttaaccactctggatagat  
cacgggtatcagtagagtggtgctaaacagatgtgtactctgcagcttct  
ttgcaggttttttgtcacatttttcagtcaagtgttccagctttgtgctt  
gttcattagagtcacctgtgactacagagattctgaaagtttgaatcagg  
gcctgggaatctgtactttgaacagtaactacaggtggtatttatgcctag  
gcaagtatgggaaacaactgtgcagaaggataaagacgttcttatctatg  
actagaccatctgaatgatttggccttgaagggtgactcaagggtgagcc  
tggatgttggagacttgggtctatagaccaaggaagctgccaagtatctt

gctgggtcctaattctcatgaacatcagaatcacctgaaaaacattttaaag  
ctacgaatgtctgaattcagcttcagagactctaaatcaataggagaaac  
ttaaagcttcctagatgattctaataaccagccatgtttgaagaccagac  
caccaatgCGTACAAGAAGTAAAGGATTTGGAGTCAACATTTAAACCTTG  
gttctttcacttttaattcttatgaacttgggcaaaaggattaaaattct  
actttggatcttttgaaagaaaacagaaagtggacattttaactataag  
tttcttatcagcctacaatcagatgaaggaaactggtaaaaatttctcac  
tgtaataattgaagagtctgatattccaccatacttattttatggatgaa  
gtaatatattgggataataaaaagacttgcatagatatgtatatcaaatt  
aatagtttaactcggatgtgagcttttaatttcttatttagttattaagc  
atactgCCTCCTGAATTAAGTCTTTTCATTTTCTTCAAG

>hg18\_mgcGenes\_BC013383\_2 range=chr7:128175863-  
128175873 5'pad=0 3'pad=0 strand=+  
repeatMasking=none

ATCTAATTATC

>hg18\_mgcGenes\_BC013383\_3 range=chr7:128175874-  
128176094 5'pad=0 3'pad=0 strand=+  
repeatMasking=none

ATGGACCTGCGACAGTTTCTTATGTGCCTGTCCCTGTGCACAGCCTTTGC  
CTTGAGCAAACCCACAGAAAAGAAGGACCGTGTACATCATGAGCCTCAGC

TCAGTGACAAGGTTCAACAATGATGCTCAGAGTTTTGATTATGACCATGAT  
GCCTTCTTGGGTGCTGAAGAAGCAAAGACCTTTGATCAGCTGACACCAGA  
AGAGAGCAAGGAAAGGCTTGG

>hg18\_mgcGenes\_BC013383\_4 range=chr7:128176095-  
128181551 5'pad=0 3'pad=0 strand=+  
repeatMasking=none

gtaaggtaccacctctcaggggtctagtgtgggtaatgacattctttata  
aaggctaattcttttcttttctggctcagttatgagtaaagttatattga  
actattaatacatcttctgaaagctaaccatggaattactacctctaaaa  
tttcattaaatgcctgatttcatacatttttaattgaataacagttggtg  
cctcattctacaagcatcatttttgcataaaaagtaccaagtactgcaag  
acccaacttgaactgcattatcttgctaccagaagaacatagcatggggg  
gatttctcatctcttctcatctctactgcttttaatttttaaaaactatc  
tgtgccctactgacctggcacaagccaagtctttgatgggctaataaacg  
gcacattggatccctataaagtttatgatttcccagggtgtccttcacc  
tctttattttcatctcagatatttgtttaattaaaaaacaaaaatcaaa  
ccaactttgtcttttagaaaattgtaacttaatgtctgagtatgagttac  
tgtttcagtaacagcagggccatagtcagggtctttggctctctcggtag  
acatcttttgtcctgaaaaatggatttggtagaatcccagttgattattt  
ctaattggggatctgagaatgtcttttttggctccttcaaagccttcctt  
ttgaagaaaatgcaggtcaattttgtaaaaatattcttctcagtgagcac  
tgttgggtgcaacttctgattgtattcaagagatttgtgtggaaagtgt

gccacacatagcaatctctaaaaatattttgccttgatgggtagcatttt  
gatcataagacggttaggatttgctttggaagatgctgcagaatagatg  
tattttttcattgggttatctactgactgaaggggtacaatgttttat  
tcaacattgacagaaataataaagatattttgctatgtagaatgagcact  
gtcacatagcatttgaaagtagatagatatgcatcacagagtttagtttc  
tattaggttgctttcctttgggagaccatcctcactttcagttttaatct  
aataactgtactaacattccaggctgaaaatagaaatgcagatcaggtac  
ggtggctcacgctgtaatcccagcacttgggaggctgaggcggttga  
tcacgaggtcaggagatcgagaccatcctggctaacactgtgaaaccca  
tctctactaaaaatacaaaaaaattagccggcggtggcgctgcct  
gtagtcccagctacttgggaggctgaggcaggagaatggcgtgaacccg  
gaggtggagctttagtgagccgagatcacgccactgcactccagcctg  
gcaacagagccatctcaaaaaaaaaaaaaaaaaaagaaaatagaaatgc  
agaggtattctaagtcttcatgtcatgccattaatattgtgcacgtcc  
aacccacattttgggtctgcacatatttttcacagaattaactctaaaat  
aatgaaaggcccttaggtttggtatcatttagggtagatggtactataat  
gaggatgttctggctccttgcaggtagggagaaagctctgctggcacttt  
tcagttgaaagtattcctttttgtgatcagtggtatattaaaagtttgc  
catatgcagattctgtatttgattagaataagatgataaaatcatgttt  
ttatggaatgatgaatagactgtttgcttctcccaaattttggttgtaa  
tgacaaatatccctactttatacagtaacatacggttgggagcaagaatc  
ccacatgaaacttttaaaaaacttatttactgtggcatttcaaacattg  
ttttgggtgggtaatgtataccagctgggaacaacaggttccctctttt  
tccatctgtctatatatggcacataattattaagagataagtcattgttcat

gccttttagttgcaaaaattcacgactttttgaaatctttaataataatag  
ctaaaagaacacaggaagcatttttaaaacaattcaatatacaagtttcag  
gtattttttcttattaagaatggttgacaaataggcgattttatgtatcct  
taaaatgaagatttggtttgaggtagtggttcttaataataaaaaagttc  
tctggctgggcgcaatggctcatgcctgtaatcccagcactttgggaggc  
cgaggcaggcagtttatgaggtcaagagatcaagaccatcctggccaata  
tggtgaaatcccatctctactaaaaatacaaacattagctgggcctggtg  
gcgctgctgtagtcccagctacttgggaggctgaggcaggagaattgc  
ttgaacctgggaggcagaggttgagtgagccaagatcgaccactgcac  
tccagcctggcaacaagtgcagactccgtctcaaaaaaaaaaaaaaaaaaa  
attccttgatataatttactatagaagtgaactagagcagttcattatcct  
tttgggatcacaggccagacccttgggagctaatgaaagctaagga  
cttttctcagaaaagtgcacacttacatatacaattttgggctaggcgc  
aatggctcatggctgtaatcccagcactttgagaggctgaagcaggagga  
ttgcttgagctcaggagttcgagaccagcctgggcaatatagggagacc  
tctctctacaacaaattaaaaaatcagctaggcatggtggcatgtgcctg  
tagtcccagctactaaggaggttgagatgagaggatcccttcagccggga  
agggcaaggctacagtgagctgtaattgtaccactgcctccagcctggg  
tgacagagcaagaccctatctcaaaaaataataaacaacaaataagaaaa  
ttttgcacactgaaaatttcaggaatattagtcacccttctggagccat  
ttattgatccaaattcttaacaactgaagggtttgctttatgctccttg  
aaatgtagaggtatgtgctacctcctaaaagaaataacatgaggtgcact  
aatgcactgtgtctgtcctagaataaaggcttatttagtggcgctccatag  
ggttctccctgtcacaggactatgacaccattagcttcataaatttaca

caggcatttaaagatgataatntagagccttatgcctaaaataggatgtg  
cccacttccagtgtacttacacaactgcctgcaggcttgggtgctcagcaa  
gataagaatggcttttacatcttcagaggcttgtaaaaaaaaaatacac  
acacacacacaccataccatgatgttgccacaaagtcaaaaatatttact  
atctgtcccttttttaaaaagaagtttgcccttgtaaaactatatttctgt  
ttaagtaaaaaacaataaattttttcttaagtttgccaaccctaggtt  
aaaccatttgagttggttgacattgaatagaatgctcttcagtcaacttaa  
ttaagaaaagcccaccttgacagtcataatgtcttttttatctgggcca  
tccttctcttcaggctatttataatagtttaaaaataccttttgggggta  
ggaggggttctgggtgccccttttcttgccctttatttctgaaactgtac  
agtggcactattggtagccagttaccatttgagcacaaaactgcattccatt  
ataaataatgtagaacttttcaatattggtatagcttcatctgtgaatag  
tgtaaaattctacaggactaaagttacaacaacaaaaattgtccttatg  
tctatgtagatagaagaggatatttaagagataactactttttttctga  
gacgaagtcttgctctgtcacctgggctggagtgacagtgccgcatctca  
actcattgcaaccgcccctcccagggttcaagagattctcctgcctcagc  
ctcctgaatagctgagattacaggcatgcccaccatgcccggctaattt  
ttgtgttttttagtagagactgggtttcaccatggtggccaggctgggtctc  
gaattcctcacctcccggcagggtgatctgcccgcctcggcctcccaaagt  
gctgagattataggcgtgagccaccgtaccaggccagagataacttctta  
ctggtttacctttcctgttaacatttttagagcaagattacacattctctg  
aaggaaaatgctagttacttacaggatttaagtaaatagttgtatctaaca  
cctgatctgtatcaaaaatgagtcctcttttcttagagtcactagtagtctt  
caattctgatcactttcctatggttgattcatgaaatgaacacaagctgg

ggaaagacattatgttgcctaccaagtgacaatcttttcaatcctgcaaata  
atagagcataggactataccaagatttctcttctgttggaagttttgact  
tcaacttcatattccaaactgggctgcttacttgggtgacattacatagg  
atgactttgcccctatagttaagtgattgcacctttaaacagaagttttc  
atatcatggacataattttaaatccataagatgacagatctggaagaaag  
acacttataaagcttcataaagccactgattcttttagctttgtggttttg  
ctttataatctacataactaaccctttcagcttattaacattctttataatc  
agatatacattcttaccacatcatttctcagagttctctgttttcatgt  
aaaaatccaattcaacacagtatttaaaagctgctagccatttttttagac  
aagcatcttctgtctttttatctgttttttaaaaataatcttgccctga  
gatataaatgatcccagaacttttctgatatctttgtatttttatcaaaa  
gtgttactttttctaaaatcagctaaatttttgaagtctgatgtaactat  
tttgaatttttagaaaaccatgattatttaccagaattggagtttctct  
tctgtaagcaataaagaaaaataaagttcagccacatcttcgctagagaa  
aataaaaatgaaaacaaggaaaaacaaagttttacatggttggttgatgca  
aagagtggagaacttggataggaatggatattcactcctgaattctaacc  
ataggctgaaatctacctccaaagagataggctgagtttgcttttgatc  
caagtgcaccagccatgactgtgttgaccttattcagtggttattaca  
gaccagtaatggaccatttttttcagttgctggcctggcagttttgtttt  
ggagacaattttttatttctgtgacattagccctgggacacacactggcta  
agtccagagttctgtgtcttttttaaccttttgctggatttctctgcattt  
tctacag

## Mecanismos Fisiopatológicos del Remodelado y la Calcificación Arterial en la Cardiopatía Isquémica

---

>hg18\_mgcGenes\_BC013383\_5 range=chr7:128181552-128181745 5'pad=0 3'pad=0 strand=+ repeatMasking=none

AAAGATTGTAAGTAAAATAGATGGCGACAAGGACGGGTTTGTCACTGTGG  
ATGAGCTCAAAGACTGGATTAAATTTGCACAAAAGCGCTGGATTTACGAG  
GATGTAGAGCGACAGTGGAAGGGGCATGACCTCAATGAGGACGGCCTCGT  
TTCCTGGGAGGAGTATAAAAATGCCACCTACGGCTACGTTTTAG

>hg18\_mgcGenes\_BC013383\_6 range=chr7:128181746-128186160 5'pad=0 3'pad=0 strand=+ repeatMasking=none

gtaggtccctactgtctgggggaaaaagccttgtggagctggcaccttga  
aacgtaactgttttgtcttgtagaatgattgtagataaaatagacgcgga  
taaagatgggtttgtgacggagggggagctgaaatcctggattaagcacg  
cccagaagaatacatatatgacaatgttgaaaaccaatggcaggagttt  
gatatgaatcaagacggcttaatctcctgggatgagtacagaaacgtgac  
ttatggcacttacctgggtaaggggcaagatgtcagcctggcagggaccg  
tggctcttgagtcaaagaaacaaatgggtcacacagtaaaggaaaggaagc  
ttatcttaaatagttcaattcagtgctaagctgattccctttattaattt  
taaatttgtatattatgtatttttaaatttgtttaatttttgttttctga  
agtctggaagtctggtatcttctacattttttagcattttacatatatttt  
accattttttctttatgtcatccctcatagagacaatttttggagtagat

ttcattttaaagaatacattgggctgggtgccgatagctcacgcctataa  
gcactttgggatgctgaggcaggaggattgcctgggcccaggagtttgag  
accaatctgggcaacatagggacaccctgtctctaccaaaaaaaaaaaaa  
aaaatttaaattagccaagcatgggtggcacacacctgtcctagatactca  
ggaggctaaggtgggaggatcacttaagcccaggaggttgaggcagctgc  
gagccatgattgcactgctgcacaccagccttggggacagagcgagctct  
gtccaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagaggctatgaggctacatactt  
ccaacagtgc aaagcaaggggctttgagatgtttcttgacatgggtccag  
taaagtgttgacctaataattcaaaccaattagatttctttataactgg  
tgagaagtcttaataaaatagttttccttaataaaatctaactatctcag  
tatgtctgcttactgaagtttggaaatgaaaatctccatttgttttctc  
tggcacatgagtttatcagcctgctttgcaagtgctttaaggcaaataaa  
tgtaatttgattgctttttgttgatttgatagcttgatgcttgggcca  
cctgttagtaatctttctttacttgtaacacttgctgctgctgaatact  
aggcagtgagtcttattgagttgatgatccaggggtgtttttatgtgaa  
attcctctgttgtacatggttacagtttaagacaagaattgtattaatat  
aaatgaatataaatggtactttctccattttaatcctggaaattaggcaa  
ccttctgggttaaagcaagcgttctccgccactgactaacagtgagtgta  
taatggatctgtttccccacagatagccagctgtctgcattaattacagg  
actgcatgcatttctggtgaagagacttttatttctgtgtcaggcttgtt  
ctcattcctaagactaaagtggcactctctctcaatgcttgacacttagc  
caagaaccaacatatccttcaccaattaagaacacatgtattaaacag  
tcagcacagatggagaggcatcctgcttcttgctctggctgagaccaac  
accttctgattttatgtgaaattaatgataaatacaagcaaagagtagg



## Mecanismos Fisiopatológicos del Remodelado y la Calcificación Arterial en la Cardiopatía Isquémica

```
gccttaataccaatagtgaagcataacagtgagttacatagttcaggagc
cagagttccatgtgaacttggagctgactctgagatctgatgcctggagc
tgtagcccaaaactaaatgtctttgtactgctgcagttttacctgtgtca
tcaattatcttctccttgcatggttttatctttattggaaattgatttcc
caccacacacatcttcatgttttctgaaagtcttttaagatttgacctaa
atctttgttttctag
```

```
>hg18_mgcGenes_BC013383_7    range=chr7:128186161-
128186327      5'pad=0      3'pad=0      strand=+
repeatMasking=none
```

```
ATGATCCAGATCCTGATGATGGATTTAACTATAAACAGATGATGGTTAGA
GATGAGCGGAGGTTTAAAATGGCAGACAAGGATGGAGACCTCATTGCCAC
CAAGGAGGAGTTCACAGCTTTCCTGCACCCTGAGGAGTATGACTACATGA
AAGATATAGTAGTACAG
```

```
>hg18_mgcGenes_BC013383_8    range=chr7:128186328-
128187081      5'pad=0      3'pad=0      strand=+
repeatMasking=none
```

```
gtgggtgagatgaaggattctgaacagggactcagtttctctttttgtgg
cttattctgtctttccccttttagccttatatagcatatcttatatatata
tatgctatatagcatatcactgtatatgctatataagtattggccagatt
cagaatccaaggtctgtcactgtttttctgtgaccttgatcaaggtgcct
```

```
tgggcattctgtttagtatgataataccttctgtcatataatgtatctttg
ccatttcattggtagcttcatattgtaagaatggggggaaatcccattat
ttaaataatcccatagaccaatagtcagacattgagtaataacagtgatac
taaagaactctcacagaaggcagttactgacaacatagactatctatagc
taaacacataatcactggtcacatctcctgttagtgtagcttttagcatga
ctaaggctaccaggtagatcatcatgggcttgatgggatagtttgctatt
aagcagtgctcagtgttctgtcaggaagactcagttatcttagattgaagc
ataggaaattgctcatgttttaccatttcttggctagaaatgggttttaac
catacagacacacatgcatacatacatacatacatacatacattgtacaag
tgtgtttaatgaataataaatgtttacctaactagatactttactttct
tctggcaaattcagagaccaacttaatagtctcttcttattctttcctgt
ttag
```

```
>hg18_mgcGenes_BC013383_9    range=chr7:128187082-
128187142      5'pad=0      3'pad=0      strand=+
repeatMasking=none
```

```
GAAACAATGGAAGATATAGATAAGAATGCTGATGGTTTCATTGATCTAGA
AGAGTATATTG
```

```
>hg18_mgcGenes_BC013383_10   range=chr7:128187143-
128194745      5'pad=0      3'pad=0      strand=+
repeatMasking=none
```

gtaagtctctgcttttagtggttttcttagaaaagctgagaagctttgaa  
aggtgtatgtgctggctgggcacagtggtcatgcctgtaatcccaacac  
tgggaggccgagggcgggcagatcacctgaggtcaggagtccaagtcagc  
ctggccaacatggggaaaccccgctctctactaaaaatacaaaaaattag  
ttgggtgtggtggcgggcgctgtaatcccagctactcaggaggctgagg  
cagaagaatcgcttgaaccaggaggcggaggttgcagtgagccgagaac  
acgccattgcactccagcctgggcaacaagagtgaaactgtctcaaaaa  
agaaagaaagaaagatgtatgtgcccatagaacaatttactccaagggt  
caattctcactagctcattagctgtcaccagatcattaaccagaccagtg  
tgatagtggttgtgataaagtatccgtagccacattgccaatcaaat  
ataaatgtgagccccatatgtaattttaacttttctaatagccacattaa  
aaagtaaaaagaaacagatgaaatttcagtagttatttaacctaataatc  
taaaactctataatttccacttaatgtaaattattgagggttttttttta  
atacttaaagcacatcccagccacatttcaagtgcttaataagcacctgt  
ggctaccatcctcaacagcacagatatagtgatcctgcatgctctatgg  
aactgatggtaaagagttgcagggggctgggcacgggtggctcacgcctgt  
aatcccagcactttgggaggccgagggcgggatcacaaggtcaggaga  
tcgagaccatcctggctaacacagtgaaaccctgtctctactaaaaatac  
aaaaaattagccgggtgtagtggcaggcgcctgtagtgcccagctactggg  
gacgctgaggcaggagaaatggcatgaaccaggaggcagagcttgcagta  
agctgagatcatgccactgcactccagccggggctacagagcgagactcc  
gtctcaaaacaaacaaacaaaaaaagagttgcagggagcccagactgaca  
tagggaaaccagggaaggagataggaatagattaaaagatggataaa  
taaatgacggggagttgctgatccctctttagccattccttttactgt

gttctgttcatattttctctctgattctctgactactttccttttggttt  
ttaagtttctcccttttgacatttcccttttagttgtctaaatttttt  
aaaaaattgtttggatgtcacaccttcaaggctaatttctccaagta  
aagctctgttttattatcatcagactaattttaagatattctcattgctt  
taaaaaaaaaagctgtctttcttaccagtagttgagcaaattgtttcc  
caattactgtgacagaaattaaaatgagtaaaggagctgggtgtgggtggc  
ataccgggttacttgggaggctgaggcaggaggatcacttgagtccaaga  
gtctggactatagtcacaagttcatcatcaatatggtgacctcctgggag  
cagaggatcaccaggtgcctaaggaggagtgaaccggccccgggacagaa  
tcagagcaggtcaaaactgtgctgattagtagtgaggttgtgcctgtgga  
tagcaattgtactccaacctgagcaacatagcgagactccatctctttag  
aaaagtgagtaaagatggaaagtataagactgttactacaaatgtcattg  
ttacaaatactttgtttagaaagatattagatattttaatatttcacata  
cttattgtcattttgtaataacttattctagcacaccattggttttgtgtt  
tcagataagcccgtttgttttagacctctgatagttacctgaaatgttt  
atgtgaagcctgaaaggaagacttaaccttacctctatcacctgtcatt  
aaactgatggagcaagtcactgctttacttagatgttgtcttatcatac  
ctgtttgtttacatgctagagttattccaattgaattactccttgactgtt  
tacctcccttttcttaggttcagtggcatactttgaactttttaagaag  
gatgagcaatggaagataggatggatgttttccctaaactgatttttttt  
tttttgagaagtttatcaggacagtgataagtgccctaggtgcatttac  
tgagcccacgttgatgttactagggtttctacttttaaatgatttatct  
ttttattcttggcttttgccattttattgccattgctaaaactgaggaac  
tcatttgaacctccaaggagaggaatttttataactgttaactacatca

cttatcaagcattgaggccaaataaggagatatttctgtctccctgtgta  
tcatatagattcaagggcagaggagttatattttgaagctacaaaacta  
tcttgtgcatgtgtgcttttttttttttttttttttacaagtacgtaactaat  
gcaaactttttacatctgggatgctgggcttttgtaaactctaaaattctc  
ccaaacagtatctttcagcttctagtgcctgttgaaggagatcatgaag  
aaacaaagttcttcgcctcataaatttagcattaaaaagaagcccatca  
gtgctgtggaacatagggaaagaaaaaaaaaacacccaaagtgtgct  
tgataattatttttatttttaaaatttattatagagcattgcagacgtac  
acaacttatttgtttattttatgttttttttttgagacagtcttgctct  
gtcaccaggctggagtgagtgctgctccactcactacaatctct  
gcctcccagggtcaggcgattcttgtgcctcagcctcctgagtagttggg  
attacaggcatgcaccaccacactggctaatttttgtatttttaataga  
ggcgggggtttcaccatgttggccagggtgatcttgaactcctggcctcaa  
gtgatctgaccaccttagcctcccaaagtgtgggattacaagtgtgagc  
cactgcacctgcccccaaattagaatagtataatgaaatccccatgtacct  
atgcctaactcaacaacaatcaacttacagccagttttttctcagccac  
atccacttcttcttcttcttcttactttgaagtaaattcccaatcattatg  
tcatttcatctgtaaacattgaggtatataatgtctaaaatatatatgtgt  
ttctaaaacatttttttaagataatgtcaacccaagaaaattaataat  
accttcaaatcatcaaatagactgagtccttttaaaaatagaaattcggcc  
gagcatggtggctcatgcctgtaatcccaacactttgggaggctgaggtg  
ggcggatcacaaggtcaggagtttagacaccagcctgaccaactggtgaa  
accccgctctactaaaaatataaaaattagccagggtgtggtggcatgtg  
cctgtgtaatcccagctactcaggaggctgaggcaggagaatcgcttgaa

cccaggaggcggaggttgcagtgagccgagatcgcgccactgcactccag  
cctgggacgacagagcaagactctgtctcaaaaaataaagtaaaataaat  
aaaaatagaaattcaaatagtttatcatggtcacctagctttaaaatgcg  
cttacgttgtagtgattgtgtattctagcttccctttaaaccatatctt  
ttaagcatgtgtctatttccctaattcagaactttccaatctgtatcctgt  
gagtaagtcttcttggctttcaggacagctagggcaggaacctgatccag  
tggaccgtacaaactacattttctgaaatgtgctgtagcatgggaaaaat  
tggcaagtcctgctgtgaggaatttctcttgtgagtttaagacagaggag  
tacttctacccttaacctcaaggctcaggaaaatggcagcactgactaaa  
taattacctttgcttagaacttgcaggaactatttagatttctctttagg  
tgttttcccataccttacatgcaatgcaggtacacttaacttagatgtcg  
tataactcaagcattttcagacttgttacttaaaataactcctgaaagaa  
tttgaccaacagcattccttatgtgttttaagttggcatctgaaatat  
ttaattaagaaatttaaacagttgtaagaatagtctctgttgggcccga  
tgccgtagctcattcctgtaatcccagaactttgggaggctgaggcaggt  
gaaatcacttgagcccaggagtttgagaacaacctggacaacatggcgcaa  
ccctgtctctacaaaaatacaaaaaaaagaaaaaattagccaggcatg  
gtggcgtgtgcctgtagctccagcaactcaggaggatcacttgagcctga  
ggggttgagggtgcagtgaccggtattgtaccactgcactccagcctgg  
gcaacagagcaagacctgtctcagaagaaaaagaataatctctgttgg  
tgataagcattgacattttgaaagtaattcggaaagaaatctataaaatt  
taaatacaagataccatagcaacttcttacctgcccgtctttcatatgaat  
aatttgacacgacaactttaaaaagataatcaagaaatttaaaattcagt  
ctgggtattagatgataccaaggaattgattttgtaaaatatgaaagtgg

cattgtgggtatataagaaaatatccgtaatTTTTTtacatttcataatag  
ttaaaaaggaaatgtttctttgggtactTTTTTTTTTTtagttatggcggt  
tggttagcaacaatgtgaccatcacttaattgccctTTTTTTTgtttaaa  
tttatagggatttggggatatttatactacttatcagtcaccacatgata  
ttgtcttaaaaaataaatgaataaactgttaaccaacttggacatttta  
cacgcatcctgtttcttcttcttcttctTTTTTaaaaagacaagagtctc  
attctgttgcccatgttgggtgtgcagtggcacaatcacagcagcctcgat  
ctccaagtgaggagatcaagtgatcctctcacctcagctgggaccacag  
aagagcaccaccacaccagctgattTTTTTTTattattcttatagac  
atgggtctccctacattgccaggctggctctggaaatcctgggctcaaga  
gctctacctgccttggcctcccaaagtgctgggattacagacatcagcca  
cccgacctcctgtttctTTTTTTTctTTTTTctTTTTTgagacagggctca  
ctctgtcacctaggctggagtgcagtggtcatgatcatggttcattgcagc  
ctcgatctgctaggctcaagccatcctcctgcctcagcctcccgagtagc  
tgggactgtaggtgcatgctgccatgcctggctaattTTTTTgtatttcttg  
tagggatttggcatgttgtccaggctgatctcaaaactcacaagtcagcc  
ttctatttgttagattcatttgcagtttacttctcaacagaattatatt  
ctgacatattttatcttgaagccttagtcactttgacattcttatttgca  
agaacattgtgtatgtaaattgaaatatggaaaatgggtgttctgtgatat  
ggctcttaagtgttttagagtcttctgtgttaagttactattacaatta  
ttaatacacaattgaacaaaataacatttattacagacgTTTTTatgttta  
tatatttttaaatgcatttctttgacacatttttattcaaatagtttcat  
atccatggatgacaattacttatccctagagtgaaatgggattcagcacc  
aattcctaatttttatttttttagaggaagtactaacagaccttgtttaca

ttagtaaataagttgatggaagatttgtcatagcaatattgcttagttct  
tggaaactcTTTTTgagttacatgccagaaatcatgtaatctatcatcaaa  
aattatgggttttgtttgtttcaaggtggagtcctctctctctcaccagg  
ctgtagtacacaggcaggtctcggctcattgcaacctctgcctctgggg  
ttcaagcgatttctcctgcctcagcctccccagtagctggagattacaggt  
gtggggccagcagcggcctaatttttattttttatttttagtagagacgg  
ggtttcacatgttggccatgctggctctcaaaactcctgacctcaagtgat  
ccaccgcctcagcctcccaaagtgctgggattacaggcatgagccactg  
caccagcccaaaaattatgtttaatgatcccttagctaaaactcaatta  
ggccatttttcaaggtTTTTTTTTTaaagcaagaatttaaacctttt  
gacatgcaaacgaatttattcattTTTTTTTcaggcatttgcattctcaag  
actgacactagtagtttctTTTTTctTTTTTctTTTTTctTTTTTgagacg  
gagctctgtctgtcgcgccaggctagagtgcagtgatgatctcggctc  
actgcaacctctgcctcctgggttcaagtgattcttttgcctcagcctct  
cgagtagctgggattacaggcagcaccaccatgctcagctaatttttgt  
atttttagtagagatggggTTTTTgcatTTTTTggccaggctggctcaaat  
tcttgacctcaggtgatctggctctcaaaactccgacctcaggtgatctgcc  
tgcttaggcctcccaaagtgctggaattacagggtgtgagccaccacgccc  
atccagacactagtagtttctaattgtttctTTTTTcattatcttggagctt  
tttacactctagtttcaaaatgggttgaatatgcctttctTTTTTataaag  
tgggacaagggcagttgtgaaagggggagatgggaaaaaaccttgatg  
gccagaggtacattcttatgaagatcaatttttggaaaaatctatatgtg  
gaactgagtagctggaatttgattctctcttgactgacctttctcagtg  
actccttgacagtggtcctgttccccagggcgctgttgtcccaactga

## Mecanismos Fisiopatológicos del Remodelado y la Calcificación Arterial en la Cardiopatía Isquémica

```
aggccactggtataatggactctttgtagtaattggctacacctttctaa  
aacaagtggccccgtttaattagctaccttaggggtgaaatgaaatgtagg  
gaacgagtctaagtctttcttgatggtagctctctcctcttattttctgca  
tttattaaggtataagaactctttgctctcatgtgacttaaaatcagcag  
ctggaaatattcttggtgcaagataagtgattaagcctcaggaaaatacc  
ttgctttctaaggtctgtctggcctaaaatacccttgtagctgctgttg  
gttccaaacaaatggatgaggaaaaagggttaggccagattagcatgagg  
cagttttggggaaaagacaaacccttcttttgtagtatgtctgtgtacc  
cag
```

```
>hg18_mgcGenes_BC013383_11    range=chr7:128194746-  
128194945          5'pad=0          3'pad=0          strand=+  
repeatMasking=none
```

```
GTGACATGTACAGCCATGATGGGAATACTGATGAGCCAGAATGGGTAAAG  
ACAGAGCGAGAGCAGTTTGTGAGTTTCGGGATAAGAACCCTGATGGGAA  
GATGGACAAGGAAGAGACCAAAGACTGGATCCTTCCCTCAGACTATGATC  
ATGCAGAGGCAGAAGCCAGGCACCTGGTCTATGAATCAGACCAAAACAAG
```

```
>hg18_mgcGenes_BC013383_12    range=chr7:128194946-  
128196352          5'pad=0          3'pad=0          strand=+  
repeatMasking=none
```

```
gtaagtctggcgaggccacacgctctatccttgattgaagtatgcttct  
aggggatcacctgaacagtttctgttaaggtgcatagagcatttaaggtc
```

```
ttaattagtctaagtcagccaagtatctgaatctggcgattaaaaccttt  
cagggcagcactagctatctgatctcattttagaaatccttttgcccagt  
gctgatagcattgtaggaaatttggttcagaaaagagcctttgtgtgta  
gcctgtgcccagcatgcatcatcaggtatTTTTtagatccccaggaatTTT  
TTTTTTctttgttacttcatttggtcctttacctattacaggccattc  
tgtctactcaaagctggttggttctccttcttaaatacaaataggctTTTTT  
aattgggtcctttgatgggctataaatcagcttttctctggagcctggt  
caaattgtccttgatcaattaattatctgaggtatTTTTgttaaaagtatt  
gttgtccctaagcccagtcacctgcttcagagattactcctgcctgctt  
ggagtaagctgaaaatcgggtctaaagatggagatTTTcagtgttctgagt  
atatTTTTgtctaagctaattctcaatttcaaattcagTTTTTTatttta  
gagcTTTTTaaagtgttgatctgctttaagttcttgctcaaagtcacttt  
agtagccaggtgttggtgctcctgagatgtatgagaaaaggaaatgcatgta  
gtcatccctatctaggagatgttccatattttcctctaaaaggagagttt  
tctcctcatgaaacaaacctttatctctagcattgagttgttgtgttata  
ttctttccacccttccacttttaactttcttgataaaagaaatgtttaat  
tggcctggcacgatggctcacgcctgtaatcccagcactttgggaggcca  
aggcagcgatcacctgagattgggtgttcaagaccagcctgacaaaca  
tggagaaacccatctctactaaaaatacaaaattacctgggctggtgg  
cgcatgcctgtaatcccagctactcgggaggctgaggcagaaaaatcact  
taaatacctttaacacgggaggcggaggttgcggtgagctgagatcgcg  
cattgactccagcctgggcaacaagagcgaaactccgtctcaaaaaaa  
aaaaaaaaaaaaacaaggaatgtgtaattgctgttttcttccctcttctg  
atgtatgtagggggaatgagggtgagtagttcacacttaatttagtaga
```

---

```
aatgagaatcttaacttctgattaaccccaattcttctataacagtggtt
ctgaatttttaatgggaaatagttcttcttcaattcattgctatctcta
ctttcag
```

```
>hg18_mgcGenes_BC013383_13   range=chr7:128196353-
128196457           5'pad=0           3'pad=0           strand=+
repeatMasking=none
```

```
GATGGCAAGCTTACCAAGGAGGAGATCGTTGACAAGTATGACTTATTTGT
TGGCAGCCAGGCCACAGATTTTGGGGAGGCCTTAGTACGGCATGATGAGT
TCTGAGCTACGGAGGAACCCTCATTTCCTCAAAGTAATTTATTTTTACA
GCTTCTGGTTTCACATGAAATTGTTTGGCTACTGAGACTGTTACTACAA
ACTTTTTAAGACATGAAAAGGCGTAATGAAAACCATCCCGTCCCCATTCC
TCCTCCTCTCTGAGGGACTGGAGGGAAGCCGTGCTTCTGAGGAACAACCTC
TAATTAGTACACTTGTGTTTGTAGATTTACACTTTGTATTATGTATTAAC
ATGGCGTGTTTATTTTTGTATTTTTCTCTGGTTGGGAGTATGATATGAAG
GATCAAGATCCTCAACTCACACATGTAGACAAACATTAGCTCTTTACTCT
TTCTCAACCCCTTTTATGATTTTAATAATTCTCACTTAACATAATTTTGTA
AGCCTGAGATCAATAAGAAATGTTTCAGGAGAGAGGAAAGAAAAAATAT
ATGCTCCACAATTTATATTTAGAGAGAGAACACTTAGTCTTGCCTGTCAA
AAAGTCCAACATTTTCATAGGTAGTAGGGGCCACATATTACATTCAGTTGC
TATAGGTCAGCAACTGAACCTGCCATTACCTGGGCAAGGAAAGATCCCT
TTGCTCTAGGAAAGCTTGGCCCAAATTGATTTTCTTCTTTTTCCCCCTGT
AGGACTGACTGTTGGCTAATTTTGTCAAGCACAGCTGTGGTGGGAAGAGT
```

```
TAGGGCCAGTGTCTTGAAAATCAATCAAGTAGTGAAATGTGATCTCTTTGC
AGAGCTATAGATAGAAACAGCTGGAAAACATAAGGAAAAATACAAGTGTT
TTCGGGGCATAACATTTTTTTTTCTGGGTGTGCATCTGTTGAAATGCTCAAG
ACTTAATTATTTGCCTTTTGAATCACTGTAAATGCCCCATCCGGTTCC
TCTTCTTCCCAGGTGTGCCAAGGAATTAATCTTGGTTTCACTACAATTAA
AATTCACTCCTTTCCAATC
```





**ANEXO VI. SECUENCIACIÓN DE LOS INSERTOS EN pU3-CALUA (SILVESTRE) Y pU3-CALUG (POLIMÓRFICO)**

En verde se indica el nucleótido silvestre y en amarillo el nucleótido polimórfico reemplazado mediante mutagénesis dirigida. Se indican como N los nucleótidos que no han sido identificados con claridad en el sistema de secuenciación del *Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia*. Para la secuenciación se utilizaron cebadores F5 y R9.

***Secuencia silvestre directa (secuenciación de pU3-CALUa)***

NNNNNNNNNNNTGNTGGCNCNNCNCNNANNNTGGGGAGGCCCTTAGTACGGCATGATGAGTTCT  
 GAGCTACGGAGGAACCCCTCATTTCCCTCAAAGTAATTTATTTTACAGCTTCTGGTTTTACATG  
 AAATTGTTTGCCTACTGAGACTGTTACTACNAACTTTTTAAGACATGAAAAGGCGTAATGAAA  
 ACCATCCCGTCCCCATTCCCTCCTCCTCTCTGAGGGACTGGAGGGAAGCCGTGCTTCTGAGGAAC  
 AACTCTAATTAGTACACTTGTGTTTGTAGATTTACACTTTGTATTATGTATTAACATGGCGTGT  
 TTATTTTGTATTTTCTCTGGTTGGGAGTATGATATGAAGGATCAAGATCCTCAACTCACACA  
 TGTAGACAAACATTAGCTCTTTACTCTTTCTCAACCCCTTTTATGATTTTAATAATTCTCACTT  
 AACTAATTTTGTAAAGCCTGAGATCAATAAGAAAATGTTTCAGGAGAGAGGAAAGAAAAAATATA  
 TGCTCCACAATTTATTTAGAGAGAGAACAACCTTAGTCTTGCCTGTCAAAAAGTCCAACATTTT  
 ATAGGTAGTAGGGCCACATATTACATTCAGTTGCTATAGGTCCAGCAACTGAACCTGCCATTA  
 CCTGGGCAAGGAAAGATCCCTTTGCTCTAGGAAAGCTTGGCCAAATTGATTTTCTTCTTTTCT  
 CCCCTGTAGGACTGACTGTTGGCTAATTTTGTCAAGCACAGCTGTGGTGGGAAGAGTTAGGGCC  
 AGTGTCTTGAAGTCAATCAAGTAGTGAATGTGATCTCTTTCAGANCTATAGATAGAAACAGC  
 TGGAAAACATAAGGAAAAATACAAGTGTTTTTCNGGGCATAACATTTTTTTTTTCTGGGTGTGCATC  
 TGTTGAAATGCTCAAGANTTAATTTATTTGCCTTTTGAATCACTGTAAATGCCCCAGTTAACA  
 ACNCAATTGCATTNATTTTATGTTNNNTNCNNGGGGNNNGTGGGNNGTTTTTTNAAGCAGN  
 NAANNCTCNNNCNAANTGTGNTAAAATCNNNNNGNNTNCNTCNACNGATGNCCNNGNNNNNN  
 NNNNNNTNANNNCNNNNNTNGNNNGNANGNNNNNNNNNNNCNNNCTNNNNNNNNNNNNNNNN  
 NNN

***Secuencia silvestre reversa (secuenciación de pU3-CALUa)***

NNNNNNNNNNNNNTCTNNNNNTTNNNNNGANGCACACCCAGAAAAAAATGTATGCCCCGAAAA  
 CACTTGTATTTTTCTTTAGTTTTCCNGCTGTTTCTATCTATAGCTCTGCAAAGAGATCACATT  
 CACTACTTGATTGATTTTCAAGACACTGGCCCTAACTCTTCCCACCACAGCTGTGCTTGACAAA  
 ATTAGCCAACAGTCAGTCCCTACAGGGGGAAAAAGAAGAAAATCAATTTGGGCCAAGCTTTCCTA  
 GAGCAAAGGGATCTTTCCTTGGCCAGGTAATGGCAGGTTTCAAGTTGCTGGACCTATAGCAACTGA  
 ATGTAATATGTGGCCCTACTACCTATGAAATGTTGGACTTTTTGACAGGCAAGACTAAGTGT  
 CTCTCTCTAAATATAAATTGTGGAGCATATATTTTTTTTCTTTCCTCTCTCCTGAACATTTCTT  
 ATTGATCTCAGGCTTACAAAATTAGTTAAGTGAGAATTATTTAAAATCATAAAAGGGGTTGAGAA  
 AGAGTAAAGAGCTAATGTTTGTCTACATGTGTGAGTTGAGGATCTTGATCCTTCATATCATACT  
 CCCAACCAGAGAAAAATACAAAAATAAACACGCCATGTTAATACATAATACAAAGTGTAATCT  
 ACAAACACANNTGTACTAATTAGAGTTGTTCCCTCAGAAGCACGGCTTCCCTCCNGTCCCTCAGA  
 GAGGAGGAGGAATGGGGACGGGATGGTTTTTCATTACGCCTTTTCATGTCTTAAAAAGTTTGTAG  
 TAACAGTCTCAGTAGCGCAAACAATTTTCATGTGAAACCAGAAGCTGTAAAAATAAATTTACTTTT  
 GAGGAAATGANGGGTTCCCTCCGAGCTCAGAACTCATCATGCCGTACTANNGCCCTCCCCAAA  
 NCTGTGGNCCTGGCTGCNNACNANNAAGTCATACTTNGTNNACGATCTCCTNCNTGGTCTAGAA  
 ATTACACGGCGATCTTCCGCCNTCTNGGCCTTTANNNNGATCTCTCTGATTTTTCTNGNNTNN  
 ANNTTTTCNGGTNANNACCTTTCGGNCCNTNNGTCCNCAAANNNNNNNANNNTCCNNNNNNNGCC

AACTTTTNNNGNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNGANNNNANNNNNNNNNCNNNNNNNTNNNTNN  
 NTNGNNTNNNNNNNNNNNNNNNNANNNNANNNNNNGNNGNGGNNNNNNNNNNNNNN

**Secuencia polimórfica directa (secuenciación de pU3-CALUg)**

ANNNNNNNNNNTNNTGGCNNCNNNCNNNNNNNTGGGGAGGCCNNANTACGGCATGATGAGTTCT  
 GAGCTGCGGAGGAACCCCTCATTTCCTCAAAGTAATTTATTTTTACAGCTTCTGGTTTCACATG  
 AAATTGTTTGGCGTACTGAGACTGTTACTACNAACTTTTTAAGACATGAAAAGGCGTAATGAAA  
 ACCATCCCGTCCCCATTCCTCCTCCTCTCTGAGGGACTGGAGGGAAGCCGTGCTTCTGAGGAAC  
 AACTCTAATTAGTACACTTGTGTTTTGTAGATTTACACTTTGTATTATGTATTAACATGGCGTGT  
 TTATTTTTGTATTTTTCTCTGGTTGGGAGTATGATATGAAGGATCAAGATCCTCAACTCACACA  
 TGTAGACAAACATTAGCTCTTTACTCTTTCTCAACCCTTTTATGATTTTAATAATTCTCACTT  
 AACTAATTTTGTAAAGCCTGAGATCAATAAGAAATGTTTCAGGAGAGAGGAAAGAAAAAATATA  
 TGCTCCACAATTTATATTTAGAGAGAGAACAACCTTAGTCTTGCCGTCAAAAAGTCCAACATTTT  
 ATAGGTAGTAGGGGCCACATATTACATTCAGTTGCTATAGGTCCAGCAACTGAACCTGCCATTA  
 CCTGGGCAAGGAAAGATCCCTTTGCTCTAGGAAAGCTTGCCCAAATTGATTTTCTTCTTTTTT  
 CCCCTGTAGGACTGACTGTTGGCTAATTTTGTCAAGCNCAGCTGTNNNNNNGAAANAANTTAGG  
 GCCNNTGCTTGAAAAATCAATCAAGTAGTGAATGTGATCTCTNNNNNAGAGCTATAGATAGAA  
 ACAGCTGGGAAAACTAANNNNAAAATACAAGTGTTTTTCGGGGNATACATTTTTTTTTTCTGGG  
 GTGTGCATCTGTTTGAAANTGCTCAAGNACTTAATTATTTTGCCTTTTNNNAATCACTGTAAAT  
 GCCCCAGTTAACAACCAACAANTTNNNTTCNTTTTNNNNNNNTCAGGTTTCNGGGGGGANGGNN  
 GNNGGGNANGGTT

**Secuencia polimórfica reversa (secuenciación de pU3-CALUg)**

NNNNNNNNNNNTCTNNNNNTTTNNNGNNGCACACCCAGAAAAAATGTATGCCCCGAAAAA  
 ACTTGATTTTTCTTTAGTTTTCCNGCTGTTTCTATCTATAGCTCTGCAAAGAGATCACATTC  
 ACTACTTGATTGATTTTCAAGACACTGGCCCTAACTCTTCCCACCACAGCTGTGCTTGACAAAA  
 TTAGCCAACAGTCAGTCCTACAGGGGAAAAAGAAGAAAATCAATTTGGGCCAAGCTTTCTTAG  
 AGCAAAGGGATCTTTCTTGCCCAGGTAATGGCAGGTTTCAGTTGCTGGACCTATAGCAACTGAA  
 TGTAATATGTGGCCCTACTACCTATGAAATGTTGGACTTTTTTGACAGGCAAGACTAAGTGTTC  
 TCTCTCTAAATATAAATGTGGAGCATATATTTTTTTTTCTTTCTCTCCTGAACATTTCTTA  
 TTGATCTCAGGCTTACAAAATTAGTTAAGTGAGAATTATTAATAATCATAAAAGGGGTTGAGAAA  
 GAGTAAAGAGCTAATGTTTGTCTACATGTGTGAGTTGAGGATCTTGATCCTTCATATCATACTC  
 CCAACCAGAGAAAAATACAAAAATAAACACGCCATGTTAATAACATAATACAAAGTGAAATCTA  
 CAAACACAAGTGTACTAATTAGAGTTGTTTCTCAGAAGCACGGCTTCCCTCCAGTCCCTCAGAG  
 AGGAGGAGGAATGGGGACGGGATGGTTTTTATTACGCCTTTTCATGTCTTNAAGTTTGTAGT  
 AACAGTCTCAGTAGCGCAAACAATTTTCATGTGAAACCAGAAGCTGTAAAAATAAATTACTTTTG  
 ANGAAATGAGGGTTCTCCGTCAGCTCAGAACTCATCATGCCGTACTAAGGCCCTCCCCAAAATC  
 TGTGGCCTGGCTGCNNNCNAATAAGTNNTACNTGTCAACNATCTCCTCCTTGGTCTAGANTANC  
 NNNNGCGATCTTTCNGCCCTTCTTGGNCNTTATGAAGGATCTCTNNGATTTTTTTCNTGCGTNN  
 NNTTTTTNNNGTANGNCCCTTNNGTACNCGTNNNAANNANNNNNNNNNNNANNTTTTTNNN  
 NGTNGTTNNNNNGNNNNNNNNANNNNNNNNNNNNNNNNTNTNTNNNNNNNTNNTNNNNNNNNN  
 NNNNNNNNNNGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

## ANEXO VII. LÍNEAS CELULARES ANIMALES UTILIZADAS Y CONTAJE CELULAR EN CÁMARA BÜRKER

### 1. Líneas celulares animales utilizadas en este trabajo

Las líneas de células animales utilizadas durante el desarrollo del presente trabajo de Tesis, las formulaciones químicas comerciales empleadas como medio de cultivo basal y las características descriptivas celulares se describen brevemente en la siguiente tabla

Línea celular	Medio Basal	Tipo celular	Características
BAEC	RPMI 1640 (Lonza Group, Basilea, Suiza)	Endotelial de arteria bovina	≈22 μm largo, morfología cuboidal-hexagonal, vesículas citoplasmáticas, crecimiento por contacto, línea celular continua, adherente
HUVEC eahy-926	DMEM 4.5 g/L glucosa (Biowest SAS)	Endotelial de vena umbilical humana	≈22 μm largo, morfología cuboidal-hexagonal, vesículas citoplasmáticas, crecimiento por contacto, inmortalizada, adherente
CMLV	M199 (Sigma, San Luis, MO, EEUU)	Músculo liso de arteria aórtica	≈100 μm largo, morfología fusiforme, crecimiento por contacto, crecimiento en haces, cultivo primario, adherente
HepG2	RPMI 1640 (Lonza Group, Basilea, Suiza)	Hepática	≈10 μm, morfología esférica, crecimiento en racimos, línea celular continua, adherente

### 2. Contaje celular en cámara Bürker

El contaje de células se realizó en cámara Bürker (A) y atendiendo a las características de la misma se dedujo el factor aplicable para el cálculo de la densidad celular contenida en la muestra (B):

**A**

**B**

$$\text{Células/ mL} = \left[ \frac{\text{Células vivas contadas}}{\text{Superficie contada} \times \text{Profundidad de la cámara}} \times \text{factor de dilución} \right] \times 1000$$

De lo que se deduce:

$$\text{Células/ mL} = \text{Células vivas contadas} \times 20000$$

Células vivas contadas = media de las células contadas en los 4 cuadrantes

Superficie contada (mm<sup>2</sup>) = 1 mm<sup>2</sup>

Profundidad de la cámara = 0.1 mm

Superficie contada x Profundidad de la cámara = 0.1 mm<sup>3</sup> = 1 μL

Factor de dilución = 2

## **ANEXO VIII. TINCIÓN DE HOECHST PARA LA DETECCIÓN DE MICOPLASMAS EN CULTIVOS DE CÉLULAS ANIMALES**

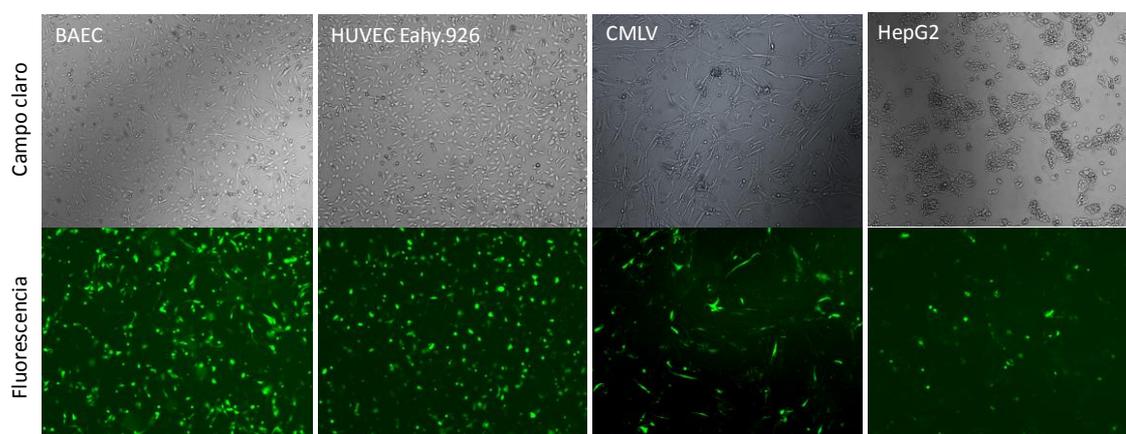
Se sembraron 2000-3000 células/pocillo en portabobjetos de 4 pocillos, dado el gran tamaño de las células utilizadas en este trabajo de Tesis, y se incubaron durante 24 h con 0,5 mL de medio completo sin antibióticos. Transcurrido este tiempo se retiró 0,25 mL de medio, se añadió 0,5 mL de fijador de Carnoy (metanol absoluto: ácido acético glacial 3:1) fresco y se incubó durante 5 min. Se realizó una segunda incubación de 10 min exclusivamente con 1 mL de fijador de Carnoy, tras lo cual se retiró el fijador y se dejó secar al aire la monocapa celular durante 20 min. En oscuridad se añadió e incubó 1 mL de solución colorante Hoechst 33258 (0,05-0,5 µg/mL bis-benzimidazol en solución de Hank) durante 20-30 min a 22-25°C, se lavó con agua destilada y se volvió a dejar secar al aire en oscuridad. La valoración se hizo por microscopía de fluorescencia a 40X (Excitación 330-380, emisión 430-440). Interpretación de los resultados:

- Negativo: fluorescencia exclusivamente en el núcleo
- Positivo: fluorescencia de núcleos, citoplasmas y zonas intercelulares

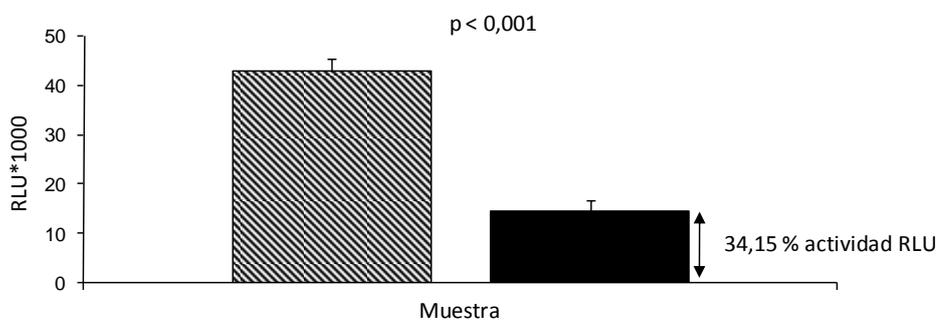
## ANEXO IX. EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN EN DIFERENTES TIPOS CELULARES Y FUNCIONALIDAD DE LAS CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS EN BAEC

En los protocolos de optimización de transfección se utilizaron vectores de expresión conteniendo GFP y un tamaño (pb) semejante al de las construcciones plasmídicas p3U-CALU. Se utilizaron cultivos primarios de CMLV, y líneas celulares HUVEC Eahy.926, BAEC y HepG2 (**Figura I**).

A



B



**Figura I. Transfecciones paralelas en diferentes tipos celulares.** Eficiencias de transfección valoradas visualmente por la viabilidad celular y la fluorescencia mediante vector plasmídico de transfección conteniendo la proteína GFP (A); Transfección de p3U-CALUa (columna líneas diagonales) y p3U-CALUg (columna negra) en BAEC (B). Cada ensayo se realizó por cuadruplicado 3 veces. P, valor p de probabilidad estadística; RLU, Unidades Relativas de Luminiscencia.

## ANEXO X. RANGO DE SEPARACIÓN EFICIENTE DE PROTEÍNAS Y PREPARACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA

### 1. Rango de separación de proteínas en geles de poliacrilamida

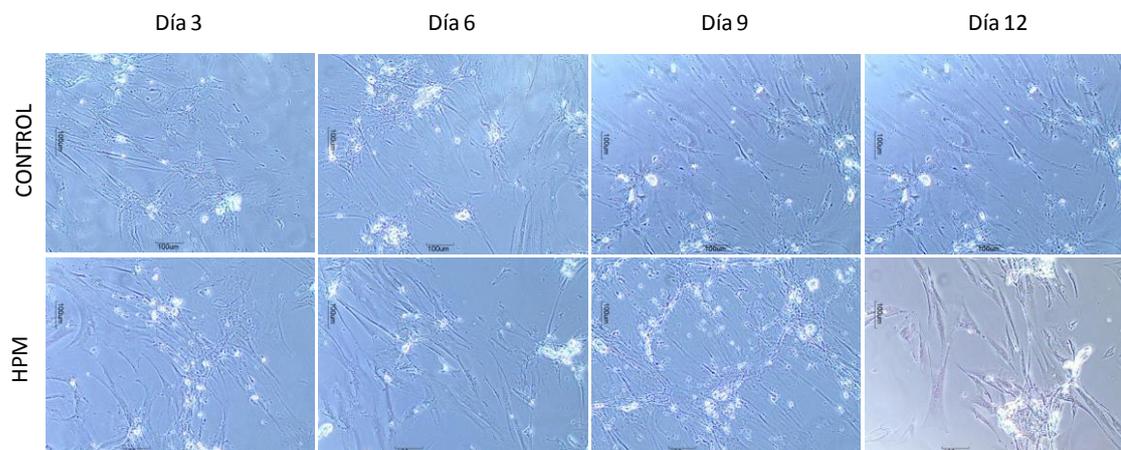
Concentración de poliacrilamida (%)	Rango de separación (KDa)	Proteína de interés en este trabajo
5,0	57-212	-
7,5	36-94	$\beta$ -catenina-
10	16-68	Calumenina, SM22- $\alpha$
15	12-43	cMGP, OCN-c8

### 2. Preparación del gel concentrador o hacinador

Gel Concentrador	4% SDS-PAGE
Tris-HCl 0,5M, pH 6,8	0,5 mL
Acril/Bisacril 30%	0,26 mL
SDS 10%	20 $\mu$ L
Agua ultra-pura	1,22 mL
PSA 15%	10 $\mu$ L
TEMED	2 $\mu$ L

### 3. Preparación del gel separador

Gel Separador	7,5% SDS-PAGE	10% SDS-PAGE	15% SDS-PAGE
Tris-HCl 1,5M, pH 8,8	1,25 mL	1,25 mL	1,25 mL
Acril/Bisacril 30%	1,25 mL	1,67 mL	2,5 mL
SDS 10%	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
Agua ultra-pura	2,43 mL	2,01 mL	1,17 mL
PSA 20%	25 $\mu$ L	25 $\mu$ L	25 $\mu$ L
TEMED	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L

**ANEXO XI. VALORACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ALP**

La visualización se realizó con objetivo 4X de campo claro y 10X de contraste de fases. En ningún caso se pudo evidenciar tinción púrpura (actividad ALP positiva), por lo que el modelo de calcificación de la CMLV desarrollado en este trabajo no indujo la expresión y actividad de la ALP (al menos en los puntos temporales analizados). Las fotografías se tomaron bajo microscopio óptico invertido con objetivo 10X de contraste de fases (Motic AE2000, Electronic Commerce Organization, S.L.)

**ANEXO XII. PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES DEL TRABAJO ENMARCADO EN LA TESIS TITULADA “MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DEL REMODELADO Y LA CALCIFICACIÓN ARTERIAL EN LA CARDIOPATÍA ISQUÉMICA”**

El trabajo realizado en la presente memoria ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

1. JOVER E, Hernández-Romero D, Hurtado JA, Romero-Aniorte AI, Casas T, Valdés M. Serum adiponectin level as a biomarker of coronary artery calcification and severe coronary lesions. *Rev Esp Cardiol.* 2012; 65(11):1060-1061
2. JOVER E, Marín F, Quintana M, Pérez-Andreu J, Hurtado JA, Rodríguez C, Martínez-González J, González-Conejero R, Valdés M, Hernández-Romero D. CALU polymorphism A29809G affects calumenin availability involving vascular calcification. *J Mol Cell Cardiol.* 2015 May;82:218-27.
3. JOVER E, Silvente A, Marín F, Rodriguez C, Martínez-González J, Puche CM, Valdés M, Hernández-Romero D. Regulation of hydroxylase enzymes involved in collagen cross-linking reduces calcification of vascular smooth muscle cells. *Enviado para su publicación*
4. JOVER E, Silvente A, Marín F, Puche CM, Valdés M, Hernández-Romero D. MiR-132 and miR-218 are potential regulators of calumenin expression and vascular cell transdifferentiation into osteoblast-like cells. *Enviado para su publicación*

Adicionalmente, ste trabajo de investigación ha sido presentado en los siguientes congresos Nacionales e Internacionales:

Eva Jover, Francisco Marín, José Martínez-González, Cristina Rodriguez, Rocío González-Conejero, Ana I Romero, Mariano Valdés, Diana Hernández-Romero.

Functional genetic polymorphisms in the calumenin gene. Implications in coronary artery calcification. Póster (Basic Science Summer School, ESC, Nize 2013)

Eva Jover, Francisco Marín, Ana I Romero, Miriam Quintana, Joaquín Pérez-Andreu, José Antonio Hurtado, Cristina Rodriguez, José Martínez-González, Rocío González-Conejero, Mariano Valdés, Diana Hernández-Romero. Calumenin is involved in early and late stages of arterial calcification. Póster (Abstract P1500; ESC Congress, Barcelona 2014).

Eva Jover, Francisco Marín, José Antonio Hurtado, Cristina Rodriguez, José Martínez-González, Rocío González-Conejero, Mariano Valdés, Diana Hernández-Romero. La Calumenina presenta un doble papel en etapas tempranas y tardías de la calcificación arterial. Comunicación Minioral (Abstract 4009-6; Congreso SEC, Santiago de Compostela 2014).

Eva Jover, Ana Silvente, Francisco Marín, Cristina Rodriguez, José Martínez-González, Carmen María Puche, Mariano Valdés. Collagen cross-linking enzymes are involved in vascular smooth muscle cells calcification. Póster Moderado (Abstract 75257; Frontiers in Cardio Vascular Biology Congress, Florence, 2016).

**ANEXO XIII. PUBLICACIONES ADICIONALES DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS TITULADA “MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DEL REMODELADO Y LA CALCIFICACIÓN ARTERIAL EN LA CARDIOPATÍA ISQUÉMICA”**

1. Roldán V, JOVER E, Marín F. Biological Markers In Atherothrombosis. Haematological (Spanish version). 2010; 95(Extra 1): 85-89
2. Muñoz C, JOVER E, Hernández-Romero D, Saura D, Valdés M, Lip GYH, Marín F. Interactions between clopidogrel and proton pump inhibitors: a review of evidence. Current Medical Chemistry. 2010; 18 (16):2386-400
3. Orenes-Piñero E, Hernández-Romero D, JOVER E, de la Morena G, Valdés M, Marín F. An insight of novel pharmacological therapies in hypertrophic cardiomyopathy. Med Chem. 2011; 7(4):275-85
4. Orenes-Piñero E, Hernández-Romero D, JOVER E, Valdés M, Lip GY, Marín F. Impact of polymorphisms in the renin-angiotensin-aldosterone system on hypertrophic cardiomyopathy. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2011;12(4): 521-30
5. Tello-Montoliu A, JOVER E, Marín F, Bernal A, Lozano ML, Sánchez-Vega B, Pastor FJ, Hurtado JH, Valdés M, Vicente V, Rivera J. Influence of CYP2C19 polymorphisms in on-treatment platelet reactivity and prognosis in an unselected population of non ST elevation acute coronary syndrome. Rev Esp Cardiol. 2012;65(3):219-26
6. Montoro-García S, Hernández-Romero D, JOVER E, García-Honrubia A, Vilchez JA, Casas T, Martínez P, Climent V, Caballero L, Valdés M, Marín F. Growth differentiation factor-15, a novel biomarker related with disease severity in 3 patients with hypertrophic cardiomyopathy. Eur J Int Med. 2012;23(2): 169-74
7. Tello-Montoliu A, JOVER E, Rivera J, Valdés M, Angiolillo DJ, Marín F. New perspectives in antiplatelet therapy. Current Medical Chemistry. 2012; 19 (3):406-27
8. JOVER E, Roldán V, Gallego P, Hernández-Romero D, Valdés M, Vicente V, Lip GYH, Marín F. Predictive Value of the CHA2DS2-VASc Score in Atrial

- Fibrillation Patients at High Risk for Stroke Despite Oral Anticoagulation. *Rev Esp Cardiol.* 2012; 65(7): 627-33
9. Gallego P, Roldan V, Marín F; JOVER E; Muiña B, Manzano-Fernández S, Valdés M, Vicente V, Lip GYH. Ankle brachial index as an independent predictor of mortality in anticoagulated atrial fibrillation. *Eur J Clin Invest.* 2012; 42(12): 1302-8
  10. Roldán V, Marín F, Díaz J, Gallego P, JOVER E, Romera M, Manzano-Fernández S, Casas T, Valdés M, Vicente V, Lip GY. High sensitivity cardiac troponin T and interleukin-6 predict adverse cardiovascular events and mortality in anticoagulated patients with atrial fibrillation. *J Thromb Haemost.* 2012; 10(8):1500-7.
  11. JOVER E, Marín F, Roldán V, Montoro-García S, Valdés M, Lip GY. Atherosclerosis and thromboembolic risk in atrial fibrillation: focus on peripheral vascular disease. *Ann Med.* 2013 May;45(3):274-90.
  12. Hernández-Romero D, JOVER E, Marín F, Vilchez JA, Manzano-Fernandez S, Romera M, Vicente V, Valdés M, Lip GY, Roldán V. The prognostic role of the adiponectin levels in atrial fibrillation. *Eur J Clin Invest.* 2013 Feb;43(2):168-73.
  13. Tello-Montoliu A, Jover E, Valdés M. [New antiplatelet drugs in coronary artery disease]. *Med Clin (Barc).* 2014 Dec 9;143(11):508-14.
  14. Roldán V, Vilchez JA, Manzano-Fernández S, Jover E, Gálvez J, Puche CM, Valdés M, Vicente V, Lip GY, Marín F. Usefulness of N-terminal pro-B-type natriuretic Peptide levels for stroke risk prediction in anticoagulated patients with atrial fibrillation. *Stroke.* 2014 Mar;45(3):696-701.
  15. JOVER E, Rodríguez JM, Bernal A, Arroyo AB, Iniesta JA, Sánchez Guiu I, Martínez C, Vicente V, Lozano ML, Rivera J. High on-treatment platelet reactivity in patients with ischemic cerebrovascular disease: Assessment of prevalence and stability over time using four platelet function tests. *Coagul Fibrinolysis.* 2014 Sep;25(6):604-11.
  16. Montoro-García S, Shantsila E, Hernández-Romero D, JOVER E, Valdés M, Marín F, Lip GY. Small-size platelet microparticles trigger platelet and monocyte functionality and modulate thrombogenesis via P-selectin. *Br J Haematol.* 2014 Apr 28. PMID 24766273

17. Hernández-Romero D, JOVER E, Martínez CM, Andreu-Cayuelas JM, Orenes-Piñero E, Romero-Aniorte AI, Casas T, Cánovas S, Montero-Argudo JA, Valdés M, de la Morena G, Marín F. TWEAK and NT-proBNP levels predict exercise capacity in hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Clin Invest.* 2015 Feb;45(2):179-86. PubMed PMID: 25524713.
18. Vera-Sánchez M\*, Aznar-Cervantes S\*, JOVER E, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Hernández-Romero D, Moraleda JM, Rodríguez-Lozano FJ, Cenis JL. Silk-fibroin and graphene oxide composites promote human periodontal ligament stem cells spontaneous differentiation into osteo/cementoblast-like cells. *Stem Cells and Development.* 2016 (bajo revision)