

Departamento de Ciencias Médicas Básicas

Área Fisiología

Tesis doctoral

Caracterización y evaluación de un modelo *in vitro* de células musculares lisas de aorta humana para el estudio de la calcificación vascular asociada a la uremia

Violeta Cazaña Pérez

La Laguna, Diciembre 2016

INFORME DE LOS DIRECTORES DE TESIS

Diego Álvarez de la Rosa, profesor titular de Fisiología, Teresa Giráldez, investigadora Ramón y Cajal, y Juan F. Navarro, principal líder de grupo, de la Universidad de La Laguna,

HACEN CONSTAR:

Que la memoria de Tesis Doctoral presentada por Doña Violeta Cazaña Pérez, con el título "**Caracterización y evaluación de un modelo *in vitro* de células musculares lisas de aorta humana para el estudio de la calcificación vascular asociada a la uremia**", para optar al grado de Doctora por la Universidad de La Laguna, ha sido realizada bajo nuestra dirección, cumple los requisitos necesarios por la legislación vigente y posee la calidad científica necesaria para la obtención de dicho título, por lo que autorizan su presentación y defensa ante la comisión nombrada al tal efecto. Y para que así conste, firman el presente en La Laguna a 10 de Noviembre de 2016.

Fdo. Diego Álvarez de la Rosa

Fdo. Teresa Giráldez Fernández

Fdo. Juan Navarro González

Tabla de contenido

I. INTRODUCCIÓN	13
1.- ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA	13
1.1.- <i>Definición</i>	13
1.2.- <i>Categorías de la enfermedad</i>	14
1.3.- <i>Etiología</i>	15
2.- LA ENFERMEDAD RENAL COMO FACTOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR.....	15
3.- REMODELADO ARTERIAL DURANTE LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR ACELERADA EN LA ERC17	
3.1.- <i>Estructura de la pared arterial</i>	17
3.2.- <i>La célula del músculo liso vascular (VSMC)</i>	19
3.3.- <i>Aterosclerosis y Arteriosclerosis asociadas a ERC</i>	20
4.- CALCIFICACIÓN VASCULAR.....	21
4.1.- <i>Tipos de calcificación vascular en la ERC</i>	21
4.2.- <i>Fisiopatología de la calcificación vascular en la ERC</i>	23
5.- IMPLICACIÓN DE CANALES IÓNICOS EN LA MODULACIÓN FENOTÍPICA DE VSMC	25
5.1.- <i>Canales iónicos</i>	26
5.2.- <i>Función de los canales iónicos en el músculo liso vascular</i>	26
5.3.- <i>Canales iónicos implicados en el control del tono vascular</i>	27
5.4.- <i>Canales iónicos implicados en el control de la proliferación y migración de VSMC</i>	
.....	31
II. OBJETIVOS	37
III.- DISEÑO DEL ESTUDIO	41
1.- ÁMBITO DEL ESTUDIO.....	41
2.- SUJETOS DEL ESTUDIO	41
2.1.- <i>Criterios de inclusión</i>	41
2.2.- <i>Criterios de exclusión</i>	41
3.- DESCRIPCIÓN OPERATIVA DEL ESTUDIO.	42
IV.- MATERIAL Y MÉTODOS	47
1.- OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO	47
1.1.- <i>Determinaciones bioquímicas</i>	47
2.- CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS DE MUSCULATURA LISA Y ENDOTELIO DE AORTA HUMANA.....	49
2.1.- <i>Mantenimiento de cultivos</i>	49
2.2.- <i>Tripsinización: pases y conservación</i>	49

2.3.- Recuento celular.....	50
2.4.- Tratamiento de las superficies de cultivo.....	50
3.- ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR	51
3.1.- Incorporación de EdU.....	51
4.- DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL (XTT).....	52
5.- DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE TINCIÓN CON AZUL TRIPÁN.....	52
6.- ESTUDIO DE APOPTOSIS.....	53
7.- ESTUDIO DE LA MIGRACIÓN CELULAR.....	54
8.- CUANTIFICACIÓN DE LA CALCIFICACIÓN CELULAR.....	54
8.1.- Tinción Rojo Alizarina	55
8.2.- Cuantificación de proteínas	55
9.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ALCALINA	55
10.- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	56
10.1.- Extracción y cuantificación de ARN.....	56
10.2.- Síntesis de ADNc y PCR cuantitativa (qPCR).....	56
10.3.- Arrays de Baja Densidad con sondas TaqMan (TLDA).....	58
11.- MICROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCENCIA.....	59
11.1.- Inmunofluorescencia.....	59
12.- TÉCNICAS ELECTROFISIOLÓGICAS DE REGISTRO.....	60
12.1.- La técnica de patch clamp.....	60
12.2.- Soluciones para realizar registros electrofisiológicos.....	61
Tabla 3. Soluciones para los registros electrofisiológicos.....	61
12.3.- Protocolo utilizado en el registro de corriente	61
12.4.- Adquisición y análisis de los datos.....	62
13.- REGISTRO DE CALCIO INTRACELULAR	62
13.1.- Medida de la concentración de calcio citosólico libre.....	63
14.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	63
V. RESULTADOS.....	67
PARTE 1.- CARACTERIZACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL MODELO <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE AORTA HUMANA SOMETIDAS A SUERO URÉMICO.....	67
1.1.- CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MATERIAL BIOLÓGICO.....	67
1.2.- ESTUDIO DEL CONTENIDO MINERAL EN HASMC.....	68
1.3.- EVALUACIÓN DE MARCADORES GÉNICOS DE DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA.....	72
1.4.- ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA.....	77
1.5.- ESTUDIO DEL EFECTO DEL SUERO URÉMICO SOBRE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA.....	78

1.5.1.- <i>Actividad metabólica mitocondrial por ensayo XTT</i>	78
1.5.2.- <i>Contaje celular</i>	79
1.5.3.- <i>Influencia del suero urémico sobre la capacidad de síntesis de DNA de HASMC</i>	80
1.6.- APOPTOSIS	81
1.7.- ESTUDIO DEL EFECTO DEL SUERO URÉMICO SOBRE LA CAPACIDAD DE MIGRACIÓN.....	82
PARTE 2.- REMODELADO DE LOS CANALES IÓNICOS EN HASMC DURANTE LA UREMIA.	84
2.1.- REMODELADO DE LA EXPRESIÓN DE SUBUNIDADES DE CANALES IÓNICOS INDUCIDA POR SUERO URÉMICO EN HASMC	84
2.1.1.- <i>Expresión relativa de canales iónicos en HASMC en condiciones control</i>	84
2.2.2.- <i>Cambios en la expresión de los canales iónicos tras la exposición de HASMC a suero urémico</i>	87
2.2.- CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS CORRIENTES DE K ⁺ ACTIVADAS POR VOLTAJE Y POR CALCIO EN HASMC.....	90
2.3.- CAMBIOS DE CONCENTRACIÓN DE CA ²⁺ INTRACELULAR INDUCIDOS POR EL SUERO URÉMICO EN HASMC.....	92
2.4.- EFECTO DEL BLOQUEO DEL CANAL Kv1.3 SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LAS HASMC EN CONDICIONES URÉMICAS.....	94
2.5.- EFECTO DEL BLOQUEO DEL CANAL Kv1.3 Y EL CANAL ENAC SOBRE LA MIGRACIÓN DE LAS HASMC	95
2.6.- PAPEL DEL CANAL Kv1.3 SOBRE LA CALCIFICACIÓN DE HASMC INDUCIDA POR UREMIA.....	97
VI.- DISCUSIÓN.....	103
VII.- CONCLUSIONES	117
VIII.- BIBLIOGRAFÍA.....	121

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1.- ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

La Enfermedad Renal Crónica (ERC) se ha convertido en un importante problema de salud pública a nivel mundial: existe un incremento progresivo de los pacientes que inician tratamiento sustitutivo renal y, por otra parte, se ha detectado una prevalencia creciente de ERC en la población general (Levey et al. 2007). Además, la ERC afecta a un porcentaje significativo de la población debido, fundamentalmente, a que sus causas principales residen en trastornos de alta prevalencia, como son la edad avanzada, la hipertensión arterial, la diabetes y la enfermedad vascular. Estos pacientes tienen un riesgo cardiovascular elevado y sufren una alta morbimortalidad por eventos cardiovasculares que, probablemente, tienen mayor impacto para la salud que la evolución de la propia enfermedad renal.

1.1.- Definición

La enfermedad renal crónica se refiere, de forma genérica, a un conjunto de enfermedades que afectan a la estructura y función renal. La variabilidad de sus manifestaciones clínicas son consecuencia de su etiopatogenia, de las distintas estructuras del riñón que pueden verse afectadas (glomérulo, vasos, intersticio o túbulos), de la severidad y del grado de progresión (Levey et al. 2007; de Nefrología 2012). En el año 2002, la *National Kidney Foundation* (NKF, EE.UU.) propuso, a través de las guías de práctica clínica K/DOQI (*Kidney Disease Outcome Quality Initiative*), una definición y una clasificación de la ERC con el objetivo de unificar criterios y facilitar de forma sencilla y práctica el diagnóstico precoz de la enfermedad, basada en estadio de severidad, definidos por el filtrado glomerular (FG) además del diagnóstico clínico (National Kidney Foundation 2002). Todas las guías posteriores, incluyendo la guía KDIGO 2012 (*Kidney Disease Improving Global Outcomes*) (Levey and Coresh 2012; 2012), han utilizado como definición de ERC, independientemente de su etiología, como la presencia durante al menos tres meses de:

- ◆ FG inferior a 60 ml/min/1,73 m²

- ◊ o lesión renal, definida por la presencia de anomalías estructurales o funcionales del riñón, que puedan provocar potencialmente un descenso del FG.

La lesión renal se puede detectar directamente mediante estudio histológico de biopsias renales o de forma indirecta por la presencia de albúmina en la orina, alteraciones en el sedimento urinario, alteraciones en el volumen o composición de electrolitos u otros componentes del fluido extracelular debido a la patología tubular, o a través de técnicas de imagen.

Las nuevas guías K/DIGO 2012, introducen una serie de modificaciones: “La ERC comprende las anomalías de la estructura o la función renal que persisten durante más de 3 meses con implicaciones para la salud y se clasifica en función de la causa, filtrado glomerular y rango de albuminuria”. Con esto quieren decir que aunque en el riñón existen diversas anomalías estructurales o funcionales, no todas afectan la salud. Otro rasgo a destacar es que la nueva clasificación abarca la causa y la gravedad de la enfermedad. Destacan la importancia de identificar la causa de la ERC para predecir la evolución y orientar la elección del tratamiento etiológico. La gravedad está expresada por el nivel de FG y la albuminuria y está relacionada con el riesgo de resultados adversos, incluyendo la muerte y la afectación del riñón.

1.2.- Categorías de la enfermedad

El daño renal o el nivel de función renal, independientemente de la causa de la enfermedad renal, determinan los estadios de evolución.

La progresión de la ERC queda recogida tanto en las guías K/DOQI como en las de la Sociedad Española de Nefrología (SEN) donde se clasifica a la enfermedad en 5 categorías (sustitución del término estadio) basándose en el nivel de FG y se crea una nueva subdivisión de la categoría 3 (30 a 59 ml/min/1,73 m²) en categoría G3A (45 a 59 ml/min/1,73 m²) y categoría G3B (30 a 44 ml/1,73 m²).

Tabla 1. Clasificación de las categorías de la ERC según las guías K/DOQI 2012.

Categorías	Descripción	FG (ml/min/1,73m²)
1	Daño renal [†] con FG normal	≥ 90
2	Daño renal [†] con FG ligeramente disminuido	60-89
3A	FG ligero a moderadamente disminuido	59-45
3B	FG moderado a gravemente disminuido	44-30
4	FG gravemente disminuido	15-29
5	Fallo renal	<15
5D		Diálisis

[†] Daño renal: alteraciones patológicas o marcadores de daño, fundamentalmente una proteinuria/albuminuria persistente (índice albúmina/creatinina > 30 mg/g aunque se han propuesto cortes sexo-específicos en > 17 mg/g en varones y 25 mg/g en mujeres); otros marcadores pueden ser las alteraciones en el sedimento urinario y alteraciones morfológicas en las pruebas de imagen.

1.3.- Etiología

En la actualidad, la patología vascular y la diabetes son las dos principales causas de enfermedad renal en todo el mundo (Perneger 1994; Haroun 2003), relegando a las infecciones a un segundo plano, al menos en el mundo occidental (Hemmelgarn et al. 2006). Dentro de las enfermedades vasculares renales, la mayor parte de los casos corresponde a procesos de nefroangioesclerosis, tradicionalmente relacionados con hipertensión arterial, pero actualmente más relacionados con arterioesclerosis generalizada y envejecimiento (AvenidañoHernando 2008).

2.- LA ENFERMEDAD RENAL COMO FACTOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR

Existe una estrecha relación entre la reducción de la función renal y el incremento del riesgo cardiovascular, quedando claramente establecido que la disminución del FG es un predictor de episodios cardiovasculares y de mortalidad en pacientes con enfermedad cardiovascular (ECV) establecida, en individuos con un elevado riesgo cardiovascular, así como también en la población general (Tonelli et al. 2006). El estudio retrospectivo realizado por Go *et al.* (2004) evaluó el riesgo cardiovascular en pacientes con leves descensos del filtrado glomerular. El seguimiento en años posteriores demostró que solo un 1% de los pacientes llegaría a fases

avanzadas de insuficiencia renal pero sin embargo, entre un 19% y un 24% con ERC leve-moderada moriría de alguna complicación vascular en los siguientes cinco años (Go et al. 2004). Es por ello por lo que las guías clínicas de diferentes sociedades científicas incluyeron a la ERC como un factor independiente de riesgo cardiovascular, siendo estos pacientes clasificados como de muy alto riesgo, equiparándolos a los pacientes diabéticos o a aquellos con enfermedad coronaria (Chobanian 2003; Sarnak, Levey, Schoolwerth, Coresh, Culleton, Hamm, McCullough, Kasiske, Kelepouris, Klag, Parfrey, Pfeffer, Raij, Spinosa, Wilson, et al. 2003; Mancía et al. 2007).

La causa más importante de mortalidad en los pacientes con insuficiencia renal avanzada y en aquellos en diálisis es la ECV. La mortalidad anual de origen cardiovascular en estos pacientes es aproximadamente un 9%, lo que representa un riesgo entre 20 y 30 veces superior al de la población general. Más aún, la mortalidad de origen cardíaco entre los pacientes en diálisis menores de 45 años es alrededor de 100 veces mayor que la de la población general (Foley, Parfrey, and Sarnak 1998). Ello se traduce en el hecho de que las tasas de mortalidad en los pacientes en diálisis en el rango de menor edad (< 25 años) es equivalente a las observadas en individuos de entre 75 y 85 años de la población general (Sarnak and Levey 1999).

Finalmente, estudios prospectivos a largo plazo en pacientes con ERC han mostrado que estos pacientes tienen mucha mayor probabilidad de morir por un evento cardiovascular que de alcanzar un estadio de insuficiencia renal terminal y diálisis (45.7% vs 19.9% a los 5 años, respectivamente) (Keith et al. 2004). Por tanto existe evidencia sólida que sustenta el hecho de que ERC en estadios precoces, independientemente de la etiología, es un fuerte predictor de ECV, y que el riesgo cardiovascular asociado a la ERC aumenta a medida que progresa el deterioro de la función renal (Go et al. 2004; Parikh et al. 2008).

Entre los factores de riesgo de cardiovascular en ERC, se incluyen los tradicionales de la población general, definidos en el estudio Framingham, y que son principalmente la edad, la dislipemia, la diabetes o la resistencia a la insulina, la hipertensión y el tabaquismo (Sarnak et al. 2002). Además, se encuentran factores de riesgo propios de la uremia. La uremia es un síndrome clínico generado por la insuficiencia renal y caracterizado por la acumulación en el plasma de productos del metabolismo de los aminoácidos (urea, creatinina) y de otras rutas metabólicas,

acumulación de sustancias que en condiciones normales no son patogénicas pero que pasan a ser “toxinas urémicas”. La uremia se caracteriza además por alteraciones en el metabolismo mineral, principalmente hiperfosfatemia con hiper o hipocalciuria, defectos en el manejo del volumen extracelular y alteraciones en los niveles circulantes de hormonas como vitamina D, aldosterona o parathormona (Meyer and Hostetter 2007). Entre los factores de riesgo que se han asociado a la uremia se encuentran la inflamación, la malnutrición, el estrés oxidativo, la formación aumentada de productos de glicosilación avanzada (AGEs), la hiperhomocisteinemia, la acumulación de inhibidores endógenos de la síntesis de óxido nítrico, las alteraciones del metabolismo calcio-fósforo y el hiperparatiroidismo, cuya prevalencia aumenta a medida que disminuye la función renal, contribuyendo al exceso de riesgo cardiovascular en la ERC (Sarnak, Levey, Schoolwerth, Coresh, Culeton, Hamm, McCullough, Kasiske, Kelepouris, Klag, Parfrey, Pfeffer, Raij, Spinosa, and Wilson 2003; Baumelou et al. 2005).

3.- REMODELADO ARTERIAL DURANTE LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR ACELERADA EN LA ERC

La ECV en la ERC tiene un componente de cardiomiopatía y otro de arteriopatía urémica. Las manifestaciones clínicas del miocardio y la remodelación vascular incluyen: hipertrofia ventricular izquierda (HVI), aumento de la presión del pulso y enfermedad isquémica del corazón, los cuales son factores de riesgo independientes de mortalidad en pacientes con insuficiencia renal (1992; Klassen et al. 2002; Zoccali et al. 2001) (*U.S. Renal Data System*)

Tanto la hemodinámica como el medio metabólico presente en la ERC facilitan la remodelación arterial. Las anomalías estructurales resultantes incluyen cambios en la luz arterial, así como en los componentes de la pared de los vasos (Guérin et al. 2008). Por ello, la arteriopatía urémica abarca la aterosclerosis y la arteriosclerosis.

3.1.- Estructura de la pared arterial

La estructura de la pared de una arteria consta de tres capas concéntricas: túnica íntima, túnica media y túnica adventicia (Figura 1).

La capa más interna o túnica íntima se encuentra en contacto con la sangre y la conforman células epiteliales planas altamente especializadas que constituyen el endotelio vascular. Éste descansa sobre una lámina basal, por debajo de la cual hay una fina capa de tejido conectivo laxo denominada capa subendotelial que puede no estar presente en los vasos de menor calibre. La túnica íntima es relativamente más gruesa en arterias grandes, y puede contener algunas células de músculo liso en vasos de gran o de medio calibre.

La capa intermedia o túnica media contiene un único tipo celular dispuesto helicoidalmente, las células musculares lisas, embebidas en una matriz de elastina, fibras de colágeno y proteoglicanos. Existen dos capas compuestas por fibras de elastina denominadas lámina elástica externa y lámina elástica interna, las cuales delimitan la túnica media. Estas capas confiere al vaso elasticidad y capacidad para extenderse y encogerse, amortiguando los cambios en el flujo sanguíneo.

Finalmente, en la parte más externa de la arteria se encuentra la adventicia, constituida por tejido conectivo laxo constituido por fibroblastos y fibras de colágeno que se disponen paralelas al eje longitudinal del vaso sanguíneo. Por esta capa transcurren vasos de pequeño calibre denominados *vasa vasorum*, que irrigan las células de la túnica media (Aronson, Ward, and Connolly 2012; Pocock and Richards 2005).

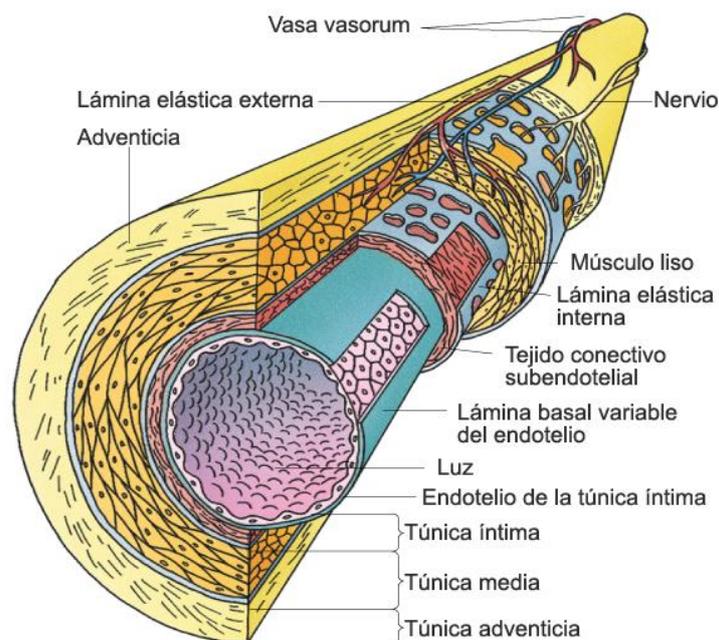


Figura 1. Estructura de la pared arterial.

3.2.- La célula del músculo liso vascular (VSMC)

La célula de músculo liso vascular proviene del linaje mesodérmico mayoritariamente (Kumar and Owens 2003) y expresa un repertorio de proteínas contráctiles, canales iónicos y moléculas de señalización claramente dirigidos a la función de la contractilidad (Owens 1995). Además de su función contráctil, también interviene en procesos de reparación y juega un papel muy importante en el desarrollo de la enfermedad vascular.

Los precursores mesenquimales además de dar lugar a células de músculo liso, se diferencian en adipocitos, mioblastos, condrocitos y osteoblastos (Iyemere et al. 2006). Esto es de gran importancia ya que este origen celular tiene consecuencias patológicas. Dado su alto potencial y plasticidad, las VSMCs son capaces de sufrir cambios fenotípicos y adquirir un diverso rango de características de otras líneas mesenquimales (Shanahan and Weissberg 1999; Tintut et al. 2003; Tyson et al. 2003; Davies et al. 2005). Diversos estímulos fisiológicos y factores locales presentes en ambientes patológicos pueden conducir a una inadecuada diferenciación o incluso transdiferenciación (King et al. 2003), pudiendo estos fenotipos contribuir al desarrollo de patologías como la calcificación (transdiferenciación osteogénica).

El proceso de diferenciación de las VSMC comprende una gran variedad de fenotipos que se manifiestan en los distintos estadios del desarrollo. De hecho, en los organismos adultos las células no están totalmente diferenciadas y aún son capaces de inducir cambios en su fenotipo (modulación fenotípica) en respuesta a cambios en su entorno (Owens 1995).

La modulación fenotípica de las VSMC puede suceder como respuesta a los daños vasculares de diversas etiologías. En estas circunstancias, las VSMC contráctiles incrementan dramáticamente las tasas de proliferación, migración, y aumenta la capacidad sintética, es decir, el fenotipo no contráctil. Esta plasticidad fenotípica juega un papel crítico en la reparación vascular y en la angiogénesis. Por el contrario, una desventaja del alto grado de plasticidad de las VSMC es que las predispone a cambiar su fenotipo cuando se ven sometidas a un entorno anormal, y en algunos casos a la adquisición de características que contribuyen al desarrollo y/o progresión de la enfermedad vascular. Existen pruebas concluyentes de que los cambios fenotípicos de las VSMC desempeñan un papel crucial en un gran número de enfermedades, como

hipertensión, estenosis consecuente a la angioplastia y arteriopatía post-transplante (Owens, Kumar, and Wamhoff 2004; Zhang et al. 2001).

3.3.- Aterosclerosis y Arteriosclerosis asociadas a ERC

La aterosclerosis está asociada con la fibrosis y calcificación de la capa íntima y por tanto con la disminución del diámetro de la luz del vaso por formación de placas de ateroma calcificadas (Lusis 2000). Las características morfológicas de la placa de ateroma en pacientes con ERC son distintas a las de la población no renal, e incluyen una mayor calcificación y un aumento del espesor de la íntima y de la media (U. Schwarz et al. 2000). Un estudio retrospectivo evidenció que la incidencia de accidentes cardiovasculares ateroscleróticos era tres veces superior en pacientes urémicos, tanto en prediálisis como en diálisis, respecto a la población general de edad similar, sugiriendo que el estado urémico *per se* se asocia a una aterosclerosis acelerada (Jungers et al. 1999).

Por otra parte, en la arteriosclerosis se observa la calcificación y el aumento de grosor de la capa media de la pared de los vasos con el incremento de la rigidez en arterias grandes y medianas (K.-C. Lu et al. 2014). El remodelado en el árbol vascular en los pacientes urémicos se caracteriza por dilatación e hipertrofia de la pared de las grandes arterias (Barenbrock et al. 1994; London et al. 1996) y afecta principalmente a las arterias elásticas como la aorta o la carótida común (Kawagishi et al. 1995; Savage et al. 1998). Se ha observado en experimentos *in vitro* realizados con arterias de pacientes urémicos que la arterioclerosis provoca el engrosamiento fibroelástico de la íntima y de la capa media, el aumento del número de células musculares lisas y del volumen de la matriz extracelular, con una disminución relativa de las fibras elásticas, así como del aumento del contenido de calcio y calcificación de las mismas (London et al. 1993; Fishbane, Natke, and Maesaka 1996; N. C. Edwards et al. 2006).

A pesar de la asociación establecida entre el grado de rigidez arterial y la carga de la placa de ateroma (Popele et al. 2007), estudios recientes no han podido demostrar una influencia significativa de los factores de riesgo aterosclerótico tradicionales en el desarrollo de la arteriosclerosis. Esto sugiere que serían factores alternativos, específicos de la uremia, los que conducirían a la arterioesclerosis (Cecelja and Chowienczyk 2009).

4.- CALCIFICACIÓN VASCULAR

La calcificación vascular es uno de los principales factores de riesgo de mortalidad cardiovascular, particularmente en pacientes con enfermedad renal crónica (Guerin et al. 2000; London et al. 2003; Blacher et al. 2001; Goodman et al. 2000). En pacientes urémicos, la calcificación vascular está causada por un desequilibrio en el metabolismo mineral, incluyendo hiperfosfatemia, hipercalcemia y niveles anormales de PTH (Cozzolino et al. 2005).

4.1.- Tipos de calcificación vascular en la ERC

Numerosos estudios han demostrado que la mayoría de los pacientes en el último estadio de ERC presentan una calcificación significativa en arterias coronarias y aorta, y cerca del 50 % presentan calcificación valvular (Hujairi, Afzali, and Goldsmith 2004).

Clásicamente, se han distinguido dos tipos de calcificación arterial dependiendo de dónde se deposite el fosfato cálcico. Se habla entonces de calcificación de la túnica íntima, asociada a la placa de ateroma y de calcificación de la túnica media, también denominada esclerosis de Mönckeberg, ligada a la rigidez vascular por mineralización de las fibras elásticas y la arteriosclerosis observada con la edad, diabetes y ERC.

Ambos tipos de calcificación pueden ocurrir independientemente, observándose ambos tipos en pacientes con ERC. De hecho, resultados recientes parecen sugerir que esta clasificación no sería tan clara y que ambos tipos de calcificación serían manifestaciones del proceso aterosclerótico.

4.1.1.- Calcificación de la íntima

Este tipo de calcificación está asociada a zonas de placas ateroscleróticas, donde tiene lugar una combinación de necrosis celular, inflamación y deposición de colesterol, fosfolípidos y lipoproteínas (Demer 2002; Boström et al. 1993). La formación del ateroma comienza con una lesión o disfunción endotelial como consecuencia de diversos factores, como hiperlipidemia, tabaquismo, hipertensión arterial, entre otros. Tras la lesión inicial sobreviene un proceso inflamatorio y de necrosis celular en el cual se produce la atracción, adhesión y migración de monocitos y linfocitos T a través del

endotelio y reclutamiento de macrófagos que acumulan grandes cantidades de ésteres de colesterol, dando lugar a una estría grasa (Lusis 2000). Conjuntamente, las VSMC de la media migran hacia la íntima, engrosando considerablemente la pared arterial, y elaboran cuerpos apoptóticos y vesículas de matriz mineralizante. La capa fibrosa formada puede romperse (Libby 2002), exponiendo a la circulación los componentes de la masa central grasa y provocando la formación de un trombo que puede causar un accidente cardiovascular agudo (Badimon et al. 1991). Consecutivamente, se produce un hecho similar a la osificación endocondral, con intermediario de cartílago (Hunt et al. 2002). La condrogénesis precede a la inducción osteoblástica y la formación de hueso (Stary 2000).

4.1.2.- Calcificación de la media arterial

La calcificación en la túnica media fue descrita por primera vez en 1903 por J.G. Mönckeberg, quien la definió como un extenso acúmulo mineral en la túnica media que en ocasiones se extiende hasta la lámina elástica interna (Micheletti et al. 2008).

Durante las primeras etapas, este tipo de calcificación presenta una morfología típica de depósitos lineales de fosfato cálcico en la túnica media, próximos a la lámina elástica. Mientras que en lesiones avanzadas, los depósitos se disponen a lo largo de la media en forma de anillos, llegando a formar matriz ósea cuando la calcificación es muy extensa (Shanahan et al. 1999).

En un estudio con muestras de arteria epigástrica inferior de 41 pacientes transplantados renales se concluyó que la calcificación de la media se asocia o va precedida por la producción de proteínas osificantes por parte de las células del músculo liso vascular. Por tanto hay implicado un proceso activo del que la uremia es desencadenante, ocasionando el depósito de estas proteínas que conllevan la calcificación vascular posterior (Chen, Duan, O'Neill, and Moe 2006). A diferencia de la calcificación de la íntima, la calcificación medial ocurre por un proceso que conlleva la formación de vesículas de matriz como sucede en la formación del hueso intramembranoso, donde no se requiere un intermediario de cartílago (Stary 2000).

Este tipo de calcificación es responsable del aumento de rigidez y con ello el descenso de la capacidad amortiguadora de los vasos, lo que provoca un aumento de la presión del pulso (Dao et al. 2005) y favorece la hipertrofia del ventrículo izquierdo,

comprometiendo así la perfusión coronaria (Marchais, Guerin, and London 1992; Guerin et al. 2000).

4.2.- Fisiopatología de la calcificación vascular en la ERC

Como se ha expuesto, la calcificación puede aparecer tanto en la túnica íntima como en la túnica media, e incluso simultáneamente en ambas localizaciones en el mismo paciente, siendo la calcificación de la media un característica importante y temprana de calcificación vascular asociada a ERC. La fisiopatología de este tipo de calcificación en ERC es compleja y está vinculada a la presencia de toxinas urémicas, a las anomalías en el metabolismo mineral (hiperfosfatemia con hiper o hipocalcemia), además de hipoparatiroidismo y deficiencia de vitamina D (Shobeiri, Adams, and Holden 2010).

Inicialmente, la calcificación vascular era considerada como la consecuencia de un depósito pasivo de sales minerales en la pared vascular. Sin embargo, los avances en los últimos años han demostrado que la calcificación vascular es un fenómeno activo altamente regulado, de forma semejante a la mineralización y metabolismo del hueso. Se han encontrado factores de regulación ósea en los vasos sanguíneos, particularmente en lugares de calcificación medial, así como inhibidores de la calcificación en vasos sanos (Boström et al. 1993; Tyson et al. 2003; Shanahan and Weissberg 1999).

Se han descrito dos procesos patológicos diferentes involucrados en la esclerosis de Mönckeberg, asociados a los depósitos minerales. Por un lado, un proceso degenerativo que daría lugar a apoptosis o necrosis de las VSMC de la túnica media, y por otro, un proceso de transdiferenciación de las VSMC, las cuales expresarían un fenotipo osteogénico.

En cuanto a los mecanismos desencadenantes, actualmente se conoce que van más allá de la formación de depósitos de Ca y P por mecanismos pasivos debido a los desequilibrios en metabolismo mineral, particularmente la hiperfosfatemia, que se presenta en la ERC.

El aumento de los niveles de Ca, P y del producto fosfocálcico (Ca x P) promueve la precipitación de sales minerales favoreciendo la formación de núcleos de cristales de hidroxiapatita y su crecimiento (K.-C. Lu et al. 2014; Block and Port 2000). Estos niveles

elevados son frecuentes en pacientes con ERC y correlacionan significativamente con un incremento en el riesgo de eventos y de mortalidad por enfermedad cardiovascular (Block et al. 1998). Diversos estudios han demostrado que las VSMC no mineralizan espontáneamente en cultivos *in vitro*, pero la mineralización puede inducirse aumentando los niveles de fosfato en el medio (Jono et al. 2000; Giachelli et al. 2005; Giachelli et al. 2001). Cuando los niveles de fosfato del medio de cultivo se elevan hasta niveles similares a los encontrados en individuos urémicos (> 2 mM), la matriz extracelular que rodea las VSMC desarrolla focos de mineralización con características similares a las observadas en hueso y en calcificaciones vasculares *in vivo*, incluyendo la presencia de fibras de colágeno y vesículas de matriz calcificantes e hidroxapatita. Pero, no se trata simplemente de un proceso pasivo de precipitación, sino que implica un cambio fenotípico de las VSMC con aumento de marcadores osteocondrogénicos (Giachelli 2004; Johnson, Leopold, and Loscalzo 2006; K.-C. Lu et al. 2014).

Se ha propuesto que el cotransportador de fosfato dependiente de sodio, Pit-1 permite la acumulación de fósforo dentro de la célula, que sirve como señal para la expresión de genes osteogénicos, en la patogénesis de la CV (Crouthamel et al. 2013). Esta teoría se planteó a partir de los estudios en los que se había observado que la inhibición del transporte de fosfato inhibía la expresión de osteogénes y evitaba la calcificación vascular (Jono et al. 2000; Li 2006). Así, la hiperfosfatemia conduciría a la transformación celular hacia un fenotipo osteoblástico con mayor expresión de proteínas implicadas en la formación del hueso como el factor de transcripción RUNX2 (también llamado CBFA1) (Ruffenach et al. 2016; Speer et al. 2010; Sun et al. 2012) y osteocalcina (Chen, Duan, O'Neill, and Moe 2006; Che et al. 2013), que favorecerían el proceso de calcificación (Jono et al. 2000), junto con la pérdida de marcadores de células de músculo liso, como α -actina y transgelina (TAGLN, también llamada SM22 α) (Steitz et al. 2001), y degradación de la elastina (Pai et al. 2011; Proudfoot et al. 2000). Lo que lleva a concluir que la calcificación observada en pacientes con ERC es en parte consecuencia de la transformación fenotípica de las VSMC.

Sin embargo, estudios recientes han demostrado que el transporte de fosfato no se ve incrementado en condiciones hiperfosfatémicas, debido a la baja capacidad que tienen las VSMC de transportar Pi, lo que implica que éste se encuentre saturado en condiciones normofosfatémicas, pudiéndose incrementar únicamente en el caso de que

se produjera una sobreexpresión de los transportadores (incremento de la V_{max}), cosa que no se ha observado en VSMC (Villa-Bellosta et al. 2007). Asimismo, se ha demostrado que inductores de la calcificación, como el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) y el factor derivado de plaquetas (PDGF), son capaces de incrementar la calcificación y la expresión de osteogénesis en VSMC sin aumentar el transporte de fosfato (Villa-Bellosta and Sorribas 2009). Además, se ha observado que en presencia de concentraciones elevadas de fosfato en el medio de cultivo, pero con condiciones que impiden la calcificación, no se produce la sobreexpresión de genes osteoblásticos (Villa-Bellosta, Millan, and Sorribas 2010). Por lo tanto, según esta teoría la calcificación vascular no se desarrollaría como consecuencia de la transición osteoblástica del músculo inducida por el incremento del transporte de P_i como consecuencia de la hiperfosfatemia (Villa-Bellosta et al. 2007).

5.- IMPLICACIÓN DE CANALES IÓNICOS EN LA MODULACIÓN FENOTÍPICA DE VSMC

Las VSMC son células dinámicas que participan activamente en el remodelo arterial mediante numerosos procesos entre los que se incluyen el crecimiento celular (hiperplasia e hipertrofia), la elongación y reorganización celular, la apoptosis y/o la alteración de la composición de la matriz extracelular (Schiffrin and Touyz 2004; Willis et al. 2004).

En condiciones fisiológicas las VSMC se mantienen quiescentes, rara vez proliferan y migran. Sin embargo, en respuesta a estímulos patológicos como lesiones o estrés oxidativo, entre otros, se produce un cambio hacia un fenotipo sintético caracterizado por una disminución de la contractilidad y por un aumento de la tasa proliferativa, de la migración (Owens, Kumar, and Wamhoff 2004; Owens 1995) y de la síntesis de proteínas de la matriz extracelular, además, de una modificación en el patrón de expresión génica global de las VSMC (Kaplan-Albuquerque et al. 2005).

En la actualidad, se han asociado cambios de expresión génica en canales iónicos a enfermedades de origen cardiovascular, donde se ve afectada la proliferación y el fenotipo contráctil, como la aterosclerosis (Tiwari et al. 2006; Lin et al. 2016), la

hipertensión pulmonar (Mandegar and Yuan 2002), las arritmias cardiacas (Hsueh et al. 2014) o la miocardiopatía hipertrófica (Tomaselli and Marbán 1999).

5.1.- Canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana encargadas del flujo pasivo de iones entre el medio intra y extracelular; estos canales tienen la característica de ser selectivos para diferentes iones, como sodio (Na^+), potasio (K^+), cloro (Cl^-) y calcio (Ca^{2+}). Los canales iónicos son responsables, entre otras funciones, del mantenimiento del potencial de membrana, de la contracción muscular (Jackson 2000), permiten la regulación del volumen celular, de la señalización química y son los encargados de la generación y propagación del impulso nervioso. De modo que, la alteración en estas proteínas es la responsable de la aparición de múltiples enfermedades (canalopatías) en diversos tejidos (Hübner and Jentsch 2002).

Los canales se expresan en la membrana celular, formando una estructura homomérica o multimérica en torno a un poro central. La apertura del poro, en respuesta a un estímulo, produce la conducción de iones a favor del gradiente electroquímico (Hille 2001). La activación del canal puede deberse a estímulos físicos, entre los cuales se encuentran los cambios en el potencial de membrana (Bezanilla 2005), en cuyo caso se habla de canales iónicos dependientes de voltaje, o bien por estímulos químicos. Existen canales que son activados tanto por voltaje como por ligandos químicos; entre ellos se encuentran los canales de potasio de alta conductancia dependientes de voltaje y calcio (Vergara, Latorre, and Marrion 1998; McManus and Magleby 1991; Blatz and Magleby 1987), denominados canales BK, MaxiK *Slo 1* (Y. Tanaka et al. 2004).

5.2.- Función de los canales iónicos en el músculo liso vascular

En el músculo liso vascular existen al menos cinco tipos diferentes de canales de K^+ : los canales de K^+ activados por voltaje (K_v), canales de K^+ sensibles a Ca^{2+} de gran conductancia (BK_{Ca}) o pequeña conductancia (SK), canales de K^+ rectificadores de entrada (K_{ir}) y canales de K^+ de dominio poro en tándem ($\text{K}_{2\text{P}}$) (Murphy and Brayden 1995; Nelson and Quayle 1995; Jackson 2005a; Olschewski et al. 2006). También se encuentran dos tipos de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v): el tipo L y el tipo T (Davis and Hill 1999; Akbarali 2005); dos tipos de canales de Cl^- : sensibles a Ca^{2+}

(Cl_{Ca}) y sensibles a volumen (Cl_{vol}) (Nelson et al. 1997; Yamazaki et al. 1998); canales operados por depósitos de Ca²⁺ (SOCC) y, finalmente, canales catiónicos activados por estiramiento (SACC) (Setoguchi et al. 1997; Berridge 1997). Todos ellos se expresan en las membrana plasmática y están implicados en el tono vascular.

El potencial de membrana de las células de músculo liso vascular varía dentro del rango comprendido entre -45 y -60 mV (Bratz et al. 2002). Su valor viene determinado por el balance entre los flujos de entrada (fundamentalmente de Na⁺ y Ca²⁺, que tienden a despolarizar la célula) y los flujos de salida (fundamentalmente de K⁺, que tiende a hiperpolarizar, con una mínima contribución despolarizante del Cl⁻). Puesto que las células en reposo presentan una elevada permeabilidad para el K⁺, parece lógico postular que alteraciones en la expresión y/o regulación de los canales de K⁺ produzcan cambios en el potencial de membrana, y en última instancia, en el tono vascular o en el fenotipo celular.

5.3.- Canales iónicos implicados en el control del tono vascular

El tono vascular juega un papel importante en la regulación de la presión sanguínea y en la distribución del flujo sanguíneo entre y dentro de los tejidos y órganos del cuerpo humano. La regulación de la actividad contráctil de las VSMC en la circulación sistémica depende de una compleja interacción entre estímulos vasodilatadores y vasoconstrictores producto de las hormonas circulantes, neurotransmisores, factores derivados del endotelio y la presión sanguínea.

Como en todas las células de músculo liso, el proceso de contracción en las VSMC depende directamente de la concentración intracelular de Ca²⁺, que junto con el ATP es el determinante fundamental para la activación del mecanismo contráctil formado por las moléculas de actina y miosina (Blaustein, Kao, and Matteson 2011; Webb 2003). Por tanto, aquellos procesos que regulen la concentración de Ca²⁺ intracelular serán esenciales para el control del estado contráctil de las VSMC y, consecuentemente, del tono vascular. Los canales iónicos participan activamente en este proceso. Por un lado, los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (Nelson and Quayle 1995; Milesi et al. 1999; X. J. Yuan 1995), o de depósitos intracelulares median el acceso directo de Ca²⁺ al citoplasma (Jackson 2000). Por otro lado, como se indicó en el apartado anterior, el flujo de iones a través de los diferentes tipos de canales iónicos en la membrana plasmática

regula el potencial de membrana. El potencial de membrana, junto con los niveles de Ca^{2+} citosólico, regula a su vez el flujo de Ca^{2+} desde el exterior celular, y por tanto también modula el funcionamiento de la maquinaria contráctil (Fleischmann, Washabau, and Kotlikoff 1993; X. J. Yuan et al. 1996; McGahon et al. 2007).

Dentro de los canales iónicos presentes en las VSMC (ver apartado anterior), los Kv son los principales reguladores del potencial de reposo. Las VSMC expresan una gran variedad de canales Kv cuya relevancia depende del lecho vascular (Y. Lu et al. 2002). Los canales Kv se activan por despolarización de la membrana (Ko et al. 2008), entre otros mecanismos (X. J. Yuan et al. 1996; Kwak et al. 1999), y conforman junto al canal BK_{Ca} , un importante mecanismo de retroalimentación negativo del potencial de membrana (Ghatta et al. 2006; Nelson and Quayle 1995; Ko et al. 2008). Por un lado, la activación de canales Kv por despolarización produce el flujo de iones K^+ al espacio extracelular, lo cual provocará la hiperpolarización de la membrana, favoreciéndose la vasodilatación. Al contrario, el cierre de estos canales produce despolarización de la membrana produciéndose la vasoconstricción (Jackson 2000) (Figura 2). Asimismo, los canales BK_{Ca} se activan tanto por la despolarización de la membrana (Jackson and Blair 1998) como por los incrementos de calcio intracelular (Pérez et al. 1999; Carl, Lee, and Sanders 1996), evitando la vasoconstricción excesiva y previniendo el vasoespasmó (Jaggar et al. 2000) a través de un mecanismo de retroalimentación que suprime el exceso de actividad mecánica muscular (Y. Tanaka et al. 2004). En el caso de estos canales, es interesante resaltar que su actividad es responsable de producir relajación vascular aún cuando el incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular esté localizado en pequeñas áreas celulares, como consecuencias de liberaciones espontáneas locales de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico (*calcium sparks*), debido a que las mismas generan corrientes transitorias espontáneas de salida de K^+ (STOC) a través de canales BK_{Ca} , derivando igualmente en la hiperpolarización de la membrana celular (Ledoux 2006; Jaggar et al. 2000; Jaggar, Stevenson, and Nelson 1998).

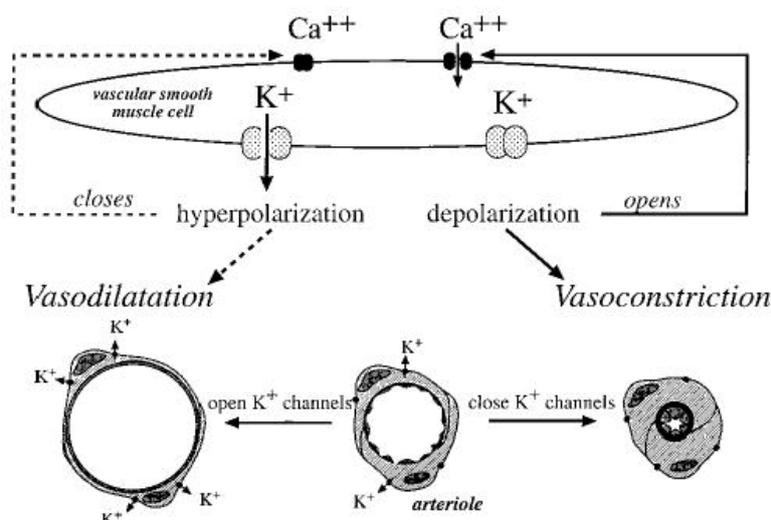


Figura 2. Ilustración esquemática de una VSMC (arriba) y secciones arteriolas (abajo) mostrando que el efecto de la activación de canales de K^+ conduce a la difusión de iones K^+ al exterior celular, produciendo hiperpolarización de la membrana, cierre de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, disminución de la concentración de Ca^{2+} citoplásmico y, en último término, vasodilatación. El cierre de canales de K^+ produce el efecto contrario (modificado de (Jackson 2000)).

Si bien los canales K_v y BK_{Ca} juegan un papel fisiológico esencial en el proceso de contracción, cabe señalar que la función de otros canales también ha sido implicada en el mismo. Por un lado, los canales K_{ir} , activos en condiciones hiperpolarizantes, también contribuyen a la regulación del potencial de reposo de membrana (Hashitani and Suzuki 1997; Martens and Gelband 1996; F. R. Edwards and Hirst 1988). Además, se ha demostrado que los canales K_{ATP} desempeñan un papel crucial en la regulación de tono muscular y en la vasorelajación en condiciones de hipoxia (Kinoshita et al. 2004; Miura 2002).

Los canales de Cl^- , por otro lado, también han sido relacionados con el mantenimiento del tono vascular. Al igual que en el caso del K^+ , la apertura de canales de Cl^- resultará en un flujo del mismo a favor de gradiente hacia el exterior celular, que sin embargo en este caso produce una despolarización y, en último término, vasoconstricción. El cierre de canales de Cl^- produce el efecto contrario. Ambos tipos de canales de Cl^- mencionados en el apartado anterior, Cl_{Ca} y Cl_{VR} , han sido relacionados con el control del tono vascular, si bien su relevancia ha sido objeto de controversia (ver (Jackson 2000) para una discusión más detallada).

Finalmente, cabe destacar que, como se menciona más arriba y en el apartado

anterior, además de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, existen canales SOCC que también regulan la concentración de Ca^{2+} intracelular, cuya identidad molecular, descubierta recientemente, corresponde al complejo STIM-ORAI, que a su vez es regulado por otras proteínas. Puesto que no suponen el tema central de esta Tesis, no nos extenderemos en su descripción. Para una revisión actualizada, ver (Lopez et al. 2016).

Finalmente, se ha propuesto la importancia de canales SACC, cuya identidad molecular, aunque aún objeto de cierta controversia, parece corresponder a los canales de la familia Piezo, activados por cambios en la tensión de la membrana o estiramiento y descubiertos muy recientemente (ver, por ejemplo, (Wu, Lewis, and Grandl 2016; Retailleau et al. 2015).

5.3.1.- Implicación en patologías

En la actualidad se conoce que la alteración o disfunción en los canales iónicos es la causa de un amplio espectro de patologías como la hipertensión, la epilepsia o las arritmias cardíacas, además de estar implicados en algunos trastornos endocrinos, renales y enfermedades óseas (Hübner and Jentsch 2002).

Como ha sido ya mencionado anteriormente, los canales Kv están implicados de forma directa en el mantenimiento del tono basal de las arterias. Consecuentemente, la función anormalmente reducida de estos canales daría lugar a una despolarización y al incremento anómalo del tono vascular asociados a condiciones patológicas como la hipertensión y la hipertrofia (Martens and Gelband 1996; Wellman et al. 2001). Esta asociación está apoyada por un gran número de evidencias experimentales. Así, estudios electrofisiológicos han demostrado que las células musculares lisas de la arteria interlobular de ratas hipertensas presentan alteraciones en el potencial de membrana y en la actividad de los Kv, cuya corriente está reducida significativamente (Martens and Gelband 1996). Igualmente, se ha observado que en arterias pulmonares humanas la expresión génica del canal Kv1.5 se encuentra disminuida en condiciones de hipertensión, con la consecuente reducción en el número de canales Kv funcionales y de la corriente de K^+ (J. X. Yuan et al. 1998).

Por otro lado, se ha descrito que el incremento en la expresión de los canales BK_{Ca} en las VSMC también está asociado a hipertensión (Liu 1997; Jackson 1998; Xu

2005). Igualmente, se ha constatado que la alteración en la expresión de la subunidad beta 1 del canal BK_{Ca}, específica del musculo liso, provoca el aumento del tono vascular produciendo hipertensión (Pluger et al. 2000; Amberg et al. 2003) seguida de hipertrofia ventricular izquierda (Löhn et al. 2001). Otros estudios detectaron que una mutación en el gen de dicha subunidad provocaba un incremento en la función del canal BK, asociando este hecho a la observación de una baja incidencia de hipertensión humana. Asimismo, se ha observado en ratas con hipertensión crónica que la expresión de la subunidad beta 1 está disminuida, siendo la inactivación de la subunidad junto con la supresión del gen BK el mecanismo molecular subyacente al tono vascular patológicamente aumentado (Ledoux 2006).

Además de los canales K_v y BK_{Ca}, cuya relevancia en la regulación del tono vascular ha sido presentada en los apartados anteriores, las deficiencias funcionales de otros canales también han sido asociadas a patologías como la diabetes, isquemia e hipertensión. Éstos incluyen la regulación negativa de canales Kir o la alteración en la expresión génica en arterias de canales K_{ATP} (Mayhan and Faraci 1993).

5.4.- Canales iónicos implicados en el control de la proliferación y migración de VSMC

El estudio en VSMC del perfil de expresión de 87 genes de canales iónicos, entre los cuales se incluían subunidades α , β y γ de canales K_v, subunidades α de canales Cav, canales de Cl⁻ y canales TRP, demostró que estas proteínas participan activamente en la modulación fenotípica, concretamente en la proliferación y en la migración celular (Cidad et al. 2010).

El mecanismo mediante el cual los canales iónicos participan en la proliferación aún no se conoce con exactitud pero, se ha determinado que están involucrados en los diferentes puntos de control del ciclo celular. Concretamente, participan en la generación de señales de Ca²⁺, en los cambios del potencial de membrana y en la exocitosis de factores angiogénicos y de crecimiento (Becchetti 2011).

A pesar de que existen muchos interrogantes sobre el mecanismo, se ha demostrado que los canales de K⁺ juegan un papel muy importante en la proliferación celular (Camacho 2006; Pardo 2004), siendo proteínas necesarias en este proceso ya

que, su bloqueo provoca la disminución de la proliferación en diversos tipos celulares (Wonderlin and Strobl 1996; Czarnecki et al. 2000).

Es conocido que durante la fase G1 del ciclo celular se produce la hiperpolarización de la membrana celular, facilitando la entrada de Ca^{2+} , señal necesaria para la proliferación (Nilius, Schwarz, and Droogmans 1993). Igualmente, se ha demostrado que durante la fase G1 las células aumentan su volumen y que los canales de K^+ junto con los canales de Cl^- participan en la regulación del volumen celular (Lang et al. 2004), destacando que el aumento del volumen celular es capaz de inhibir el proceso proliferativo (Pardo 2004).

El estudio de Miguel-Velado *et al.* en 2005, demostró la relevancia de los canales Kv en la proliferación de las VSMC de arteria uterina humana, destacando la disminución de la expresión génica de la mayor parte de canales Kv1. Además, la proliferación de estas células se tradujo en un incremento en la expresión del canal Kv3.4 y el bloqueo selectivo de dicho canal fue capaz de disminuir la velocidad de proliferación (Miguel-Velado et al. 2005), deteniendo el ciclo celular tras la fase G2/M. Por tanto, el canal Kv3.4 es necesario en la progresión del ciclo celular y la actividad hiperpolarizante de los canales de K^+ es esencial al menos en las VSMC de arteria uterina (Miguel-Velado et al. 2010).

Es necesario recalcar que la proliferación celular implica un aumento tanto de la expresión como de la función de los canales de K^+ . No solo se ha asociado un incremento en la expresión del canal Kv3.4 durante la proliferación de VSMC, sino que también se han encontrado niveles elevados de KCa3.1 y Kv1.3. Además el bloqueo selectivo de estos canales reduce la proliferación de las VSMC (Jackson 2010). Asimismo, se ha encontrado un incremento en las corrientes del canal Kv1.3 cuyo bloqueo es capaz de inhibir la proliferación y la migración de las VSMC (Cidad et al. 2010).

Otro rasgo importante del canal Kv1.3 es su implicación en procesos de migración que se ve reducida por un bloqueo o por la reducción de su expresión (Cahalan and Chandy 2009). Esto es particularmente importante en la respuesta del sistema inmune donde la migración de los linfocitos T (Matheu et al. 2008) o macrófagos (Gendelman et al. 2009) depende de la función del canal Kv1.3. Por otro lado, se ha puesto en evidencia la relación entre otros canales y el proceso de migración celular, como es el caso del canal epitelial de sodio ENaC cuya inhibición provoca la

inhibición de la migración del músculo liso vascular (Grifoni et al. 2006). La despolarización mediada por este canal estimula la migración provocando la formación de un cable de actina en el borde de la herida (Chifflet, Hernández, and Grasso 2005).

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

La elevada morbi-mortalidad de los pacientes urémicos se ha relacionado con las alteraciones del metabolismo mineral, y más concretamente con la presencia de calcificaciones vasculares, que contribuyen a las alteraciones estructurales del vaso. El fenómeno incluye la transdiferenciación de las células del músculo liso vascular (VSMC) hacia a un fenotipo con características osteogénicas como respuesta a la hiperfosfatemia y/o a las toxinas urémicas.

Los mecanismos por los que la uremia promueve la calcificación vascular y su relación con la patología cardiovascular, acelerada, precoz y severa, plantean aún múltiples interrogantes, parte de los cuales se derivan de la utilización de modelos de estudio poco adecuados. En este trabajo, nos planteamos el desarrollo de un nuevo modelo de estudio *in vitro* de calcificación de VSMCs e hipotetizamos que el cambio fenotípico producido en VSMCs podría estar asociado a alteraciones en la expresión y función de canales iónicos presentes en estas células. Para conocer la relevancia y las consecuencias del fenómeno definimos los siguientes objetivos:

1. Determinar si el suero urémico es capaz de inducir calcificación en un modelo *in vitro* de células musculares lisas de aorta humana (HASMC).
2. Evaluar los mecanismos moleculares implicados en la calcificación de HASMC en condiciones urémicas y compararlos con el modelo de calcificación inducida por fosfato.
3. Investigar la modulación fenotípica inducida por uremia en las HASMC.
4. Caracterizar a nivel molecular los cambios en expresión y función de canales iónicos en HASMC durante la uremia y su relación con el fenómeno de calcificación.
5. Estudiar el papel de los canales modificados por la uremia que pueden estar implicados en los procesos de modulación fenotípica y control del tono vascular.

DISEÑO DEL ESTUDIO

III.- DISEÑO DEL ESTUDIO

1.- ÁMBITO DEL ESTUDIO

El reclutamiento de los pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) se llevó a cabo en Servicio de Nefrología del Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria (HUNSC, Santa Cruz de Tenerife). En el laboratorio del Servicio de Análisis Clínicos del HUNSC se realizaron las determinaciones bioquímicas para la caracterización del material biológico necesario para el desarrollo de esta investigación.

La obtención de muestras biológicas humanas se realizó después de haber obtenido el consentimiento informado por escrito de los pacientes con ERC y de los individuos control.

Este proyecto fue autorizado por el Comité de Ética de la Institución del HUNSC.

2.- SUJETOS DEL ESTUDIO

Sujetos Urémicos: Lo conforman 16 pacientes enfermos renales crónicos en estadio V con un filtrado glomerular estimado (FGe) ≤ 15 ml/min/1,73m². Concretamente, 8 hombres y 8 mujeres con edades comprendidas entre 39 y 58, en hemodiálisis un tiempo medio de 26 meses.

Sujetos Control: Lo integran un total de 16 individuos sanos, 6 hombres y 10 mujeres con una edades comprendidas entre los 25 y 45 años que aceptaron participar en el estudio.

2.1.- Criterios de inclusión

- Mayores de 18 años.
- Todos los pacientes que cumplían los criterios de diagnóstico para el estudio.
- Otorgar consentimiento informado por escrito.

2.2.- Criterios de exclusión

- Infección aguda en el momento de la extracción de muestras para el estudio.

- Tratamiento con inmunosupresores y/o esteroides.
- Procesos inflamatorios al momento de su inclusión.
- Posibilidad de embarazo.
- Fumadores.
- Diabéticos.

3.- DESCRIPCIÓN OPERATIVA DEL ESTUDIO.

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron líneas primarias humanas proporcionadas por Innoprot (Derio, España). Las células de músculo liso o *HASMC* (*Human Aortic Smooth Muscle Cells*) fueron aisladas por *ScienCell Research Laboratories, Inc.* a partir de tejido de la aorta. Las células primarias se criogenizaron después de su segundo pase y una vez descongeladas se mantuvieron en cultivo en las condiciones recomendadas.

Cuando las células llegaron a condiciones de confluencia el medio de crecimiento fue sustituido por un medio experimental, dividiendo las células en dos grupos experimentales principales.

- Grupo Control: el medio de cultivo fue suplementado con un 20% de la mezcla de sueros de individuos sanos.
- Grupo Urémico: el medio de cultivo fue suplementado con un 20% de la mezcla de sueros obtenido de pacientes con ERC en estadio 5D.

Para algunos de los ensayos que se describen a continuación, se añadió al medio de experimentación diversos estímulos, apareciendo así nuevos grupo experimentales.

- Grupo Control+PAP-1: el medio de cultivo además de, ser suplementado con un 20% de la mezcla de sueros de individuos sanos, se le añadió 5-(4-fenoxybutoxy)psoraleno (PAP-1), un inhibidor del canal Kv1.3, a una concentración final de 100 nM.
- Grupo Urémico+PAP-1: el medio de cultivo se suplementó con un 20% de la mezcla de sueros urémicos y se le añadió PAP-1 a una concentración final de 100 nM.

- Grupo Control+amilo: al medio de experimentación con sueros de individuos sanos se le adicionó amilorida, un inhibidor del canal epitelial de sodio ENaC, a una concentración final de 100 μ M.
- Grupo Urémico+amilo: el medio de cultivo experimental con suero urémicos se completó con 100 μ M de amilorida.

En el caso de los ensayos en presencia de inhibidores, éstos se incorporaron directamente al medio de experimentación y no se retiraron por sustitución del medio, sino que permanecieron junto al estímulo del suero durante todo el experimento.

En cada experimento, las células de cada uno de los grupos experimentales fueron sembradas al mismo tiempo y se mantuvieron bajo las mismas condiciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

IV.- MATERIAL Y MÉTODOS

1.- OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Las muestras de sangre para la obtención de suero fueron extraídas a cada uno de los pacientes con ERC mediante venopunción en extremidad superior previa asepsia y técnicas convencionales. La sangre de los controles se obtuvo de voluntarios sanos siguiendo el mismo procedimiento. El suero de pacientes y controles se obtuvo mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga P-SELECTA MIXTASEL.

Las muestras de sueros se combinaron para obtener una mezcla de sueros urémicos y una mezcla de sueros sanos que se almacenaron a -80°C en alícuotas y se descongelaron una sola vez para los experimentos.

1.1.- Determinaciones bioquímicas

En todas las muestras de suero obtenidas de los pacientes e individuos sanos se analizaron diversos parámetros bioquímicos. Exceptuando parámetros como paratohormona (PTH), vitamina D, potasio y aldosterona, el resto fueron analizados mediante técnicas cuyo producto final fue medido fotométricamente haciendo uso del sistema Roche/Hitachi cobas® y los kits cobas® (Roche Diagnostics GmbH).

- **Fósforo (P), Calcio iónico (Ca^{2+})**

El fósforo inorgánico presente en la muestra reaccionó con el molibdato en medio ácido originando un complejo cuantificable (PHOS, cobas®). Mientras que la determinación del calcio se hizo mediante la cuantificación del complejo calcio-5-nitro-5'-metil-BAPTA (Calcium Gen. 2, cobas®).

- **Creatinina y Urea**

Para la medición de urea y creatinina se utilizaron métodos enzimáticos.

La creatinina presente en la muestra se transformó en un cromógeno de quinonaimina debido a la acción de diversas enzimas. La intensidad cromática de dicho sustrato es directamente proporcional a la concentración de creatinina en la muestra (CREP2, cobas®).

Para la medición de urea se usó el método cinético “Ureasa-Glutamato deshidrogenasa (GLDH)” (UREAL, cobas®). La ureasa cataliza la hidrólisis de la urea dando amonio, el cual se valora mediante una reacción enzimática con la GLDH, pasando NADH a NAD⁺. La velocidad de desaparición de NADH es directamente proporcional a la concentración de la urea en la muestra.

- **Albúmina y Fosfatasa alcalina**

Para analizar las concentraciones de albúmina y fosfatasa alcalina se usaron métodos colorimétricos. Concretamente, para determinar la concentración de la albúmina en la muestra se cuantificó la presencia de un compuesto azul verdoso resultado de la reacción de ésta con verde de bromocresol (ALB2, cobas®). De igual modo se cuantificó la cantidad de p-nitrofenol liberado gracias a la actividad catalítica de la enzima fosfatasa alcalina (ALP2, cobas®).

- **PTH y vitamina D**

La determinación de la concentración de la hormona paratiroidea en las muestras de suero se llevó a cabo utilizando un radioinmunoensayo ELSA-PTH para cuantificación de 84 aminoácidos intactos de la cadena de la PTH (Cisbio Bioassays, France). Esta técnica se basa en la utilización de dos anticuerpos dirigidos frente a distintas porciones de la molécula de PTH. La muestra que contiene la hormona se incuba simultáneamente con un anticuerpo que reacciona con la región intermedia y el C-terminal (39-84) y con otro anticuerpo marcado con I¹²⁵ que se adhiere a la región N-terminal (1-34) de la molécula de PTH. La concentración de PTH presente en cada muestra se cuantificó mediante una curva estándar.

Asimismo, se usó un radioinmunoensayo (25-OH Vitamin D total RIA. DRG Instruments GmbH, Germany) para la determinación cuantitativa de la 25-hidroxivitamina D3 y D2 (25-OH-D3 y 25-OH-D2) en cada una de las muestra de suero.

- **Potasio (K⁺)**

El método para determinar potasio está basado en la potenciometría utilizando un electro selectivo para iones que utiliza como elemento sensor cloruro de plata o sulfuro de plata.

- **Aldosterona**

La concentración de aldosterona en suero se determinó mediante un inmunoensayo enzimático (ELISA) utilizando el kit comercial Aldosterone ELISA (DRG Instrumnets GmbH, Germany).

2.- CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS DE MUSCULATURA LISA Y ENDOTELIO DE AORTA HUMANA

2.1.- Mantenimiento de cultivos

Para el establecimiento y mantenimiento de los cultivos de HASMC se empleó medio de cultivo DMEM alta glucosa (*Dulbeccos Modified Eagles Medium*) (Biowest) con un 10% de suero fetal bovino (FBS) (Biowest). El medio se suplementó con una solución de penicilina/ estreptomina al 1% (Biowest) y con 0,2% de MycoZap™ (Lonza) que previno una posible contaminación por micoplasmas. Además, se añadieron factores de crecimiento específicos para células musculares lisas (SMCGS; Innoprot).

Los cultivos permanecieron en un incubador (HERa CELL 150i, CO₂ Incubator, Thermo SCIENTIFIC) a 37°C en una atmósfera 5% CO₂/95% aire humidificado a saturación. El medio de cultivo se renovó al día siguiente tras la descongelación y posteriormente, de forma rutinaria, cada 48 horas. Una vez que los cultivo alcanzaron el 50% de confluencia, se hizo el cambio de medio cada día hasta que los cultivos presentaran aproximadamente entre un 80 y 90% de confluencia. Es entonces cuando se procedió al subcultivo en las distintas superficies según el ensayo.

Todos los experimentos fueron realizados con células mantenidas en cultivo entre los pases 3 y 5.

2.2.- Tripsinización: pases y conservación

Las células se tripsinizaron cuando la monocapa alcanzó la confluencia. Para ello, el medio de cultivo fue previamente eliminado y las células fueron lavadas con tampón fosfato o PBS (*Phosphate Buffer Saline*), eliminando los restos de suero que pudieran inactivar la tripsina. Seguidamente se añadió tripsina/EDTA y cuando se observó al microscopio que las células estaban totalmente redondeadas, se añadió medio completo

para detener la actividad de la proteasa. Tras una centrifugación suave, se homogenizó el pellet con medio fresco y se realizaron los sucesivos subcultivos en frascos y/o placas, en función de la utilidad que se le fuera a dar a las células.

A la vez que se realizaron subcultivos sucesivos, las células se congelaron en criotubos en presencia de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). El DMSO actúa como preservante frente a la congelación, evitando la formación de cristales que podrían romper las células. Los criotubos se introdujeron en el contenedor de congelación a -80°C con isopropanol consiguiéndose así una disminución gradual de la temperatura y por tanto menos daño celular. Tras 24 horas, se transfirieron al tanque de nitrógeno líquido para su almacenamiento a -196°C .

Para descongelar, las células se transfirieron directamente del tanque de nitrógeno a un baño termostaticado a 37°C . Una vez descongeladas, las células se transfirieron con pipeta a un frasco de cultivo, el cual contenía medio completo, y se dejaron con ese medio en presencia de DMSO hasta que se adhirieron al plástico. Una vez adheridas, se cambió el medio para eliminar el DMSO.

2.3.- Recuento celular

Para contar las células en cada subcultivo se añadió 10 μl de suspensión celular y 90 μl de azul tripán (Biowest) en un tubo de microcentrífuga. Después se colocaron 10 μl de la mezcla en un hemocitómetro o cámara de *Neubauer* y se procedió al recuento de las células utilizando un microscopio óptico. La cámara Neubauer es un portaobjetos que dispone en el centro de 4 cuadrados de 1mm de lado, cada uno dividido en 16 cuadrados más pequeños. Por encima y tapando la gota de la solución, se colocó un cubreobjetos que permite un espacio de altura 0,1 mm de modo que el volumen de líquido que se aloja en cada cuadrado es de $1 \times 1 \times 0,1 \text{ mm}^3$ o 10^{-4} cm^3 que aproximadamente son 10^{-4} ml . Por consiguiente la concentración de células se calculará del siguiente modo:

$$\text{Células/ ml} = \text{Media de contaje de las cuatro zonas} \times 10000 \times \text{factor dilución (10)}$$

2.4.- Tratamiento de las superficies de cultivo

Las superficies de cultivo donde se sembraron las células fueron tratadas con una solución de fibronectina (Sigma) para facilitar que un mayor número de células se

adhirieran a su superficie. La fibronectina (1 mg/ml) se preparó en una solución de gelatina al 0,02% en agua destilada en condiciones de esterilidad. Se añadió la solución de fibronectina a la superficie en cuestión y se mantuvo a 37°C durante la noche; pasado este tiempo se retiró y se dejó secar la superficie en la cámara de flujo laminar hasta su uso.

En el caso de los cubreobjetos usados para los registros electrofisiológicos se lavaron con etanol puro (Merck) y se flamearon para su esterilización, antes de su incubación con la solución de fibronectina.

3.- ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

3.1.- Incorporación de EdU

Para estimar la tasa de proliferación de las células de músculo liso se utilizó el kit comercial Click-iT® EdU Imaging Kit (ThermoFisher Scientific). En este kit se utiliza EdU (5-etinil-2'-deoxyuridina) como análogo a la timidina. El EdU se incorpora de forma eficiente en la nueva síntesis de DNA y mediante una reacción colorimétrica con el fluorocromo Alexa 488 se puede determinar mediante microscopia el número de células que están incorporando EdU y por lo tanto en fase de proliferación.

Para elaborar las curvas de proliferación, cada grupo experimental se sembró por duplicado en placas de 8 pocillos (Ibidi GmbH) a una densidad de 15.000 células/cm². Tras 24 horas, se incubaron las células con el medio de experimentación. Cuando las células llevaban 48 horas en el medio experimental se les añadió a cada condición el EdU a una concentración de 10 µM y se incubaron durante 1, 6, 12, 24 y 48 horas. Pasado el tiempo de incubación con EdU, se procedió a fijar las células durante 15 minutos con formaldehído 4%. Una vez fijadas las células, se procedió a realizar el protocolo Click-iT siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Para marcar los núcleos celulares se incubó durante 20 minutos con el reactivo Hoechst en PBS (1:2000) en oscuridad. Finalmente, para el montaje hubo que añadir únicamente una gota de medio de montaje Mowiol a cada uno de los pocillos.

Las células se visualizaron con un microscopio confocal Leica TCS SP8 y se fotografiaron 15 campos aleatorios para posteriormente proceder a la cuantificación de

los núcleos positivos para EdU con respecto a los núcleos totales.

4.- DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL (XTT)

La viabilidad celular se determinó por el método del XTT, sensible y cuantitativo, el cual determina la funcionalidad celular. Este ensayo se basa en la capacidad de las células para la transformación de la sal de tetrazolio XTT (Sodio 3,3-[(Phenylamino) carbonil]-3,4-Tetrazolio-Bis(4-metoxi-6-nitro) ácido bencenosulfónico hidratado), de color amarillo, a una tinción de formazán, de color naranja, escisión que sólo ocurre debido a las células metabólicamente activas (Scudiero et al. 1988).

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano (Nunc, Roskilde, Dinamarca), en una proporción de 5.000 células por pocillo en un volumen de 100 µl de medio completo. Al día siguiente, se cambió el medio de cultivo por el medio de experimentación. Cada ensayo de viabilidad permite tres réplicas por condición y cada condición presenta un blanco sin células pero con la misma cantidad de medio experimental. Transcurridos 2, 5 y 10 días, la actividad mitocondrial se determinó usando 50 µl de la sal de tetrazolio XTT (Cell Proliferation Kit XTT, Applichem GmbH), por pocillo, incubando durante 4 horas a 37°C y CO₂ al 5%. El tinte de formazán es soluble en solución acuosa y fue directamente cuantificado con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm, utilizando 630 nm como referencia.

La viabilidad celular se expresó en forma de porcentaje, estableciendo que el 100% de viabilidad corresponde a la absorbancia de las células control y es proporcional al número de células metabólicamente activas.

5.- DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE TINCIÓN CON AZUL TRIPÁN

Las células de músculo liso vascular fueron sembradas en placas de 4 pocillos (Nunc) a una densidad de 25.000 células por pocillo y se esperó 24 horas hasta su adhesión. Tras el tratamiento con el medio de experimentación, se tripsinizaron con 200 µl, antagonizándose después con 200 µl de medio suplementado con un 10 % de

FBS y depositándose la suspensión resultante en un tubo de microcentrífuga. El número de células se determinó mediante el recuento en la cámara Neubauer por duplicado en el microscopio óptico. La viabilidad celular se midió a través de la exclusión del colorante azul tripán al 0,04%, que permite distinguir las células viables de las que no lo son ya que estas últimas han perdido su permeabilidad selectiva y se tiñen de azul, mientras que la viables permanecen incoloras. De modo que la cuantificación consistió en el conteo de aquellas células que son brillantes, refringentes y no coloreadas.

6.- ESTUDIO DE APOPTOSIS

Un paso crítico en el proceso de apoptosis es la adquisición de cambios en la superficie celular. En una célula apoptótica se produce una translocación de los residuos de fosfatidilserina (PS) de la membrana interna a la membrana externa, exponiendo de esta manera los restos de PS al exterior. Esto ocurre en la primeras etapas, en la fase de apoptosis temprana, donde se mantiene la integridad de la membrana plasmática. La Anexina-V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio, la cual tiene una gran afinidad de unión a los restos de PS. Por tanto la anexina-V puede unirse a los restos de PS de las células apoptóticas a la ser estos accesibles por estar en el exterior. De esta manera se puede discriminar entre células apoptóticas y células normales. En este estudio la cuantificación de fosfatidilserina en la parte exterior de la membrana celular se realizó mediante marcaje con anexina-V conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (sc-4252 FITC, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Se lavaron las células con PBS y posteriormente, se resuspendieron en tampón de unión a anexina (10 mM HEPES, pH 7,4; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl₂) al que se le añadió anexina V-FITC a una concentración de 0,2 µg/µl. Las células marcadas se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz y con agitación suave. Transcurrido el tiempo, las células se resuspendieron en un volumen final de 200 µl del mismo tampón y se añadió ioduro de propidio (PI) (0,6 µg/ml), que marca la degradación del ADN, justo en el momento del análisis. Finalmente, se analizaron las muestras por duplicado, utilizándose 15.000 células por condición. La emisión de luz de excitación se realizó a 488 nm con un láser de argón. La señal de FITC (fluorescencia verde) se detectó a 518

nm y la señal del PI (fluorescencia roja) se detectó a 620 nm en el citómetro MACSQuant® Analyzer 10 (Miltenyi Biotec).

7.- ESTUDIO DE LA MIGRACIÓN CELULAR

Para los estudios de migración se utilizaron cultivos de células de músculo liso confluentes sembradas en placas de 35mm (Ibidi GmbH) e incubadas con el medio de experimentación. Estas placas contienen un molde de silicona que permitió el cultivo de 40.000 células a ambos lados de un tabique de separación de 500 μ m. Cuando las células permanecieron durante 48 horas con el estímulo del suero, se retiró dicho molde y se sustituyó el medio de experimentación por medio DMEM libre de suero durante 24, 48, 72 y 120 horas, con el objetivo de sincronizar las células en la fase G_0 del ciclo celular y bloquear así su proliferación. El área de la superficie sin células creada una vez que se extrajo el molde de silicona se cuantifica mediante el *software* de análisis de imagen del programa *Image J* (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>) (Schneider, Rasband, and Eliceiri 2012), midiéndolo a tiempo 0 (A_0), tras 24 (A_{24}), 48 (A_{48}), 72 (A_{72}) y 120 (A_{120}) horas. La migración de las células se cuantificó comparando del área libre de células a tiempo 0 con el área libre de células a las distintas horas de medición, de forma que el % de A_0 invadida tras las distintas horas (A_i) se considera proporcional a la migración celular.

8.- CUANTIFICACIÓN DE LA CALCIFICACIÓN CELULAR

Como control positivo de inducción de calcificación en el modelo *in vitro* de células musculares lisas (HASMC) se utilizó un medio de alto contenido en fósforo y calcio. El medio DMEM se suplementó con cloruro cálcico ($CaCl_2$) hasta una concentración de 2mM de calcio y además se adicionó el fosfato en una proporción 2:1 de fosfato monobásico y dibásico a una concentración final de 2,5 mM. Para evaluar si el suero urémico era capaz de inducir calcificación, las células HASMC fueron sembradas en placas de 96 pocillos HASMC y tras alcanzar la confluencia fueron incubadas durante 2, 3, 5, 7 y 10 días con el medio de experimentación, es decir, en medio DMEM, libre de FBS, suplementado con un 20% de pool de sueros urémicos y controles.

8.1.- Tinción Rojo Alizarina

El progreso del proceso de calcificación se evaluó mediante la aparición de focos de mineralización en la placa de cultivo, los cuales fueron confirmados mediante tinción con rojo alizarina. Para ello, se retiró el medio de cultivo y se fijaron las células con formalina al 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron con PBS e incubaron con una solución de rojo alizarina al 1% (Sigma-Aldrich) y se procedió a la observación microscópica. La alizarina en contacto con el calcio produce su quelación formando un compuesto birrefringente de color rojo de modo que la aparición de este precipitado fue indicativo de una reacción positiva. En último lugar, se incubó la placa en oscuridad con ácido acético al 10% con objeto de disolver el compuesto producido y se cuantificó con un lector de placas a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados se expresaron en función de la absorbancia producida por cada condición a esa longitud de onda.

8.2.- Cuantificación de proteínas

La medición de la concentración de proteínas de cada lisado del ensayo anterior se realizó por el método del ácido bicinconínico (BCA assay kit, Sigma-Aldrich) (Smith et al. 1985). Para ello, se preparó el reactivo BCA mezclando 50 partes del reactivo B con 1 parte del reactivo A. A continuación, se añadieron 25 μ l de cada muestra a una placa de 96 pocillos, así como 25 μ l de cada estándar para realizar la recta de calibrado. A cada pocillo con muestra o estándar se adicionaron 200 μ l del reactivo BCA y se incubó la placa durante 30 minutos a 37°C, protegido de la luz. La concentración de proteínas se determinó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm, mediante una curva de calibrado frente a concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA), disueltas en la misma solución de lisis.

9.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ALCALINA

La enzima fosfatasa alcalina es un indicador temprano de la diferenciación ósea. La actividad de esta enzima se determinó y cuantificó de manera colorimétrica, empleando un sustrato que, tras la acción de la enzima, da lugar a un producto de intenso color amarillo. Después de los distintos tratamientos, se retiró el medio de

experimentación, las células se lavaron con PBS y se añadió tampón de lisis a cada pocillo (50 mM Tris pH 6,8, Tritón X-100 al 1%, 2mM MgCl₂). Tras incubar 30 minutos, se centrifugaron los lisados celulares a 12.000 xg a 4°C durante 15 minutos. A continuación, a los sobrenadantes se les adicionó tampón sustrato (50 µl de p-nitrofenilfosfato (pNPP) y 50 µl de buffer 2-amino-2-metil-1-propanol) (Sigma-Aldrich). Tras una incubación de 15 minutos a 37°C, en oscuridad, la reacción se paró adicionando NaOH 3N y se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de placas (Benchmark Plus Microplate, Bio-Rad). Se normalizaron los datos de absorbancia mediante la cuantificación del contenido total de proteínas (explicado en el apartado anterior).

10.- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

10.1.- Extracción y cuantificación de ARN

El ARN total procedente de células en cultivo fue aislado siguiendo el método de filtración por columnas con el kit Real Total ARN Spin Plus (REAL). Para cuantificar la concentración y evaluar la pureza de los ARNs extraídos se utilizaron longitudes de onda de 260 nm (A_{260}) y 280 nm (A_{280}) en el espectrofotómetro NanoDrop 2000™ (Thermo Scientific) (Sambrook, Fritsch, and Maniatis 1989). La pureza de los ARNs en relación a la presencia de proteínas se obtuvo con el cociente de las absorbancias a las longitudes de 260 y 280 nm, considerándose una relación A_{260}/A_{280} comprendida entre 1,8 y 2 como un indicador de pureza adecuada. Una vez cuantificados, se alicuotaron y almacenaron a -80°C hasta su uso.

10.2.- Síntesis de ADNc y PCR cuantitativa (qPCR)

Se usaron entre 100 y 750 ng de ARN total para obtener el ADN complementario (cDNA) mediante una reacción de transcripción inversa. Este paso se realizó con el kit comercial iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La caracterización de los cambios en la expresión de varios genes de interés se llevó a cabo mediante PCR a Tiempo Real en un termociclador *C1000 Touch*™ con un

módulo óptico CFX96 *touch* acoplado (Bio-Rad). La amplificación de los genes en los cDNAs obtenidos se llevó a cabo mediante el kit TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem California, E.E.U.U.) con mezclas preformuladas que contiene conjuntos de sondas y cebadores específicos de un gen o bien el kit *iQ™ SYBR Green® Supermix* (BioRad) con oligonucleótidos sin marcar específicos para el transcrito de interés.

Para descartar que las diferencias en la expresión del gen se debían en realidad a diferencias en las eficiencias de los distintos procesos de PCR se procedió al cálculo de éstas. La eficiencia de todas las sondas TaqMan y oligonucleótidos se comprobó mediante rectas estándar formadas por diluciones seriadas de las muestras. El valor de la pendiente de la recta, que debía estar entorno a $-3,3$, permitió calcular la eficiencia de las PCR, cuyos valores estuvieron comprendidos entre un 90 y 110%.

La normalización de la expresión de los genes a cuantificar se hizo mediante la cuantificación de la expresión de un gen constitutivo, el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), el cual se utilizó para compensar las variaciones del nivel de expresión de los genes causadas por diferentes concentraciones de molde en la reacción de amplificación.

En todos los experimentos de qPCR las muestras se estudiaron por triplicado. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el método de cuantificación relativa 2 delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) que compara directamente la muestra experimental con la muestra control (Livak and Schmittgen 2001). El gen que utilizamos como estándar interno nos permitió corregir las variaciones en la cantidad total de ARNm de las muestras debido a su procesamiento. La media de los valores de cada gen normalizados frente al gen constitutivo se utilizaron para calcular la expresión relativa de los distintos genes que se representan con el valor de $2^{-\Delta Ct}$ (abundancia relativa), donde:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen problema}} - Ct_{\text{gen constitutivo}}$$

Para comparar la expresión de un mismo gen en diferentes condiciones se utilizará $\Delta\Delta Ct$, donde:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{URÉMICO}} - \Delta Ct_{\text{CONTROL}}$$

10.3.- Arrays de Baja Densidad con sondas TaqMan (TLDA)

El estudio de expresión de transcritos de subunidades de canales iónicos se realizó utilizando Arrays de Baja Densidad con sondas TaqMan® (*TaqMan Low Density Arrays*: TLDA) de Applied Biosystem. Se trata de unas tarjetas que permiten analizar la expresión de una gran cantidad de genes a la vez, previamente seleccionados, mediante PCR cuantitativa. Las tarjetas contienen 384 pocillos en los que se encuentran liofilizados ensayos TaqMan® validados por Applied. El diseño de las placas elegido fue el de 92 genes y 3 controles endógenos analizados por duplicado y con dos muestras estudiadas en cada placa. Los genes seleccionados fueron canales de potasio (K⁺) y sus subunidades accesorias, canales de calcio (Ca²⁺), de cloro (Cl⁻), de sodio (Na⁺) y los canales TRP. Además, se incluirán varios controles endógenos como el ARNr 18S, GADPH y la beta-2-microglobulina (β -2-M).

Sobre la tarjeta preconfigurada se reparte por microfluidez la mezcla de 50 μ l del reactivo TaqMan Universal PCR Master Mix (2X) y 50 μ l provenientes de la retrotranscripción, correspondiente a 1 μ g de ARN total. Las tarjetas fueron procesadas en el Servicio de Genómica de la Fundación Parque Científico de Madrid (FPCM) utilizando el sistema de detección ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystem).

Los datos obtenidos se analizaron usando dos métodos independientes. En primer lugar, se aplicó un análisis de conglomerado jerárquico (hierarchical clustering) que se basa en agrupar simultáneamente la matriz de genes y las condiciones estudiadas. Los valores usados para cada gen correspondían a los Δ Ct de cada experimento. Se usó el software XLSTAT y se aplicó como algoritmo de agrupación las distancias euclidianas, opcionalmente precedido por el algoritmo de k-medias, dependiendo del tamaño de la matriz. Las relaciones entre genes se representan mediante un dendograma donde la longitud de las ramas refleja su grado de similitud. Concretamente, esta representación gráfica se usa para ordenar los genes cuyo patrón de expresión es parecido permitiéndonos identificar rápidamente la presencia de rectángulos horizontales de un color homogéneo situados contiguamente.

Posteriormente, se analizaron los datos obtenidos por el método 2 delta-delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de cuantificación relativa, descrito anteriormente.

11.- MICROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCENCIA.

11.1.- Inmunofluorescencia.

Las técnica de inmunofluorescencia indirecta para la detección de proteínas citoplasmáticas y nucleares se realizó en cultivos de células musculares lisas. Para estos experimentos, las células fueron sembradas en placas de 8 pocillos (Ibidi GmbH). Tras la exposición al medio de experimentación, las células se lavaron con PBS y se procedió a la fijación con formaldehído al 4%, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, para permitir que los anticuerpos penetrarán en el interior celular, éstas fueron permeabilizadas con Tritón X-100 en PBS al 0,3% durante 15 minutos y luego, se incubaron con una solución de suero de cabra (GSDB) al 33% para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos.

Proteína	Concentración anticuerpo 1 ^{ario}	Casa comercial anticuerpo 1 ^{ario}	Anticuerpo 2 ^{ario} Alexa (Molecular Probes®)
α - Actina	1:400	Sigma (A2547)	1:400 Cabra anti-ratón Alexa 488 (A-11001)
RUNX2	1:50	Santa Cruz Biotechnology (sc-10758)	1:400 Cabra anti-conejo Alexa 594 (A-11012)

Tabla 2. Características de los anticuerpos usados en inmunofluorescencia.

Seguidamente se incubaron las células con el anticuerpo primario (a la concentración indicada en la tabla 2) en GSDB durante 1 hora. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió al lavado de la células con PBS y a la incubación con el anticuerpo secundario frente a la especie en la que fue obtenido el primario, conjugado con las moléculas fluorescentes Alexa (a la concentración indicada en la tabla 2) en oscuridad.

Una vez finalizada la incubación, se lavaron las células con PBS y se añadió medio de montaje Mowiol con DAPI (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Éste último se intercala entre los pares de base del ADN y por tanto hace visible los núcleos bajo luz de 358 nm. Las preparaciones fueron observadas empleando un microscopio confocal Leica modelo TCS SP8.

12.- TÉCNICAS ELECTROFISIOLÓGICAS DE REGISTRO.

12.1.- La técnica de *patch clamp*.

Con el fin de registrar las corrientes de potasio a través de la membrana plasmática, en este trabajo se ha utilizado la técnica de *patch clamp* en su configuración de célula completa o *whole cell*. Esta técnica, desarrollada a principios de los ochenta (Hamill et al. 1981), permite medir corrientes iónicas de transmembrana manteniendo el potencial de la misma en valores prefijados (*voltage-clamp* o “Fijación de voltaje”), o medir la variación de potencial de membrana ante un estímulo fijo de corriente (*current-clamp*). El fundamento de esta técnica consiste en formar un sello de alta resistencia, del orden de $G\Omega$, entre una micropipeta de vidrio, con un microelectrodo en su interior, y la membrana celular. En la variante de “fijación de voltaje”, a través de la pipeta se inyecta la corriente necesaria para mantener el potencial de membrana fijado en el nivel deseado. Esto permite, tras aplicar diferentes protocolos de estimulación, cuantificar las corrientes iónicas celulares, lo cual se realiza mediante un amplificador electrónico conectado a la pipeta. La micropipeta se llena con la solución interna, cuya composición varía dependiendo de la corriente a estudiar. Al poner la pipeta sobre la superficie celular se aplica una presión negativa mediante una ligera succión de tal forma que la porción de la membrana localizada en la luz de la pipeta se invagina formando un sello de alta resistencia. Ésta se conoce como configuración *cell-attached*, en la que se puede controlar el potencial de la sección de membrana que queda dentro de la micropipeta. A partir de este punto, para conseguir la configuración *whole cell* se aplica una succión adicional rompiendo la porción de la membrana invaginada. Tras la rotura del parche de la membrana entran en contacto la solución interna y el citoplasma celular, dando acceso eléctrico al interior celular. En esas condiciones, al fijar el potencial de membrana, estamos fijando el potencial de toda la membrana celular. La corriente registrada en estas condiciones es la suma de todos los canales presentes en la membrana activables con las condiciones determinadas, también llamada corriente macroscópica.

Observamos las células con un microscopio invertido (Olympus IX70) estabilizado mecánicamente sobre una mesa antivibratoria rodeados por una jaula de Faraday para filtrar los ruidos eléctricos del ambiente.

Las soluciones utilizadas en nuestros experimentos fueron perfundidas por gravedad mediante un sistema multivías regulado mediante válvulas excluyentes, colocado próximo a las células investigadas, a temperatura ambiente. Los distintos fármacos ensayados fueron diluidos a partir de soluciones stock en las soluciones estándares utilizadas según se especifica en cada caso, en el apartado Resultados.

12.2.- Soluciones para realizar registros electrofisiológicos

Para registrar las corrientes iónicas se han empleado soluciones de diferente composición en el interior de la pipeta y en el baño de las células.

Las solución que rellena la pipeta recibe el nombre de solución interna y tiene una composición iónica que reproduce la del medio celular citoplasmático (Tabla 3). La solución se prepara añadiendo todos los componentes excepto el ATP que se añade al final y se mantiene en alícuotas a -80°C , para evitar la degradación del mismo. Cuando se va a usar la solución se descongela una alícuota, que se filtra y se mantiene siempre en hielo. En cuanto a la solución que baña a las células mientras se realizan los registros se llama soluciones externa y tiene una composición iónica similar al medio extracelular (Tabla 3).

	Solución Interna (mM)	Solución Externa (mM)
KCl	125	4,7
NaCl	-	141
MgCl₂	4	1,2
CaCl₂	-	1,8
EGTA	10	-
HEPES	10	10
MgATP	5	-
Glucosa	-	10
pH	7,2	7,4

Tabla 3. Soluciones para los registros electrofisiológicos

12.3.- Protocolo utilizado en el registro de corriente

Para registrar la corriente de salida de potasio (K^+) en células de músculo liso se perfunden éstas con la solución externa. Una vez establecida la configuración *whole-cell*

se fijó el potencial de reposo a -80 mV. La relación corriente-voltaje (I/V) se obtuvo tras la aplicación de un protocolo de pulsos de voltaje entre -60 y +120, en incrementos de 10 mV mV y una duración de 200 ms por pulso.

Los resultados se expresan como densidad de corriente (pA/pF), que normaliza la cantidad de corriente total obtenida con respecto a la capacidad de la célula, permitiendo la comparación de resultados entre células de diversos tamaños. La capacidad se calculó a partir de la medida de la corriente capacitativa registrada al hiperpolarizar -10 mV la membrana desde el potencial basal. La integral de esta corriente es la cantidad de carga necesaria para cargar la membrana cuya magnitud, dividida entre la amplitud del pulso hiperpolarizante, nos permite calcular la capacidad de la célula.

12.4.- Adquisición y análisis de los datos

La generación de protocolos fue llevada a cabo mediante el uso del software PCLAMP 8.0 (Axon Instruments) y la aplicación CLAMPFIT (Molecular Devices) sirvió para analizar los registros electrofisiológicos. La representación gráfica de los datos, así como parte del análisis se realizó con el programa ORIGIN 7.0 (Microcal Inc.).

El análisis estadístico de los datos se realizó empleando el test t de Student. Se aplicó el test para datos apareados o no apareados en función del diseño experimental en cada caso. Se consideró como estadísticamente significativos valores de $p < 0.05$. A lo largo de toda la sección de resultados, los datos se expresan como Media \pm Error Estándar (EEM)

13.- REGISTRO DE CALCIO INTRACELULAR

Para determinar la concentración libre de ión calcio intracelular (Ca^{2+}) se utilizó la sonda fluorescente fluo-4 (Molecular Probes®), un compuesto que al unirse al Ca^{2+} emite fluorescencia. Este marcador fluorescente puede atravesar la membrana celular, en forma de éster de acetoximetilo (fluo-4/AM). Una vez en el interior de la célula, las esterasas endógenas hidrolizan este enlace transformándolo en fluo-4. El fluo-4 es un derivado del quelante de Ca^{2+} BAPTA unido covalentemente al fluorocromo fluoresceína, cuyo máximo de excitación es 494 nm.

13.1.- Medida de la concentración de calcio citosólico libre.

Se sembraron 15.000 células HASMC en cubreobjetos de vidrio en el medio de experimentación. Tras 24 horas, se lavaron las células con medio fresco carente de suero (FBS) y se incubaron en presencia de fluo 4-AM (2 μ M) durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegidas de la luz. Posteriormente se lavaron con medio fresco (con FBS) para eliminar los restos de sonda no captados por las células, tras lo cual se mantuvieron 10 minutos a temperatura ambiente, garantizando la hidrólisis del enlace éster de la sonda por las esterasas intracelulares.

Los cubreobjetos con las células ya cargadas se colocaron sobre una cámara de metacrilato situada sobre un microscopio de fluorescencia invertido (Olympus IX70). A continuación, se seleccionó un campo con varias células y se activó la perfusión. Las células se lavaron con la solución externa estándar utilizada en los registros electrofisiológicos (Tabla 3) y se mantuvieron 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente hasta que las células se estabilicen. La fluorescencia emitida por la sonda fluo-4, tras su excitación a 480 nm, fue detectada por un fotomultiplicador a través de un espejo dicróico a 505nm y un filtro de emisión a 520nm.

Las células fueron tratadas con 10 μ M de Angiotensina II y con 10 μ M de ácido ciclopiazónico (CPA) para provocar el vaciado de Ca^{2+} del retículo endoplásmico.

En estos experimentos normalizamos la señal de fluorescencia añadiendo al final del experimento ionomicina (10 μ M), para permeabilizar las células y poner así todo el Ca^{2+} disponible en contacto con la sonda, lo que nos permite registrar el valor de fluorescencia máxima ($F_{m\acute{a}x}$) en cada pocillo (Maravall et al. 2000). Los resultados se presentan como:

$$[Ca^{2+}] = 300 \times ((F_{480}/F_{480max}) / (1 - F_{480}/F_{480max}))$$

El registro y análisis de datos se realizó mediante los programas el programa Imaging Workbench 4.0 y MatLab, respectivamente.

14.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El estudio estadístico de los dato se realizó con el programa informático Prims 5 (GraphPad). Los datos se expresaron como media \pm error estándar de la media (SEM)

del número de experimentos indicado en cada protocolo. Excepto indicación específica, cada valor corresponde a un mínimo de 3 experimentos hechos por triplicado. Para la comparación de medias entre tres o más grupos se usó el análisis de varianza (ANOVA). Si el test ANOVA mostraba diferencia estadísticamente significativas, posteriormente se aplicaba un test post-hoc de Tukey. Para la comparación entre medias entre dos grupos pertenecientes al mismo intervalo de tiempo, se utilizó la prueba *t* de Student. El nivel de significación estadística se fijó en $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

V. RESULTADOS

PARTE 1.- CARACTERIZACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL MODELO *IN VITRO* DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE AORTA HUMANA SOMETIDAS A SUERO URÉMICO.

1.1.- CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

La determinación de diversos parámetros clínico-analíticos de la sangre tanto de pacientes como de controles nos permitió caracterizar el material biológico de partida (tabla 4). Encontramos un descenso discreto pero significativo de los niveles de albúmina en suero urémico, indicativo de un posible deterioro en la función renal. Una característica fundamental en el desarrollo de la enfermedad renal es la aparición de productos terminales del metabolismo nitrogenado como la creatinina y la urea, cuya concentración aumentó significativamente en el suero de los pacientes con respecto al suero procedente de individuos con función renal normal. El seguimiento de los valores de estos productos ayuda en la estimación del grado de disfunción renal.

Respecto a las alteraciones en el metabolismo óseo-mineral, podemos observar que en los sueros urémicos se existe un descenso significativo en los valores plasmáticos de calcio iónico. Sin embargo, la concentración de fosfato plasmático estuvo consistentemente elevada y fuera del rango recomendado por las guías SEN (2,7- 5 mg/dL). Lo mismo ocurrió para los niveles de potasio cuyos valores fueron significativamente superiores con respecto al grupo de sueros control.

Además, el incremento de los niveles séricos de fosfato en sueros urémicos vino acompañado de niveles muy elevados de PTH y una disminución significativa del vitamina D o calcitriol. Por último, se determinaron los niveles de fosfatasa alcalina y aldosterona circulantes. En ambos casos parecen estar elevados en el suero urémico, si bien no llegaron a la significación.

Parámetros	Controles	ERC	p valor
Albúmina, mg/dL	4,1 ± 0,07	3,81 ± 0,07	0,005
Urea, mg/dL	33,5 ± 1,81	88,56 ± 4,23	<0,0001
Creatinina, mg/dL	1,01 ± 0,04	5,38 ± 0,22	<0,0001
Fosfato, mg/dL	3,57 ± 0,11	5,84 ± 0,28	<0,0001
Calcio, mg/dL	9,82 ± 0,07	8,83 ± 0,24	0,011
Potasio, mmol/L	4,37 ± 0,1	5,26 ± 0,16	<0,0001
PTH, pg/mL	40,86 ± 2,01	505,9 ± 57,25	<0,0001
Vit. D, ng/mL	47,63 ± 3,54	19,19 ± 1,19	<0,0001
Fosfatasa alcalina, U/L	73,38 ± 5,62	81,38 ± 4,57	0,278
Aldosterona, nM	0,89±0,11	1,15±0,15	0,183

Tabla 4. Parámetros bioquímicos de ambos grupos. Los datos se representan como la media±SEM. Las comparaciones entre grupos se han llevado a cabo mediante la prueba t-Student.

1.2.- ESTUDIO DEL CONTENIDO MINERAL EN HASMC.

En la evaluación de la diferenciación de la células musculares lisas hacia un linaje con características osteogénicas se ha empleado, entre otros, un marcador osteogénico como es la formación de matriz extracelular calcificada. Para ello, se ha comprobado mediante demostración citoquímica la presencia de sales de calcio en el entorno de las células diferenciadas mediante la tinción con rojo alizarina, que reacciona con el calcio por quelación formando un compuesto birrefringente de color rojo (Gregory et al. 2004).

Como control positivo para comprobar la capacidad de calcificación del modelo de HASMC se compararon células incubadas bajo condiciones normales en medio DMEM, es decir, con una concentración final de fosfato de 0,905 mM, con células incubadas en condiciones calcificantes, es decir, con una concentración final de 2,5 mM de fosfato (Pi) y 2 mM de calcio (Ca) hasta un máximo de 10 días en cultivo.

La tinción rojo alizarina (figura 3A) confirma que las HASMC cultivadas con Pi 2,5 mM exhiben un extenso depósito mineral y presentan alteraciones, como la formación de grandes nódulos de mineralización. Este tipo de alteraciones no se observan en los cultivos en condiciones normofosfatémicas, no se produciéndose la

calcificación. Sin embargo, las células incubadas con alto fosfato aumentaron significativamente el contenido mineral de calcio durante todos los días del experimento. Tras 3 días de incubación en condiciones hiperfosfatémicas, el cultivo muestra el máximo de deposición de calcio en la matriz. Sin embargo, al prolongar el tratamiento la situación pro-calcificante persiste pero empieza a reducirse ligeramente hasta el día 10 (Figura 3 B).

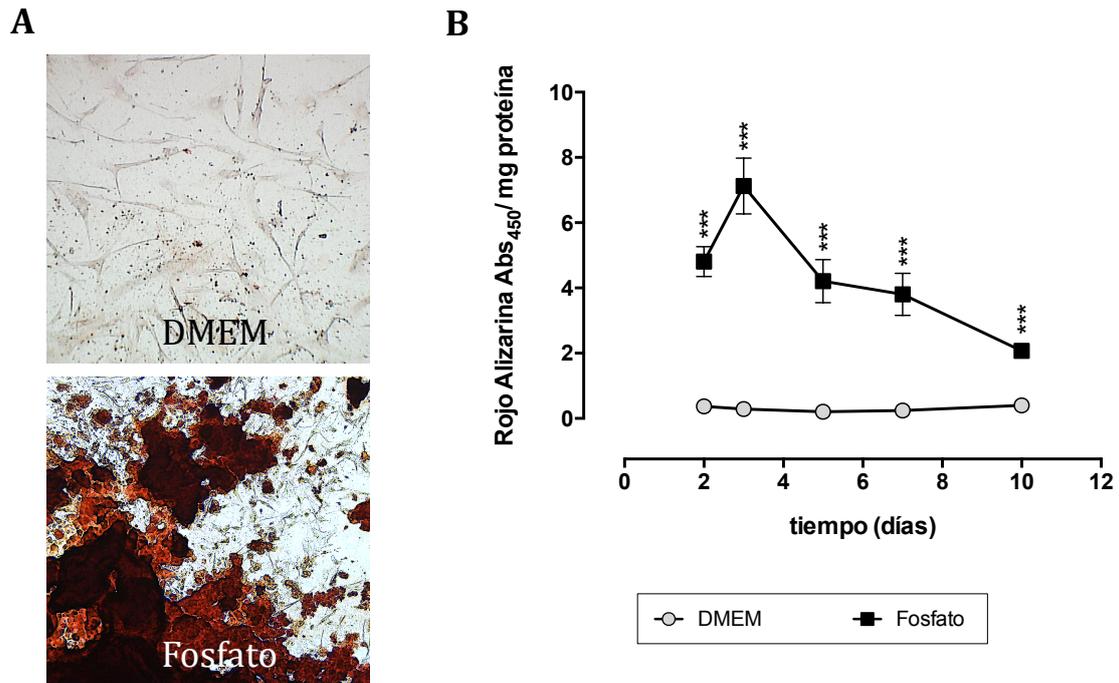


Figura 3. Efecto del fosfato en la calcificación *in vitro* de HASMC a diferentes tiempos de incubación. Las células HASMC confluyentes se incubaron con medio de cultivo DMEM o bien con medio calcificante suplementado con 2,5mM de fosfato y 2 mM de calcio durante 10 días. El medio se cambió cada 3 días. A. Ejemplo de tinción de rojo alizarina. B. Cuantificación colorimétrica del contenido de calcio en los tiempos indicados normalizada por el contenido de proteína celular total. Los valores representan la media \pm SEM. *** $p < 0,001$.

Una vez determinado que las HASMC son capaces de desarrollar calcificación, se estudió si el suero urémico era capaz de inducir este proceso en el mismo modelo celular.

La deposición de matriz calcificante se puso en evidencia mediante la formación de núcleos de mineralización en el cultivo. Como se demuestra el figura 4A, las HASMC incubadas en condiciones urémicas sintetizaron y secretaron matriz extracelular con depósitos de calcio en la placa de cultivo a lo largo de 10 días. Observamos agregados

irregulares reconocidos como compuestos ricos en calcio por su intensa coloración rojo oscuro.

La cuantificación de la tinción rojo de alizarina nos permitió corroborar que en presencia de un 20% de suero urémico en el medio de cultivo, la deposición de calcio se incrementa significativamente de una manera dependiente del tiempo, en comparación con las células tratadas con suero control (Figura 4B). Esto indica que el suero urémico produce calcificación en HASMC.

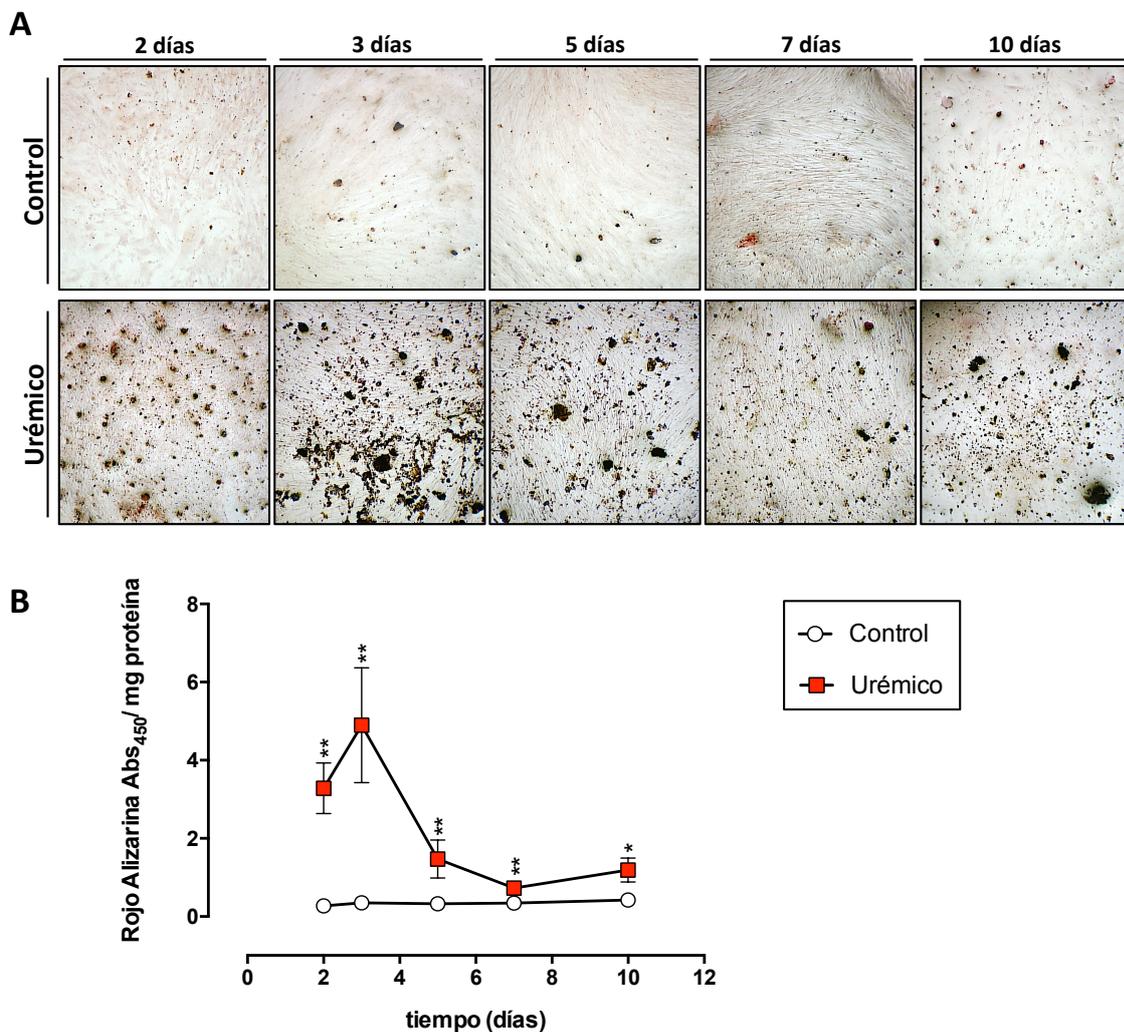


Figura 4. Efectos del suero urémico en la deposición de calcio en HASMC a diferente tiempo de incubación. Tras la confluencia, las HASMC se incubaron con medio de cultivo suplementado con un 20 % de suero control o un 20 % de suero urémico durante 10 días. El medio se cambió cada 3 días. A. Tinción rojo de alizarina. B. Cuantificación colorimétrica del contenido de calcio en los tiempos indicados, normalizada por el contenido de proteína celular total. Los valores se representan como media \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Cabe destacar que el suero urémico es capaz de inducir la calcificación en condiciones basales de fosfato. Las células musculares fueron incubadas en medio suplementado con suero urémico sin adicionarle fosfato. La concentración de fosfato inorgánico en la mezcla de sueros es de 1,89 mmol/L. Al adicionar un 20% de suero al medio de cultivo, se diluyó una quinta parte la concentración de fosfato final de modo que, el medio de experimentación con suero urémico tenía una concentración final de 1,28 mM de fosfato. Bajo estas condiciones normofosfatémicas, el suero urémico fue capaz de incrementar el calcio en las HASMC siguiendo un patrón similar al de la inducción de la calcificación por fosfato (Figura 5). Entre los días 2 y 3 no hubo diferencias significativas entre el proceso de calcificación producido por el fosfato y el producido por el suero urémico. A partir del día 5, el contenido mineral de sales cálcicas experimentó un descenso en ambas condiciones pero, más drásticamente en el caso del suero urémico cayendo hasta $1,5 \pm 0,5$ U/mg de proteína. Hasta finalizar el ensayo, el depósito mineral disminuyó de forma significativa en las células incubadas con suero control con respecto a las células incubadas con alta dosis de fosfato.

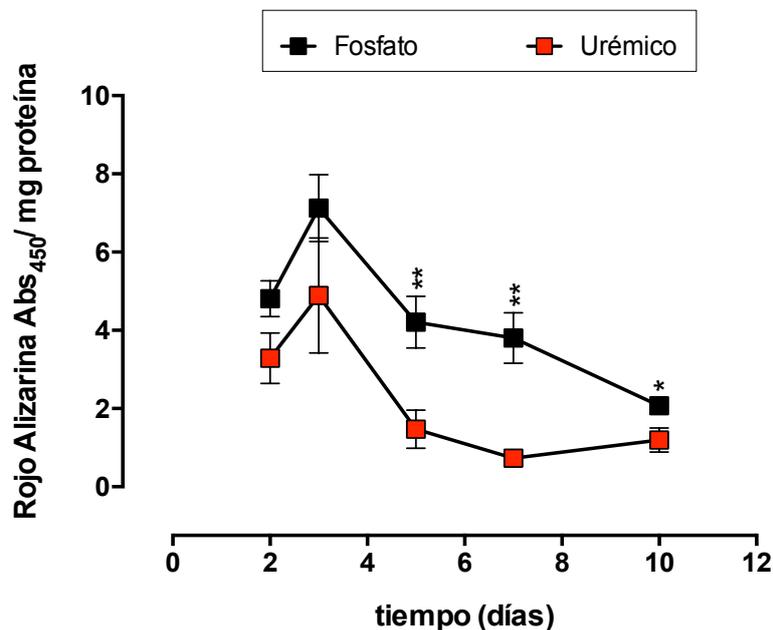


Figura 5. Efectos del suero urémico y el fosfato en la deposición de calcio en HASMC a diferentes tiempos de incubación. Tras la confluencia, las HASMC se incubaron con medio de cultivo suplementado con un 20 % de suero urémico y con 2,5 mM Pi y 2 mM Ca²⁺ durante 10 días. El medio se cambió cada 3 días. El contenido de calcio se midió en los tiempos indicados con la tinción rojo alizarina, normalizada por el contenido de proteína celular total, y se representa como media \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

1.3.- EVALUACIÓN DE MARCADORES GÉNICOS DE DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA.

Diversos estudios han demostrado la capacidad de diferenciación de las VSMC hacia un linaje osteogénico en respuesta a la uremia (Nitta 2011; Cozzolino, Gallieni, and Brancaccio 2006; Mizobuchi, Towler, and Slatopolsky 2009). Debido a esto y a que en el ensayo anterior se observó una mineralización de las HASMC, incubadas en presencia de suero urémico, analizamos la expresión de una serie de genes implicados en la regulación de la mineralización y diferenciación ósea.

Para determinar si el tratamiento con suero urémico estimulaba la expresión de genes osteoblásticos, las HASMC fueron incubadas en medio con suero urémico y control durante 2, 3, 5 y 7 días. Como control positivo se incubaron paralelamente HASMC en condiciones hiperfosfatémicas (2,5 mM Pi+ 2 mM Ca²⁺). Se analizaron mediante PCR cuantitativa marcadores claves en los procesos de diferenciación osteoblástica y condrogénica como RUNX2 y SOX9, respectivamente, además de un factor de transcripción como es MSX2, necesario para el correcto desarrollo del tejido óseo (Giachelli 2004).

Cuando realizamos el análisis de la expresión de estos genes, pudimos observar que el gen MSX2 estaba sobreexpresado significativamente en las HASMC incubadas en condiciones urémicas al compararlas con las incubadas con sueros sanos para casi todos los días de ensayo, como se observa en la Figura 6. El gen SOX9 mostró un patrón de expresión similar, siendo el incremento de expresión en condiciones urémicas significativo para todos los días, exceptuando el día 3. Se observa además que su expresión aumenta gradualmente a lo largo del tratamiento. De la misma forma, la expresión de RUNX2 fue mayor en las HASMC cultivadas con suero urémico al compararlas con las células incubadas con suero control tanto para el día 2 como para el resto de días.

En condiciones hiperfosfatémicas, nuestro control positivo de mineralización, se incrementó la expresión génica de MSX2 y SOX9 al igual que ocurría en condiciones urémicas, aunque el incremento fue significativamente superior con respecto a ésta última. Sin embargo, como se observa en la figura 6, la expresión de RUNX2 es significativamente inferior para cada uno de los días de ensayo con respecto a las

HASMC incubadas con suero urémico, indicando que la respuesta celular al suero urémico presenta diferencias con la desencadenada por la hiperfosfatemia.

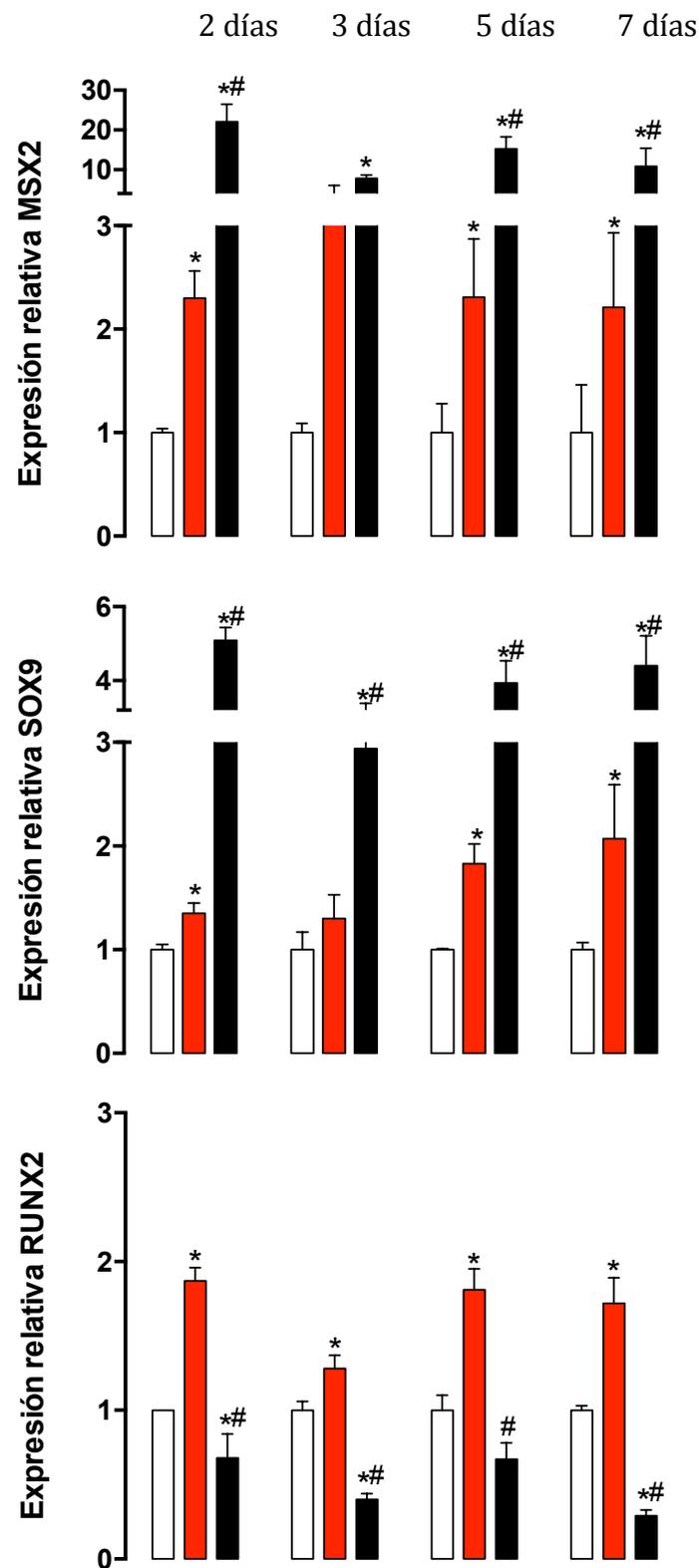


Figura 6. Cuantificación relativa de la expresión génica de los genes MSX2, SOX9 y RUNX2 en las HASMC tras 7 días en cultivo. Las barras muestran la cuantificación promedio del nivel de expresión génica

(media \pm SEM) de células incubadas con suero control (blanco), células incubadas con suero urémico (negro) y células incubadas con alta concentración de Pi (rojo). *significativo vs suero control; # significativo suero urémico

El cotransportador de fosfato dependiente de sodio, Pit-1 está considerado un factor importante en la mediación de esta diferenciación osteocondrogénica (Mizobuchi et al. 2006). Se ha descrito previamente que niveles altos de fósforo estimula la actividad del cotransportador y la carga, mientras niveles elevados de calcio induce la expresión de mRNA de Pit-1 (Villa-Bellosta et al. 2011). En nuestro modelo de estudio la expresión de este transportador aumentó rápidamente en respuesta a la hiperfosfatemia y con una cinética más lenta en respuesta al suero urémico, donde se observó un incremento significativo en las HASMC incubadas con suero urémico tras 7 días de tratamiento (figura 7). Es necesario resaltar que a los 5 días de tratamiento el nivel de expresión de Pit-1 es igual a la condición control, sugiriendo que la regulación de este transportador podría ser no sólo dependiente de estímulo, sino además bifásica.

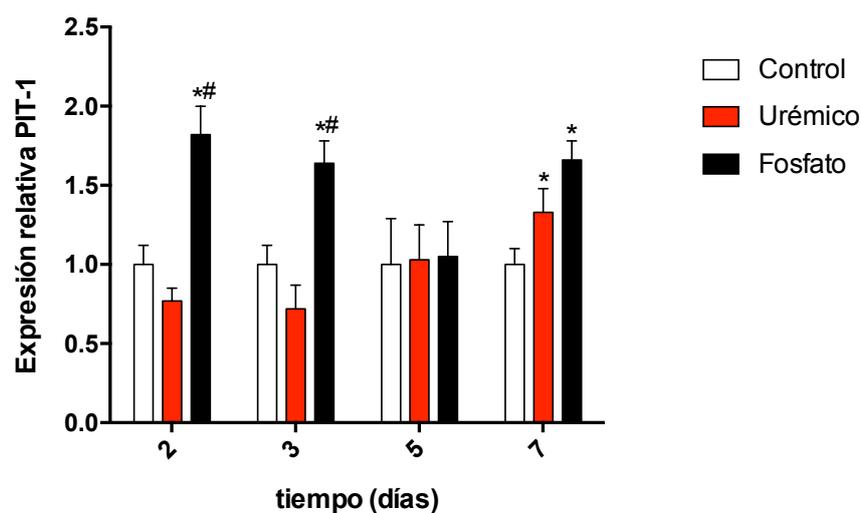


Figura 7. Cuantificación relativa de la expresión génica de PIT-1 en HASMC. Las células fueron cultivadas durante 7 días en presencia de un 20% de suero urémico (negro), un 20% de suero control (blanco) y con alta concentración de Pi (rojo). Cada barra representa las media de 3 experimentos independientes (media \pm SEM). *significativo vs suero control; # significativo vs suero urémico

Asimismo, se determinó la expresión de un marcador de células musculares lisas, TAGLN (transgelina, también conocida como SM22 α) con objeto de comprobar si el aumento de expresión de genes osteogénicos está acompañado de una pérdida de marcadores de músculo liso. La expresión de TGLN a lo largo de los días de incubación en condiciones urémicas no se vio modificada con respecto a las células cultivadas con

suero control (Figura 8). Sin embargo, el tratamiento con hiperfosfatemia sí indujo la disminución de la expresión de este marcador (Figura 8).

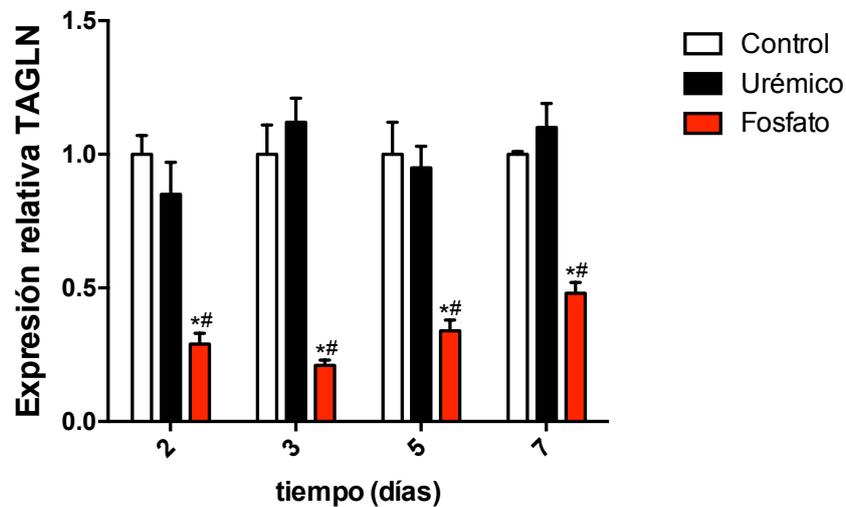


Figura 8. Cuantificación relativa de la expresión génica del marcador de músculo liso vascular TAGLN en HASMC. Las células fueron cultivadas durante varios días en presencia de un 20% de suero urémico (negro), suero control (blanco) y con alta concentración de Pi (rojo). Cada barra representa la media de 3 experimentos independientes (media \pm SEM) de células incubadas con suero control (blanco), células incubadas con suero urémico (negro) y células incubadas *significativo vs suero control; # significativo suero urémico

Dado que la deposición de matriz parecía disminuir a partir del día 3 (figura 4) se incluyó en este apartado el análisis de la expresión de genes reguladores de la osteogénesis. Así, se comprobó como la expresión de SPP1 (*secreted phosphoprotein 1*, también conocida como osteopontina u OPN), un factor inhibidor de la mineralización, que fue significativamente mayor en las HASMC incubadas con suero urémico al compararlas con las cultivadas en suero control, aunque sin diferencias significativas para el día 5, donde parece disminuir su expresión. La incubación con alto fosfato aumentó de forma significativa la expresión de OPN en todos los tiempos de tratamiento estudiados.

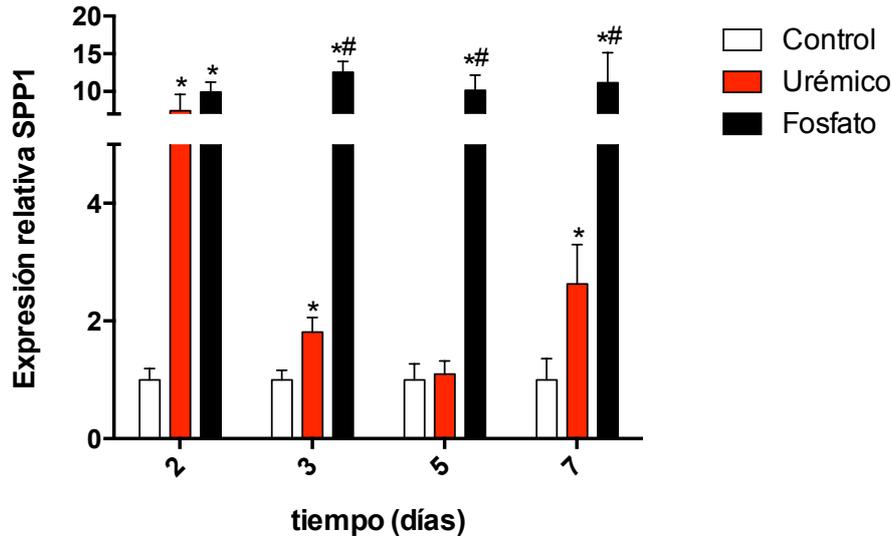


Figura 9. Cuantificación relativa de la expresión génica de SPP1 en HASMC. Las células fueron cultivadas durante 7 días en presencia de un 20% de suero urémico (negro), suero control (blanco) y con alta concentración de Pi (rojo). Cada barra representa las media de 3 experimentos independientes (media \pm SEM) de células incubadas con suero control (blanco), células incubadas con suero urémico (negro) y células incubadas *significativo vs suero control; # significativo suero urémico

Los resultados en los análisis de expresión mostraron que las HASMC cultivadas en condiciones urémicas presentan un incremento en la expresión de MSX2 y RUNX2, durante todo el tratamiento, sugiriendo la presencia de un proceso osteogénico. Para complementar estos resultados decidimos evaluar la expresión y actividad de otro marcador de diferenciación osteogénica como es la fosfatasa alcalina.

Cuando se analizó la expresión de fosfatasa alcalina (ALP) no encontramos diferencias entre las HASMC incubadas en suero control y suero urémico hasta de 5 días de tratamiento. Sin embargo, en el día 7 pudimos comprobar que el incremento en la expresión génica era claramente significativo ($p=0,0043$) en células incubadas en uremia con respecto a la condición control (Figura 10). Sorprendentemente, la expresión de ALPL es inferior en las células incubadas en condiciones hiperfosfatémicas durante los 7 días de incubación, sugiriendo que el modelo de calcificación inducido por hiperfosfatemia es poco representativo de las condiciones *in vivo*.

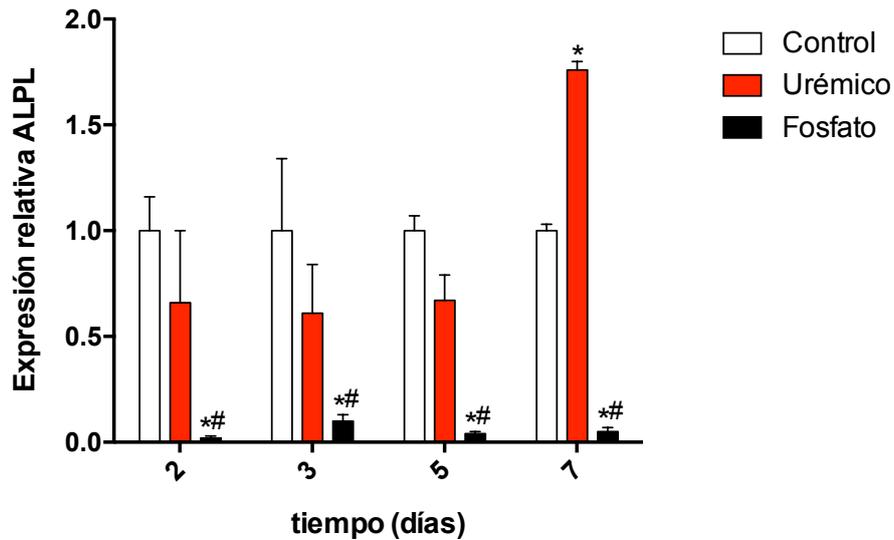


Figura 10. Cuantificación relativa de la expresión génica de ALP en HASMC. Las células fueron cultivadas durante el tiempo indicado en presencia de un 20% de suero urémico (negro), un 20% de suero control (blanco) y con alta concentración de Pi (rojo). Cada barra representa las media de 3 experimentos independientes (media \pm SEM). *significativo vs suero control; # significativo vs suero urémico.

1.4.- ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA.

La isoforma ósea/renal/hepática de fosfatasa es uno de los marcadores bioquímicos de la actividad osteoblástica mas ampliamente utilizados. Su actividad se ha demostrado estar asociada al proceso de mineralización de la matriz ósea. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con suero urémico induce un aumento significativo en la actividad fosfatasa alcalina con respecto a las células incubadas en suero control en cada uno de los puntos analizados. Se puede observar que la máxima actividad se produce en el día 10 del cultivo (Figura 11).

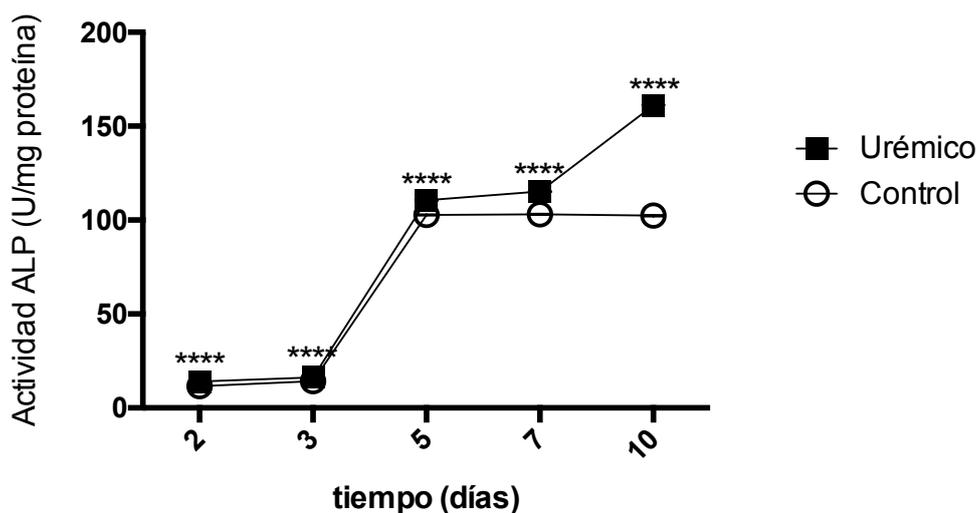


Figura 11. Actividad fosfatasa alcalina en HASMC. Las células fueron cultivadas durante 10 días en presencia de un 20% de suero urémico (negro) y un 20% de suero control (blanco). Cada barra representa las media de 3 experimentos independientes (media \pm SEM). * $p < 0,0001$ vs suero control.

1.5.- ESTUDIO DEL EFECTO DEL SUERO URÉMICO SOBRE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA

1.5.1.- Actividad metabólica mitocondrial por ensayo XTT

Los ensayos de viabilidad por XTT proporcionan una medida de la actividad metabólica, directamente relacionada con el número de células vivas. Este método nos permitió comprobar si el suero urémico es capaz de afectar a la viabilidad de las HASMC. Como puede apreciarse en la figura ¿?, tanto el porcentaje de viabilidad de las células sometidas a uremia como el de las células estimuladas con suero control, sufre un incremento significativo ($p < 0.001$) en su actividad metabólica dependiente del tiempo de exposición. La viabilidad metabólica de las células incubadas con suero urémico durante 2 días fue un 13,7 % menor que las células incubadas en condiciones control. Asimismo, tras 5 y 10 días de incubación, el grupo control continúa presentando porcentajes de viabilidad significativamente mayores que los que presenta el grupo urémico, manteniendo una diferencia de un 11,7% y un 9,4% respectivamente (Figura 12). Estos datos demuestran que el suero urémico es capaz de disminuir la

actividad metabólica de las HASMC de forma significativa durante los 10 días de tratamiento.

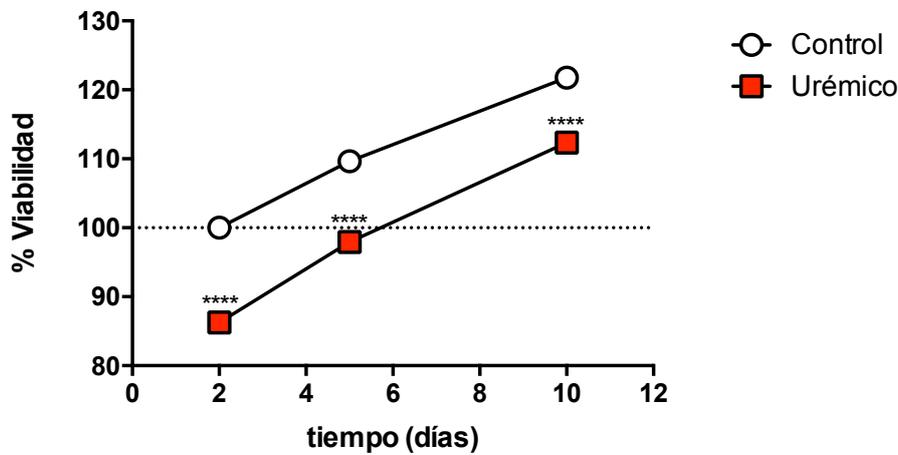


Figura 12. Efecto del suero urémico sobre la viabilidad de HASMC a diferentes tiempos de incubación. Las células HASMC fueron incubadas durante 1, 2 y 5 días en presencia de un 20% de suero urémico y un 20% de suero control. El porcentaje de viabilidad se determinó con respecto al grupo control del día 2. Cada punto representa la media de 3 experimentos independientes (media \pm SEM). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test t-Student; **** $p < 0.0001$.

1.5.2.- Contaje celular

El contaje celular se realizó para comprobar si el descenso detectado en la actividad metabólica en presencia de suero urémico pudiera deberse a un efecto sobre la proliferación celular. Para todos los tiempos de incubación observamos una tendencia a que el suero urémico provoca un descenso en el número total de células del cultivo, que únicamente alcanza la significación al quinto día (Figura 13A). Si se tiene en cuenta exclusivamente el número de células viables se puede apreciar que el suero urémico presenta un efecto significativo en cada uno de los días de incubación (figura 13B).

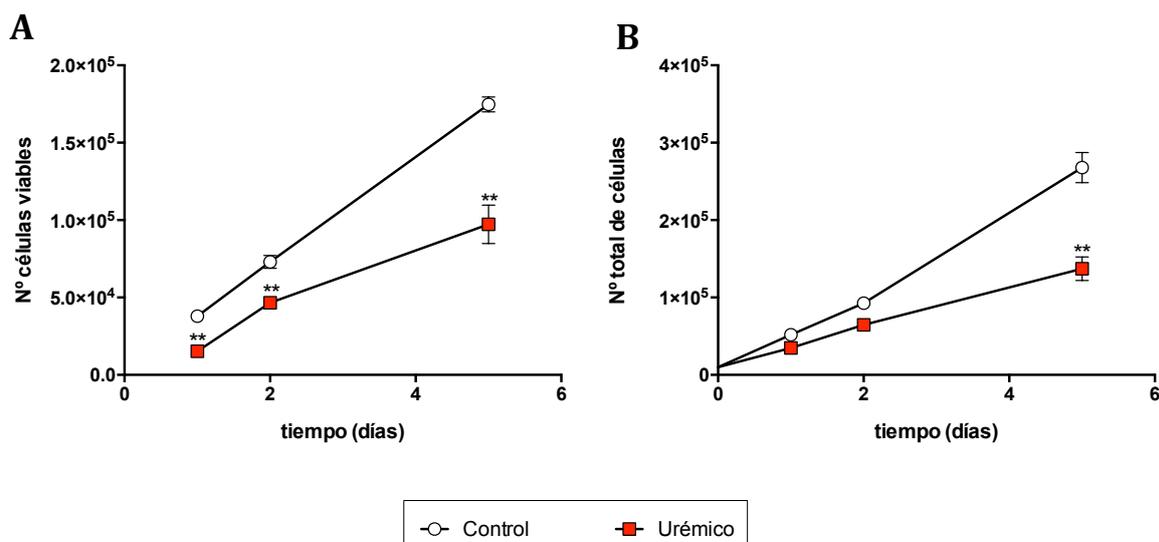


Figura 13. Efecto del suero urémico sobre el número de células HASMC a diferentes tiempos de incubación. A. Número de células viables. B. Número de total de células. Las células HASMC fueron incubadas durante 1, 2 y 5 días en presencia de un 20% de suero urémico y un 20% de suero control. El número de células se determinó mediante el conteo mediante cámara de Neubauer con azul tripán. Cada punto representa la media de 3 experimentos independientes (media \pm SEM). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test t-Student; ** $p < 0.01$.

1.5.3.- Influencia del suero urémico sobre la capacidad de síntesis de DNA de HASMC

Una vez comprobados los efectos del suero urémico sobre el número de células vivas en cultivo y el proceso de apoptosis se estudió la incorporación de EdU como medida de la capacidad de síntesis de DNA en las mismas, proceso a su vez relacionado con la capacidad de proliferación de las HASMC. Los resultados obtenidos muestran un aumento estadísticamente significativo y gradual de la proliferación en ambas condiciones experimentales. Si bien ambos tipos de suero producían un comportamiento similar en las HASMC, durante las primeras 12 horas del experimento (Figura 14) es a partir de las 24 horas, cuando el suero urémico comienza a mostrar una tendencia hacia una disminución en la tasa proliferativa de las HASMC, que se volvió significativa a las 48 horas, donde encontramos una disminución de un 15% con respecto al grupo control.

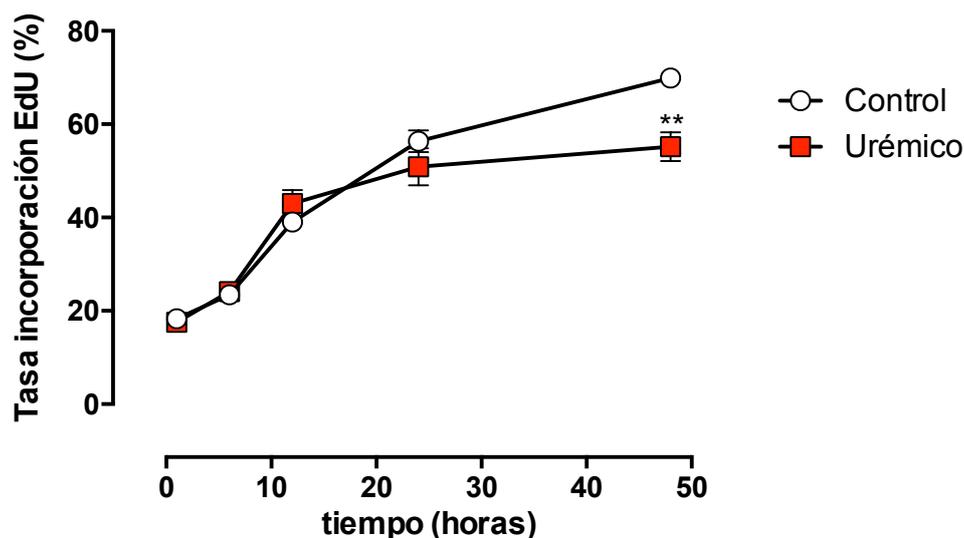


Figura 14. Efecto del suero urémico en la incorporación de EdU en HASMC a diferentes tiempos de incubación. Las células HASMC fueron incubadas durante 48 horas en presencia de un 20% de suero urémico y un 20% de suero control. Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes realizados por duplicado (media \pm SEM). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test t-Student; ** $p < 0.01$. Las comparaciones múltiples se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) con prueba post-hoc HSD de Tukey.

1.6.- APOPTOSIS

Con objeto de comprobar si el descenso en el número de células viables en presencia de suero urémico se debe a una inducción de apoptosis, se procedió a la cuantificación de la presencia de anexina V en la membrana plasmática junto a la permeabilidad al yoduro de propidio. A partir de primer día de tratamiento y hasta el día 5 el porcentaje de células apoptóticas resultó superior en las HASMC sometidas a uremia, tanto si se tiene en cuenta el número de células en apoptosis temprana (anexina V positivas pero negativas al marcaje con yoduro de propidio) como si se tiene en cuenta las células en apoptosis tardía (positivas para ambos marcadores). Sin embargo, se distingue un descenso gradual en el porcentaje de apoptosis a lo largo de los días, que sucede del mismo modo, en las células incubadas en condiciones control.

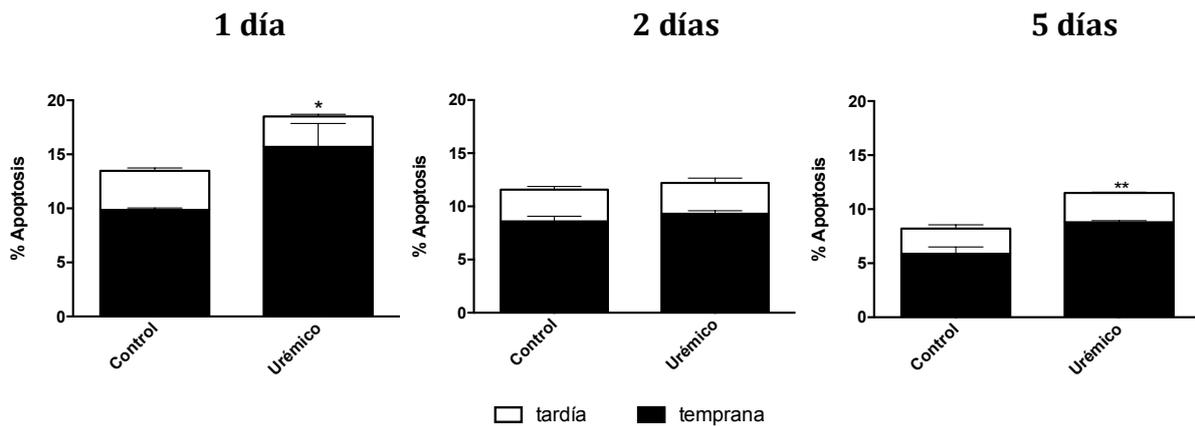


Figura 15. Efecto del suero urémico sobre la apoptosis de células HASMC a diferentes tiempos de incubación. Las células HASMC fueron incubadas durante 1, 2 y 5 días en presencia de un 20% de suero urémico y un 20% de suero control. El porcentaje de apoptosis se determinó usando anexina V (apoptosis temprana) y anexina V y yoduro de propidio (apoptosis tardía). Cada barra representa la media de 3 experimentos independientes (media \pm SEM). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test t-Student; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

1.7.- ESTUDIO DEL EFECTO DEL SUERO URÉMICO SOBRE LA CAPACIDAD DE MIGRACIÓN.

El cambio fenotípico de las células de músculo liso vascular asociado a enfermedad puede ocurrir con un aumento no sólo en su tasa de proliferación sino también en su capacidad de migración. Con el objetivo de conocer si el suero urémico podría tener efecto en la capacidad migratoria de las HASMC, se utilizó el ensayo de cicatrización de herida en placa. Los resultados demostraron que las HASMC incubadas en suero control son capaces de migrar y cerrar por completo la herida tras 5 días (120 horas) post-lesión. Por el contrario, las células incubadas con suero urémico demuestran una capacidad muy limitada de migración, no llegando a ocupar el 20% del total del área lesionada (Figura 16).

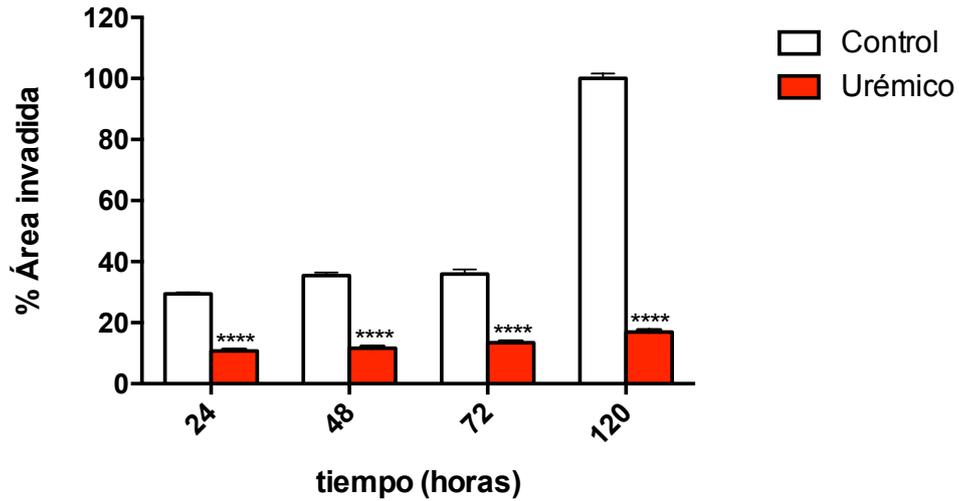


Figura 16. Efecto del suero urémico sobre la migración en células HASMC. Las células HASMC fueron incubadas durante 24 horas en presencia de un 20% de suero urémico y un 20% de suero control y posteriormente de mantuvieron en medio libre de suero 24 horas más y se tomaron microfotografías a 0, 24, 48, 72 y 120 horas. Cada barra representa la media del área ocupada por células en la herida por triplicado para tres experimentos (\pm SEM). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante análisis de varianza (ANOVA) con prueba post-hoc HSD de Tukey. **** $p < 0.0001$

PARTE 2.- REMODELADO DE LOS CANALES IÓNICOS EN HASMC DURANTE LA UREMIA.

2.1.- REMODELADO DE LA EXPRESIÓN DE SUBUNIDADES DE CANALES IÓNICOS INDUCIDA POR SUERO URÉMICO EN HASMC

2.1.1.- Expresión relativa de canales iónicos en HASMC en condiciones control

Los cambios coordinados en la expresión de canales iónicos son un componente integral de plasticidad del músculo liso, ya que redirigen la actividad bioquímica de la célula hacia nuevas respuestas funcionales (Jackson 2005b; Neylon 2002). Es por tanto imprescindible estudiar en mayor profundidad los cambios en el patrón de expresión génica de los principales canales iónicos implicados en la función de la célula muscular lisa vascular y sus repercusiones funcionales.

En este trabajo se expone una caracterización del perfil global de expresión de canales iónicos presentes en células de músculo liso de aorta humana expuestas a suero urémico, como un excelente modelo para abordar el estudio del fenómeno de calcificación vascular y cambios fenotípicos asociados. Para ello se han empleado matrices de baja densidad con sondas TaqMan que permitieron analizar mediante PCR cuantitativa decenas de genes de forma simultánea.

Se estudiaron los niveles de expresión transcripcional de 92 genes que codifican subunidades de canales iónicos. Dentro de los genes seleccionados se incluyeron las subunidades α , β y γ de canales de K^+ , subunidades α de canales de Ca^{2+} y las subunidades α , β , γ y δ del canal epitelial de sodio (ENaC), canales de Cl^- y canales TRP. Así mismo, el panel incluyó los controles endógenos gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), β -2 microglobulina (B2M) y el RNA ribosomal 18S.

En la figura 17 se muestra la expresión de 62 genes normalizada, respecto al control interno GAPDH, en HASMC incubadas en condiciones control. Aquellos genes que no aparecen representados fueron indetectables en el ensayo. Los genes se

muestran agrupados por familias de canales iónicos y cada una de las familias se representa con un color diferente (Figura 17).

Detectamos la expresión de dos canales de Cl⁻, CLCN3, sensible a voltaje, y CLCA2. Con respecto a los canales de K⁺ rectificadores de entrada (Kir) predomina la expresión de Kir2.2. Asimismo, podemos destacar la expresión del Kir6.1 y su subunidad asociada SUR2. Entre los canales de K⁺ de doble poro (K2P), destaca la elevada expresión de los canales TREK1 y TWIK1. Los miembros de la familia de canales de K⁺ activados por Ca²⁺ se expresan de forma sustancial. Entre los canales de baja conductancia SK destaca la expresión de SK4, seguido por SK2 y SK3, mientras que los niveles de SK1 son muy inferiores. Por otro lado, la subunidad α formadora de poro del canal de alta conductancia BK se expresa a alto nivel y se asocia a una elevada expresión de las subunidades β 1 y β 4, mientras que la subunidad β 2 apenas es detectada. En cuanto a los canales de K⁺ dependientes de voltaje (Kv), se observa una expresión heterogénea. Los niveles de expresión más elevados correspondieron a los canales Kv4.1 y Kv7.5 y a la subunidad β 1 de canales Kv (KCNAB1). Los niveles de expresión más reducidos entre los genes Kv expresados en HASMC los encontramos en los canales Kv3.3, Kv10 y, particularmente, Kv1.3, para el cual casi no se detecta expresión. Asimismo, en la condición control se detectó expresión de un gran número de canales TRP de las subfamilias TRPC, TRPV, TRPM y TRPP.

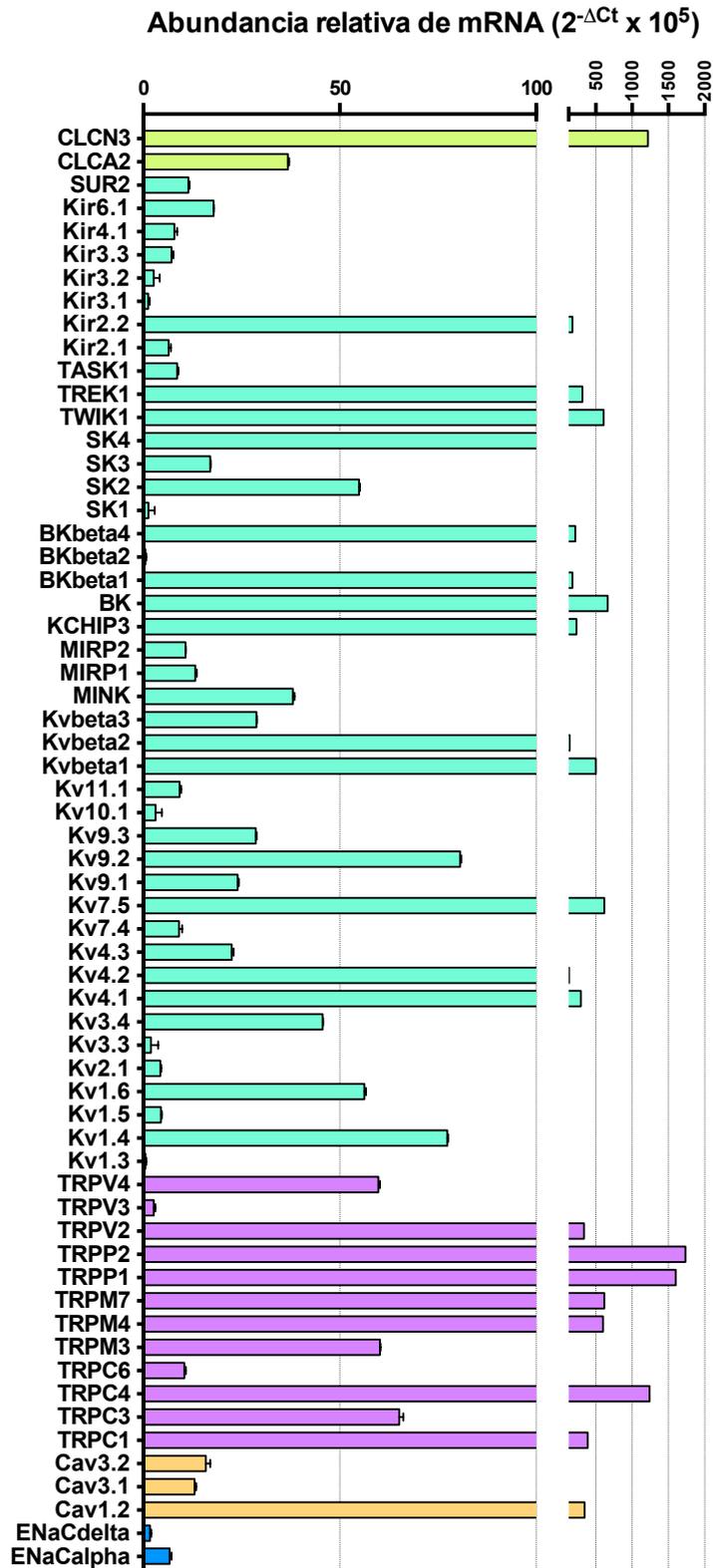


Figura 17. Abundancia relativa de los canales iónicos en HASMC en condiciones control.

Las células HASMC se mantuvieron durante 5 días en presencia de un 20% de suero control. Los niveles de expresión están normalizados con respecto a GAPDH. La abundancia relativa se expresó como $2^{-\Delta Ct} \times 10^5$.

Los canales TRPP1 y TRPP2 son los más abundantes en esta condiciones, junto con el TRPC4. Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje están representados por miembros de las subfamilias Cav1, fundamentalmente Cav1.2, cuya expresión fue las más elevada, y Cav3, concretamente Cav3.1 y Cav3.2, cuya expresión fue bastante más moderada que la anterior. Finalmente, se encontró expresión del canal ENaC, concretamente de las subunidades α y δ .

2.2.2.- Cambios en la expresión de los canales iónicos tras la exposición de HASMC a suero urémico

Con la finalidad de obtener una visión global de la expresión de canales iónicos y sus subunidades en ambas condiciones experimentales, se realizó un análisis en racimo (*cluster*) de los genes que reveló la existencia de un patrón de expresión diferencial. La figura 18 muestra una clara división de los genes en dos grandes grupos o *clusters*, según la respuesta de las HASMC al tratamiento. Encontramos genes cuya expresión se vio aumentada como consecuencia de la exposición al suero urémico y genes cuya expresión disminuyó o no sufrió variación, proporcionando una primera aproximación hacia la identificación de los genes de canales iónicos asociados al proceso de cambio fenotípico. Asimismo, dicho análisis reveló una subclasificación dentro de cada uno de los grupos donde encontramos una analogía en el patrón de expresión de diversos grupos de genes. Dentro del primer *cluster* encontramos agrupaciones de genes con cierta heterogeneidad dentro la misma condición pero, con similitud en el patrón de expresión de genes entre condiciones (A). Por otra parte identificamos un grupo de genes que muestra claramente una menor expresión en un entorno urémico (B). Finalmente, el segundo *cluster* reveló el agrupamiento de genes cuya expresión era claramente más elevada en HASMC sometidas a uremia (D). También encontramos una agrupación de genes cuya expresión parece ser más elevada en esta condición aunque las muestras presentan una cierta heterogeneidad (C).

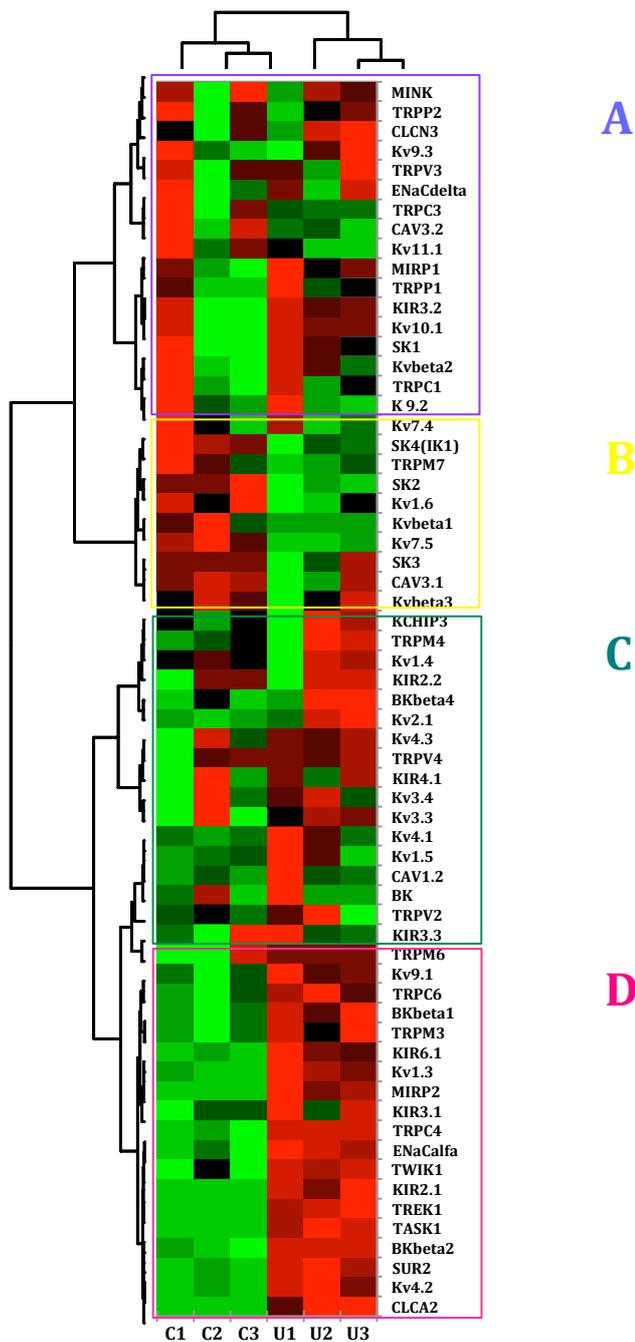


Figura 18. Análisis cluster de la expresión de los canales iónicos en HASMC. El análisis se aplica a 62 genes (dispuestos horizontalmente) y a cada una de las muestras obtenidas de HASMC incubadas durante 5 días con un 20% de suero control (C1 a C3) o suero urémico (U1 a U3). La expresión se calcula como $2^{-\Delta Ct}$ para cada gen. Los genes se agrupan según patrones de expresión siguiendo un código de color, el color rojo representa un aumento de la expresión de los genes y el color verde una disminución de la expresión. La longitud de las ramas del diagrama de árbol es proporcional a la correlación del patrón de expresión de los genes. Los recuadros agrupan los genes con un comportamiento similar.

De la misma forma, los cambios producidos por el suero urémico en el perfil de expresión de canales iónicos fueron analizados usando el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Esto nos permitió estudiar la significación de las diferencias de expresión para cada gen entre las HASMC incubadas con suero control y aquellas que fueron incubadas con suero urémico. Los aumentos en la expresión aparecen como valores positivos y la represión se refleja con valores negativos, mientras que los la ausencia de cambios se corresponde con valores cercanos a cero (figura 19). El análisis de los datos pone de manifiesto que el suero urémico es capaz de modificar significativamente la expresión de 17 genes de un total de 62. La presencia de suero urémico induce un aumento significativo en los niveles de expresión del canal de Cl^- activado por Ca^{2+} , CLCA2, del canal de K^+ rectificador Kir6.1 y los canales de doble poro TREK1 y TASK2. Igualmente, vemos incrementados de forma significativa subunidades de canales de K^+ como las subunidades β del BK (particularmente la subunidad $\beta 2$) y la subunidad accesoria MIRP2, así como los canales de K^+ dependientes de voltaje, Kv1.3, Kv4.2 y Kv9.1, el canal TRPC4 y finalmente, la subunidad α del canal ENaC. Además, la uremia provoca la disminución significativa de la expresión en HASMC de los canales de K^+ SK4, SK2 y Kv7.5, así como del canal TRPM7.

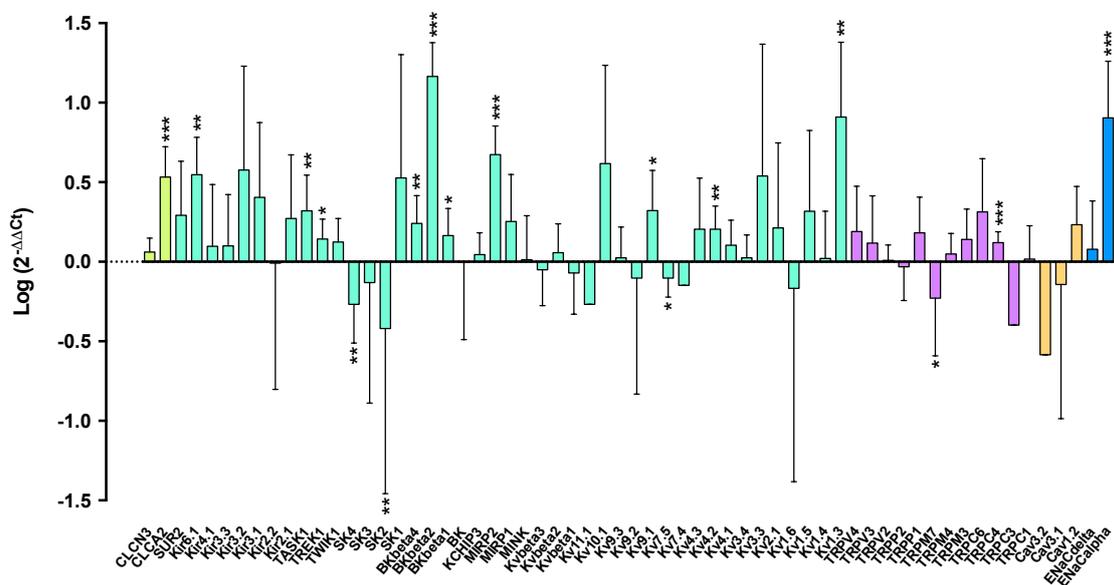


Figura 19. Cambios en la expresión de canales iónicos en HASMC incubadas en suero urémico. Las células HASMC se mantuvieron durante 5 días en presencia de un 20% de suero urémico o un 20% de suero control. Los cambios se calcularon como $\log(2^{-\Delta\Delta Ct})$, donde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(urémico)} - \Delta Ct_{(control)}$. Los valores negativos representan una disminución de la expresión y los valores positivos un aumento de la misma. Cada barra representa la media de 3 experimentos independientes (media \pm 95% CI (intervalo de

confianza). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test t-Student múltiple; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

2.2.- CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS CORRIENTES DE K⁺ ACTIVADAS POR VOLTAJE Y POR CALCIO EN HASMC

Usando las células de músculo de la aorta, hemos estudiado la correlación entre los cambios de expresión de los canales Kv y KCa y los cambios en las propiedades electrofisiológicas de las corrientes de K⁺. Las corrientes de salida de K⁺ de las HASMC, incubadas tanto en condiciones control como en condiciones urémicas, se estudiaron mediante la técnica de *patch clamp* en su configuración de *whole cell*.

Las corrientes BK_{Ca} se definieron como la fracción de corriente de salida sensible a paxilina 500 nM (Li & Cheung, 1999)*. La figura 20 muestra curvas I/V representativas obtenidas en HASMC incubadas tanto en condiciones control como urémicas. La densidad de corriente BKCa para células control alcanzó valores de $2,2 \pm 0,9$ pA/pF, mientras que en la células urémicas se obtuvieron valores menores ($0,45 \pm 0,2$ pA/pF).

Para determinar la contribución de los distintos canales Kv a la corriente total de salida, realizamos una disección farmacológica de la misma. La aplicación del bloqueante selectivo del canal Kv1.3 PAP-1 (100 nM) (Schmitz et al. 2005; Beeton et al. 2006) permitió cuantificar la proporción de este componente, todo ello en presencia de paxilina para bloquear las corrientes BK_{Ca}. Después del bloqueo de la corriente Kv1.3, se usó correolide (5 μ M) para bloquear selectivamente las corrientes Kv1 (Hanner et al. 1999) restantes. Finalmente, se aplicó TEA 20 mM para identificar la amplitud de la suma de los componentes Kv2 y Kv3 (Miguel-Velado et al. 2005).

Observamos una clara disminución en la proporción de corriente Kv (componente insensible a paxilina) entre ambas condiciones experimentales (Figura 20).

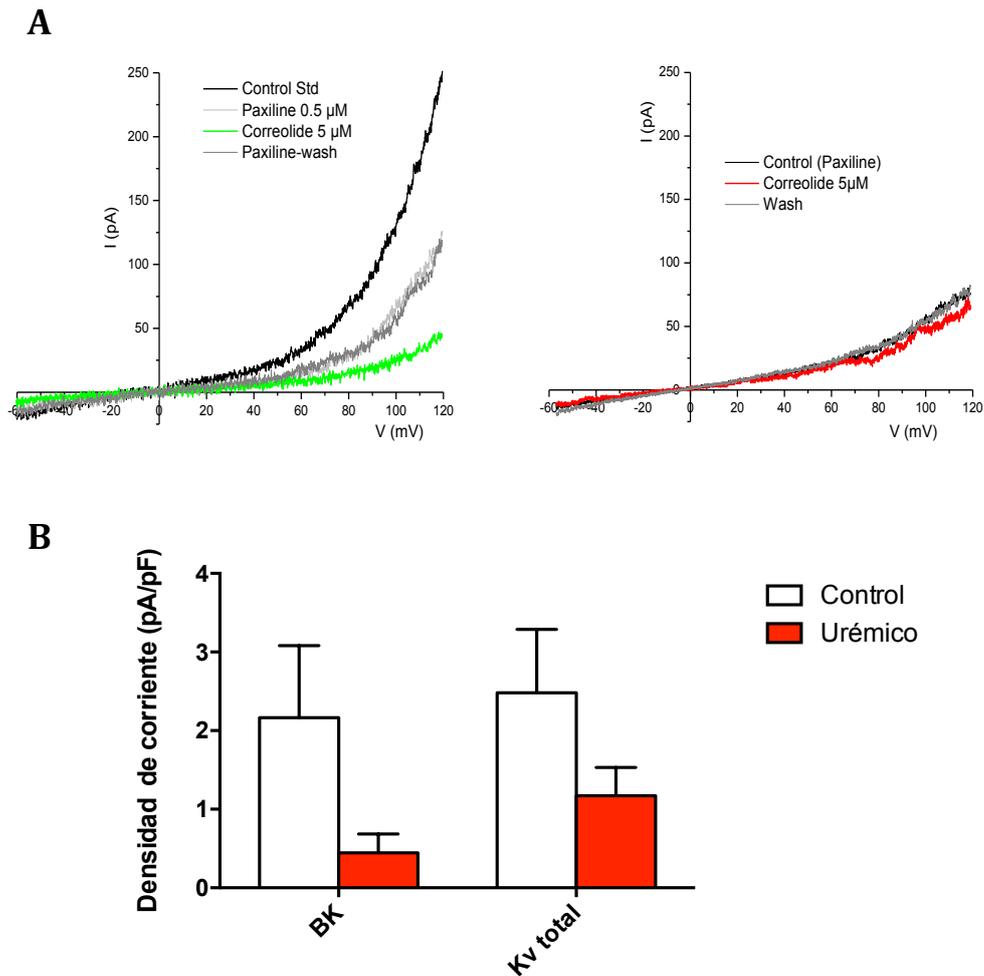


Figura 20. A. Curvas típica corriente vs voltaje (I-V) obtenidas a partir de registros de rampa. B. Densidad de corriente obtenida al despolarizar a +80 mV. La densidad de la corriente Kv se obtuvo tras la aplicación de 500 nM de paxilina para bloquear el componente BK_{Ca}. Cada barra representa la media±SEM de 5-10 células. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test t-Student.

Nuestros experimentos muestran que la densidad de corriente de canales tipo Kv1 (corriente bloqueada por correolide) fue significativamente menor en HASMC incubadas con suero urémico (0.94 ± 0.37 vs 0.15 ± 0.04 pA/pF, en suero control y urémico respectivamente). Sin embargo, hay que resaltar que la corriente mediada por Kv1.3 (sensible a PAP-1) disminuye en proporción menor que el resto de corrientes tipo Kv1 (figura 21B), de lo que se deduce que la contribución funcional de canales Kv1.3 a las características electrofisiológicas de las HASMC incubadas en suero urémico es mayor. Por último, se observa una menor contribución de otros canales Kv, como el Kv2 0.94 ± 0.37 vs 0.38 ± 0.24 pA/pF al total de corriente de salida de K⁺ (figura 21A).

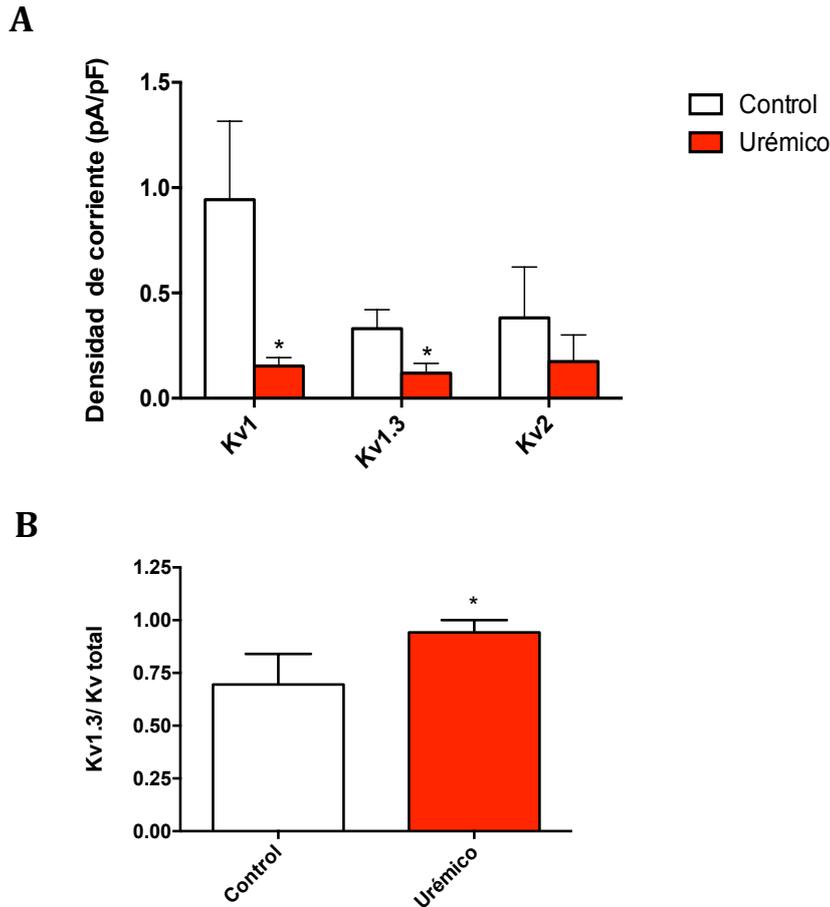


Figura 21. A. Densidad de corriente correspondiente a los diferentes componentes Kv en cada condición. B. Contribución del componente Kv1.3 (sensible a PAP-1) en función de la corriente total Kv. Cada barra representa la media \pm SEM de 5-10 células. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test t-Student; *p<0.05.

2.3.- CAMBIOS DE CONCENTRACIÓN DE Ca^{2+} INTRACELULAR INDUCIDOS POR EL SUERO URÉMICO EN HASMC

Teniendo en cuenta que los cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} participan en la regulación de la contractilidad de las células musculares lisas, es fisiológicamente relevante estudiar si el suero urémico produce cambios en la concentración citosólica de Ca^{2+} .

Con objeto de investigar las posibles alteraciones en la entrada de calcio durante la respuesta contráctil de las HASMC en presencia de uremia, hicimos uso de la hormona peptídica angiotensina II (Hilgers, Jin, and Palmer 2005). La adición de 10 μ M de angiotensina II produjo aumentos transitorios del Ca^{2+} intracelular en parte de las

células registradas, retornando a los niveles iniciales una vez lavamos con solución estándar. En cambio, en presencia de suero urémico ninguna célula reaccionó al estímulo de la angiotensina II. Estos resultados sugieren que durante la uremia la activación de receptores ROC podría estar comprometida.

Por otro lado, con la finalidad de conocer si el suero urémico era capaz de afectar a los depósitos intracelulares de Ca^{2+} y a su liberación de retículo sarcoplásmico, el ensayo se repitió en condiciones de ausencia completa del Ca^{2+} extracelular. Para ello, se cambió la solución externa por una de 0 Ca^{2+} y a continuación se añadió 10 μM de ácido ciclopiazónico (CPA), un inhibidor específico de la bomba Ca^{2+} /ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA). Esto genera la depleción del Ca^{2+} almacenado en el retículo sarcoplásmico, causando un aumento transitorio del Ca^{2+} intracelular, como puede observarse en las HASMC tratadas con suero control (figura 22). En contraposición, las células incubadas en suero urémico no reaccionan ante el estímulo del CPA, indicando que los depósitos intracelulares de Ca^{2+} en las HASMC urémicas podrían estar deplecionados.

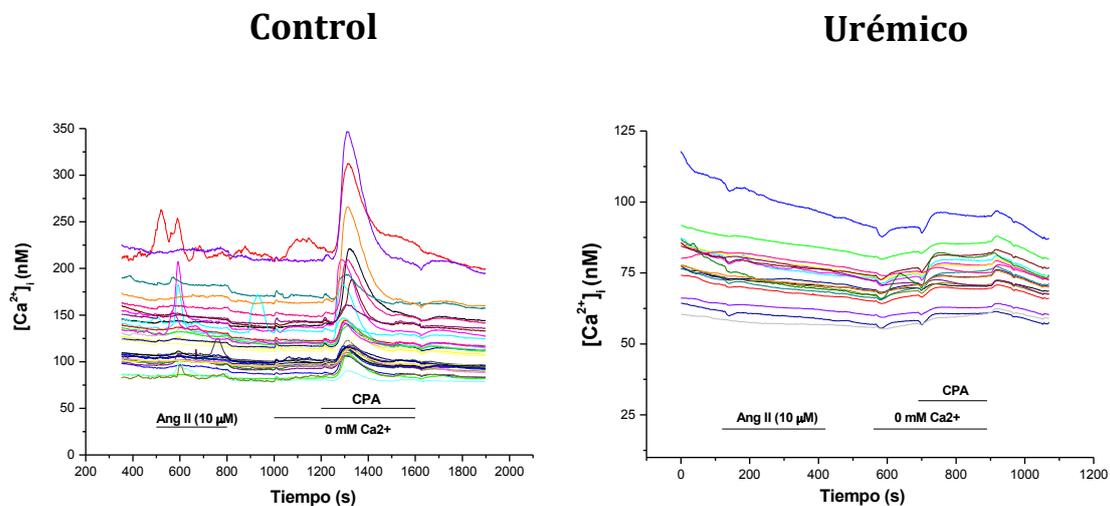


Figura 22. Medidas representativas de la concentración de calcio intracelular en HASMC incubadas en un 20% de suero control o en un 20% de suero urémico, a partir de la fluorescencia de Fluo-4. Cambios inducidos por 10 μM de angiotensina II en solución estándar y por 10 μM de CPA en solución estándar 0 Ca^{2+} .

2.4.- EFECTO DEL BLOQUEO DEL CANAL Kv1.3 SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LAS HASMC EN CONDICIONES URÉMICAS

El aumento de la expresión funcional en condiciones urémicas del canal Kv1.3 puede estar directamente implicado al menos en algunos aspectos del proceso de transdiferenciación. Para confirmar esta posibilidad, estudiamos el efecto de la supresión farmacológica selectiva de esta corriente sobre la capacidad proliferativa de las HASMC incubadas con suero urémico.

El índice proliferativo, determinado por el número de células que incorporan EdU, se vio significativamente disminuido por la adición del bloqueante específico del canal Kv1.3 (PAP-1), tanto en la condición control como en la condición urémica, desde el inicio del ensayo. Sin embargo, la supresión de la proliferación por el PAP-1 fue significativamente superior en las HASMC incubadas en suero urémico desde la primera hora del ensayo (figura 23 A). Concretamente las células tratadas con suero urémico reducen su porcentaje de incorporación de EdU al inicio del ensayo en un 7,8 % con respecto a la condición control que lo hace en un 3,6%. Este valor se hace máximo a las 12 horas del experimento dónde el PAP-1 inhibe un 12% más a las HASMC cultivadas en suero urémico que a las HASMC incubadas en condiciones control (figura 23 B). Es interesante resaltar que el efecto de PAP-1 sobre las células tratadas con suero urémico se hace visible antes de que el efecto del suero urémico sobre la proliferación sea evidente (figura 23 A).

En su conjunto, estos datos sugieren que el aumento de expresión de los canales Kv1.3 en células incubadas con suero urémico contribuye a su capacidad proliferativa en mayor medida que en el caso de las HASMC cultivadas con suero control.

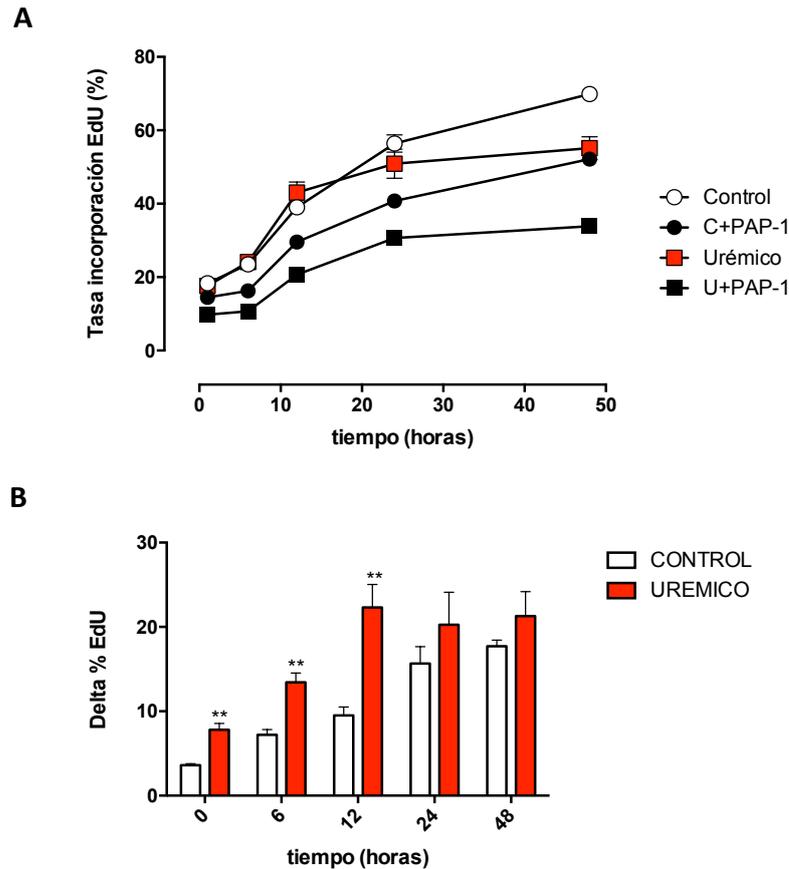


Figura 23. Efecto del inhibidor PAP-1 sobre la incorporación de EdU en HASMC en suero urémico o control a diferentes tiempos de incubación. Las células HASMC fueron incubadas durante 48 horas en presencia de un 20% de suero urémico o un 20% de suero control en presencia o ausencia de 100 nM del bloqueante del Kv1.3 PAP-1. Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes realizados por duplicado (media \pm SEM). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test t-Student múltiple; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Se representan sólo comparaciones seleccionadas.

2.5.- EFECTO DEL BLOQUEO DEL CANAL KV1.3 Y EL CANAL ENAC SOBRE LA MIGRACIÓN DE LAS HASMC

Una vez comprobado que el suero urémico reduce la capacidad migratoria de las HASMC, estudiamos el posible papel que tiene sobre este efecto el aumento de expresión tanto del canal de K^+ Kv1.3 como de la subunidad α del canal ENaC, los cuales han sido previamente implicados en fenómenos de migración celular y cierre de heridas epiteliales (Grifoni et al. 2006). Para ello estudiamos el efecto de la supresión farmacológica de Kv1.3 o bien de ENaC sobre las capacidad de migración de las HASMC durante la uremia. Las células se trataron con suero control o urémico durante 24 horas

y la migración se examinó 24 horas después de la formación de la herida, manteniendo las células en un medio libre de suero para minimizar la proliferación. La inhibición farmacológica se realizó con los bloqueantes específicos PAP-1 y amilorida para Kv1.3 e ENaC, respectivamente.

En todos los tiempos examinados el área invadida fue significativamente mayor en células incubadas previamente con suero control sin bloqueantes que en las tratadas con uno u otro bloqueante (figura 24 A). Esa diferencia en el porcentaje del área invadida aumenta con el tiempo y se hace máxima tras 120 horas, tiempo para el cual las células control cierran prácticamente al 100% la herida, mientras que las tratadas con PAP-1 o amilorida lo hacen sólo en aproximadamente un 50%. Estos datos sugieren que tanto Kv1.3 como ENaC contribuyen al proceso de migración celular, de forma consistente con los datos disponibles en la literatura (Cidad et al. 2010; Chifflet, Hernández, and Grasso 2005).

En contraste a los datos anteriores, en el caso de las células tratadas con suero urémico el efecto de ambos inhibidores es opuesto (figura 24 B). En las células en uremia y tratadas con PAP-1 el área invadida es aún menor que en aquellas que no fueron tratadas con el inhibidor del canal Kv1.3. El área invadida aumentó discretamente a lo largo de los días pero, únicamente alcanzo el 14,5% de repoblación de la placa con respecto a las células urémicas sin tratar con el inhibidor, que llegaron hasta un 16,9% (figura 24 B). Por el contrario, en el caso de las células tratadas con el inhibidor de ENaC, amilorida, se observa un incremento muy significativo del área repoblada en HASMC urémicas durante todos los días del ensayo (figura 24 B). Tras 48 horas, el porcentaje de invasión de células tratadas con amilorida correspondía a 22,3%, un 11,5 % más de invasión que las células urémicas sin tratar con el bloqueante. Estos datos son consistentes con un papel dual de ENaC, que parece ser necesario para la migración en condiciones normales pero que en condiciones en las que se induce su sobreexpresión, como por ejemplo durante la uremia, ejerce un efecto negativo sobre la capacidad de migración.

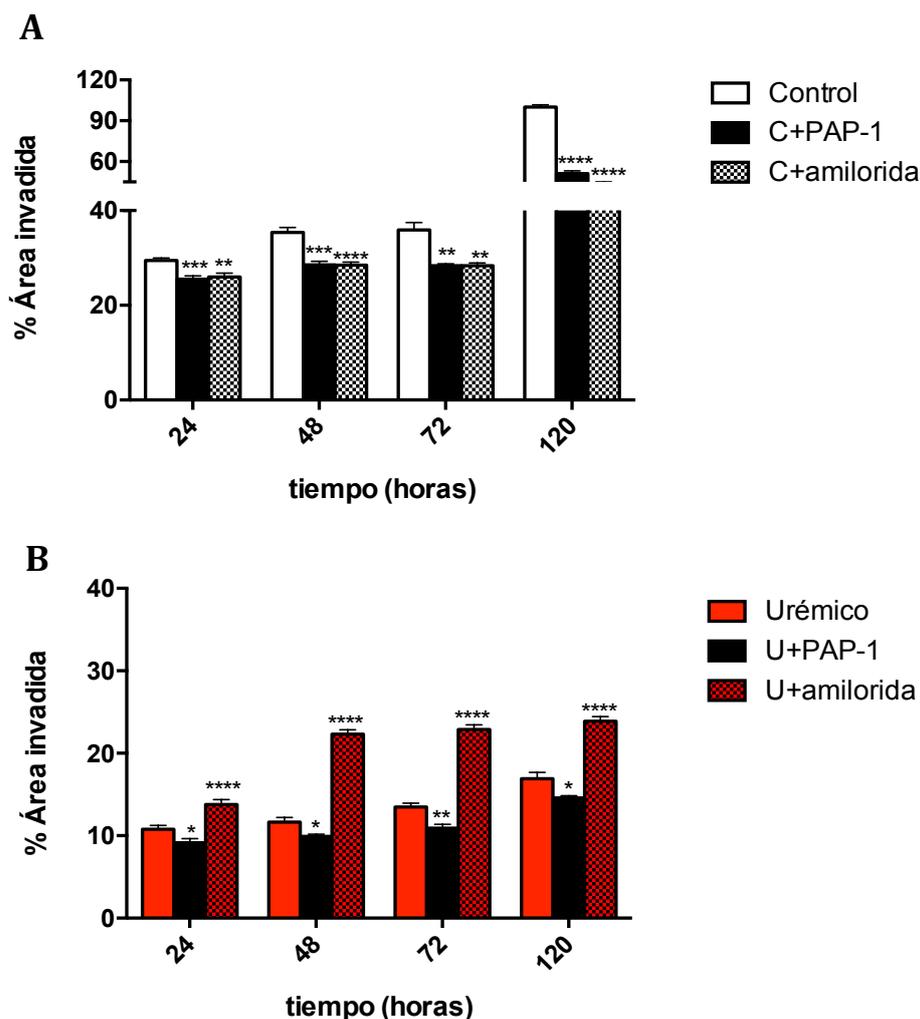


Figura 24. Efecto de los inhibidores de canales Kv1.3 (PAP-1) e ENaC (amilorida) sobre la migración en células HASMC tratadas con suero control o urémico. Las células HASMC fueron incubadas durante 24 horas en presencia de un 20% de suero urémico (B) o un 20% de suero control (A) y posteriormente de mantuvieron en medio libre de suero hasta 120 horas más en presencia de 100 nM de PAP-1 o 100 μ M de amilorida. Se tomaron microfotografías a 0, 24, 48, 72 y 120 horas. Cada barra representa la media del área ocupada por células en la herida por triplicado para tres experimentos (\pm SEM). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un t-Student múltiple. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

2.6.- PAPEL DEL CANAL Kv1.3 SOBRE LA CALCIFICACIÓN DE HASMC INDUCIDA POR UREMIA

Tras comprobar el papel del inhibidor del canal Kv1.3 en la proliferación y migración de las HASMC sometidas a condiciones urémicas, evaluamos su posible papel en la diferenciación de las células musculares lisas hacia un linaje con características

osteogénicas. De nuevo empleamos la detección citoquímica de la presencia de sales de calcio en el entorno de las células mediante la tinción con rojo alizarina, para determinar si el inhibidor de Kv1.3, PAP-1, era capaz de alterar el depósito de matriz calcificada en condiciones urémicas. Asimismo, usamos como control positivo del proceso células incubadas en condiciones calcificantes, es decir, con una concentración final de 2,5 mM de fosfato (Pi) y 2 mM de calcio (Ca) hasta un máximo de 5 días en cultivo (datos no mostrados).

En la figura 25 observamos que el contenido mineral de calcio es significativamente mayor en un ambiente urémico. Bajo condiciones control, las HASMC no muestran una elevación en el contenido mineral de sales cálcicas para ninguno de los días del ensayo. De igual modo la adición del inhibidor del canal Kv1.3 al suero control sigue un patrón similar, no encontrando diferencias significativas entre ambas condiciones. Sin embargo, la adición del inhibidor del canal Kv1.3 al suero urémico hace que la situación pro-calcificante generada por la uremia se vea disminuida de forma significativa, hasta el punto de que en el día 5 de tratamiento no encontramos diferencias significativas, en la deposición de calcio en la matriz, con las células incubadas en suero control con o sin el bloqueante PAP-1.

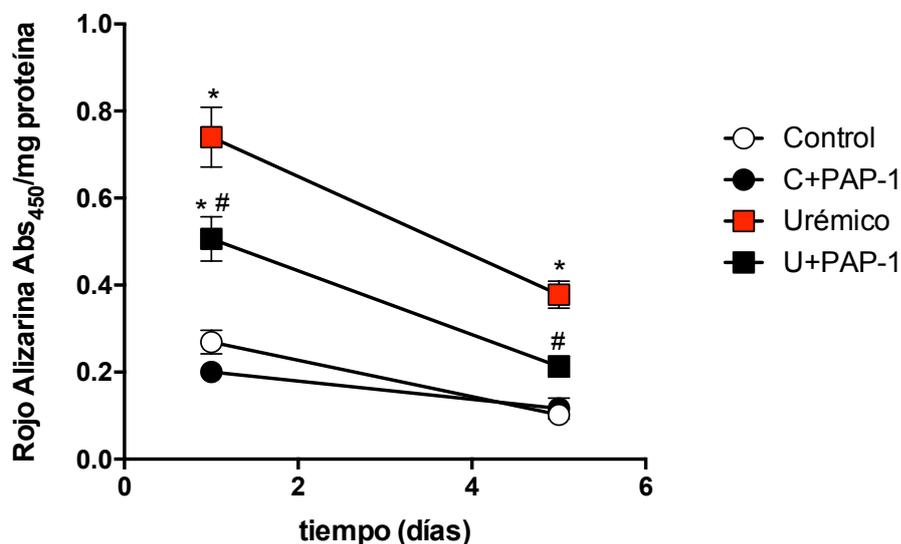


Figura 25. Efectos del inhibidor Kv1.3 en la deposición de calcio en HASMC en condiciones urémicas y control. Tras llegar a confluencia, las HASMC se incubaron con medio de cultivo suplementado con un 20 % de suero control o un 20 % de suero urémico, ambos con o sin bloqueante, durante 5 días. El medio se cambió cada 3 días. El contenido de calcio se midió en los tiempos indicados con la tinción rojo alizarina, normalizada por el contenido de proteína celular total, y se presentan como

media \pm SEM. ANOVA de dos vías con un posthoc de Tukey. *, diferencias significativas frente al control; #, diferencias significativas frente al suero urémico.

DISCUSIÓN

VI.- DISCUSIÓN

El incremento de morbi-mortalidad cardiovascular se evidencia a lo largo de todo el espectro evolutivo de la ERC, ya desde estadios precoces y siendo más pronunciado en las fases de insuficiencia renal terminal y diálisis (Amann et al. 2003). La eliminación deficiente de sustancias de desecho y su posterior acumulación conducen al estado conocido como uremia (Meyer and Hostetter 2007). La uremia trae consigo diversas y múltiples complicaciones como la hipertensión, el hiperparatiroidismo, la anemia, la acidosis metabólica, la hiperfosfatemia, una posible hipocalcemia y baja albúmina en la sangre (Inker et al. 2014; Abboud and Henrich 2010; Coresh et al. 2007). De especial interés para este trabajo son las alteraciones óseo-minerales asociadas a la ERC (CKD-MBD; Chronic Kidney Disease-Mineral Bone Disorder) (Work 2009) las cuales engloban, entre otras manifestaciones, las anormalidades del hormona paratiroidea, vitamina D, fósforo y calcio (Moe et al. 2006). En esta tesis hemos podido disponer de material biológico obtenido de pacientes urémicos, donde hemos constatado que los niveles de dichos parámetros se encuentran alterados. Como se ha descrito en la introducción, esta alteración se ha relacionado con el desarrollo de calcificación vascular y el engrosamiento de las paredes de los vasos, generando hipertrofia del ventrículo izquierdo y por tanto aumento del riesgo cardiovascular (Covic et al. 2010; Fang et al. 2014; W. C. O'Neill and Lomashvili 2010).

Dada su gran flexibilidad fenotípica, debida a cambios en la expresión proteica en función de las condiciones externas, la célula muscular lisa constituye un factor fundamental en el fenómeno de mineralización de la pared vascular. De hecho se ha demostrado que, en respuesta a estímulos lesivos, estas células pueden pasar de un fenotipo contráctil a uno sintético en el que migran y proliferan más (Iyemere et al. 2006).

A lo largo de los últimos años, con objeto de estudiar los mecanismos subyacentes a la mineralización de la pared vascular, se han desarrollado modelos de calcificación en cultivos de VSCM. El modelo de calcificación *in vitro* más usado hasta el momento se basa en la incubación de las VSMC en presencia de altas dosis de Pi, superiores a las que existen de forma fisiológica en la sangre, simulando así el fenómeno de hiperfosfatemia que tiene lugar en la últimas fases de la ERC (Jono et al. 2000). El uso

de dichos modelos ha permitido, entre otros, descubrir la formación de vesículas de membrana en explantes de aorta (Kim 1976), así como la presencia de proteínas como BMP, MGP u OPN en placas ateroscleróticas calcificadas (Boström et al. 1993; Shanahan et al. 1994).

Sin embargo, los mecanismos por los cuales la uremia promueve la calcificación de las VSMC plantea aún muchos interrogantes que no pueden ser estudiados exclusivamente mediante modelos de hiperfosfatemia. Es cierto que la hiperfosfatemia podría estimular la calcificación a través del flujo de Pi al interior celular mediante los transportadores Pit presentes en la membrana plasmática, induciendo la formación de cuerpos apoptóticos y vesículas de matriz (Jono et al. 2000). De acuerdo con esta hipótesis, y como ya se expuso en la introducción, Pit-1 podría mediar un aumento de la afluencia de Pi en VSMCs, facilitando la formación de depósitos de fosfato cálcico en las vesículas de matriz de nueva generación. Alternativamente, Pit-1 podría actuar como un sensor de flujo de Pi para iniciar las señales necesarias que inducirán la expresión de osteogenes específicos. Ambas hipótesis se basan en un aumento de la afluencia de Pi mediada a través de Pit-1, pero esta idea se enfrenta a una limitación cinética, es decir, la baja capacidad que tienen las VSMCs de transportar Pi, al estar el sistema de transporte saturado en condiciones fisiológicas. Por consiguiente, la afluencia de Pi en las células no aumentará simplemente por incrementar la concentración extracelular de Pi, como en la hiperfosfatemia (Villa-Bellosta et al. 2007).

Es por ello por lo que en esta Tesis nos propusimos desarrollar, evaluar y caracterizar un nuevo modelo *in vitro* que reproduzca de manera global y fisiológica la transformación fenotípica de células musculares lisas humanas en respuesta a la uremia (HAMSC). En concreto, utilizamos cultivos primarios de VSMCs disgregadas provenientes de aorta humana, que fueron expuestas a suero urémico humano obtenido de pacientes con ERC en estadio 5D (diálisis).

Nuestro estudio con células humanas supone un avance muy importante con respecto a los modelos utilizados en la mayor parte de estudios sobre la calcificación, los cuales se han desarrollado en células musculares bovinas (Shioi et al. 1995; Chen, Duan, O'Neill, and Moe 2006; Kircelli et al. 2012) o de rata (Villa-Bellosta et al. 2007; Yamada et al. 2015; Shin and Kwun 2013; Patidar et al. 2013). Además, el modelo desarrollado en esta Tesis se asemeja más a la situación clínica al utilizar sueros

urémicos en lugar de tratamientos con concentraciones elevadas de Pi en el medio de cultivo. No obstante, un aspecto a tener en cuenta en nuestro modelo *in vitro* es la dilución del suero utilizado, en contraste con el hecho de que las VSMC de un paciente urémico están expuestas a un 100% de plasma urémico. Este hecho, sin embargo, supone tan sólo una desventaja relativa, ya que los procesos desencadenados en el cultivo podrían ser representativos de un estadio más temprano en el desarrollo de la uremia.

Por otro lado, hay que valorar las ventajas e inconvenientes del uso de un modelo *in vitro* frente a otros modelos *in vivo* (por ejemplo, la nefrectomía 5/6 que genera uremia en ratas). Indudablemente, las ventajas de un modelo *in vitro* residen en el control de las condiciones de experimentación, tiempos de incubación, posibilidad de manipulación farmacológica, etc. En resumen, todas estas características garantizan una mayor reproducibilidad de los resultados. Además, el modelo *in vitro* permite la realización de aproximaciones experimentales cuyo abordaje sería prácticamente inviable en los modelos *in vivo*. En contraste con las ventajas hasta ahora expuestas, debemos ser conscientes de los inconvenientes que este modelo presenta. El cultivo aislado de HASMC no reproduce el microambiente de los vasos, donde las células están influenciadas por los factores endoteliales, la interacción con la matriz extracelular y por variables hemodinámicas. Por otro lado, los datos obtenidos en los experimentos de calcificación muestran una reversión parcial del proceso al cabo de varios días de incubación. Por tanto, nuestro modelo podría no ser de utilidad para el estudio de aspectos crónicos del remodelado vascular asociado a uremia.

Basándonos en el modelo *in vitro* de calcificación más usado hasta el momento (Jono et al. 2000) expusimos las HASMC a condiciones calcificantes, usando altas dosis de fosfato y de Ca^{2+} (Reynolds et al. 2004), lo que provocó la aparición de depósitos de calcio en forma de grandes nódulos de mineralización. Una vez comprobado esto, nos preguntamos si la presencia de suero proveniente de pacientes con ERC en estadio 5D (diálisis) es suficiente para producir calcificación en las HASMC. En efecto, comprobamos que en presencia de un 20% suero urémico y condiciones normofosfatémicas, las HASMC desarrollan calcificación. Estos datos concuerdan con las observaciones de Moe *et al.* (Moe et al. 2003), quienes ya habían indicado que otros factores séricos distintos del fosfato son suficientes para inducir calcificación *in vitro*.

Los estudios de Chen *et al.* (Chen, Duan, O'Neill, Wolisi, et al. 2006) ya demostraron que el suero urémico, combinado con β -glicerofosfato, puede acelerar la calcificación en VSMC de origen bovino pero, hasta el momento, no existían estudios corroborando estos datos en VSMC humanas. Recientemente Liu *et al.* (Liu et al. 2016) han publicado un trabajo dónde demuestran que el suero urémico acelera la mineralización y e incrementa la expresión de proteínas relacionadas con el hueso en HAMSC. A diferencia del trabajo presentado en esta Tesis, Liu *et al.* utilizan material biológico de pacientes en estadios previos a la diálisis, empleando un 10% de mezcla de sueros en las condiciones experimentales. Al igual que estos autores, nuestros datos muestran un aumento de calcificación dependiente del tiempo. Sin embargo este aumento, evidente después de 24 horas y que alcanza un pico al tercer día, disminuye en nuestro caso a partir del quinto día de incubación. Esto contrasta con la mayoría de estudios de calcificación, donde se observa que la deposición mineral aumenta progresivamente con el tiempo (Chen et al. 2002; Chen, Duan, O'Neill, and Moe 2006; Proudfoot et al. 2000; Alves et al. 2014). El desacuerdo con estudios previos puede ser atribuido a los diferentes tipos celulares usados, a las características del material biológico o a la concentración de suero empleada. En relación a este último punto, cabe cuestionarse si las condiciones de cultivo afectan drásticamente a la viabilidad de las células, al ser sometidas a una concentración excesiva de Pi y calcio.

Nuestro trabajo proporciona además una comparación directa entre el modelo de hiperfosfatemia y el uso de suero urémico. Los resultados obtenidos demuestran que, si bien ambos estímulos conducen a procesos de calcificación con cinéticas similares, los mecanismos moleculares subyacentes parecen ser diferentes. En primer lugar, llama la atención el desarrollo temporal de la expresión de Pit1, que como ya se detalló anteriormente, ha sido descrito como un factor desencadenante del proceso de calcificación. Nuestros resultados muestran que en las fases tempranas de calcificación inducida por suero urémico los niveles de Pit1 no están elevados. Es precisamente en las fases en las que los niveles de calcificación comienzan a revertir cuando observamos un aumento en la expresión de Pit1. Esta observación indica que Pit1, cuya implicación en este proceso siempre ha sido deducida mediante el uso de modelos experimentales de hiperfosfatemia, podría no ser tan relevante en el proceso de calcificación. Es más, podría no ser un factor causante sino una consecuencia del proceso de calcificación.

Para poder elaborar conclusiones más sólidas sobre esta hipótesis, sería importante continuar este trabajo con la evaluación de los niveles funcionales de Pit1 utilizando el modelo de HAMSC. Por otro lado, estudios realizados en arterias calcificadas de pacientes urémicos y en modelos *in vitro* de calcificación inducida por alto fósforo muestran una profunda transición fenotípica de las VSMC que conduce a la disminución o pérdida total de expresión de los marcadores celulares específicos (Shanahan et al. 2011). De manera simultánea, se observa en estas células un aumento en la expresión de los marcadores osteocondrogénicos (Boström 2000; Giachelli et al. 2005). Diversos autores han demostrado que al añadir fósforo al medio de cultivo de VSMC, en concentraciones similares a las encontradas en individuos hiperfosfatémicos, se produce una disminución en la expresión de SM α -actina (Steitz et al. 2001; Wang et al. 2008), y SM22 α (TAGLN) (Li, Yang, and Giachelli 2008; Steitz et al. 2001; T. Tanaka et al. 2008) y un aumento en la expresión de factores osteocondrogénicos, como RUNX2 (Moe et al. 2003; Steitz et al. 2001; T. Tanaka et al. 2008), MSX2 (Shimizu et al. 2012) y osteopontina (Lomashvili et al. 2004; Steitz et al. 2001). Aunque esta plasticidad fenotípica se considera una ventaja evolutiva para adaptarse al ambiente, el cambio de fenotipo y la adquisición de nuevas características por parte de la VSMC contribuyen marcadamente al desarrollo y/o la progresión de diversas enfermedades cardiovasculares. Nuestros resultados evidenciaron un aumento en la expresión de marcadores osteogénicos en las células incubadas con suero urémico, como RUNX2, SOX9 y MSX2, lo cual verifica la transición fenotípica inducida por suero urémico en las HAMSC. Sin embargo, los patrones de expresión de dichos factores también difieren entre los modelos urémico y de hiperfosfatemia. En concreto, destaca la diferencia en el caso de RUNX2, un factor de transcripción implicado tanto en la diferenciación osteogénica como en la mineralización (T. Tanaka et al. 2008; Sun et al. 2012; Speer et al. 2010; Che et al. 2013). Nuestros resultados muestran que sólo en el caso de células tratadas con suero urémico se evidencia un aumento significativo de los niveles de expresión de RUNX2, el cual no se observa cuando las células son tratadas en altas concentraciones de Pi. Este resultado sería compatible con un proceso de diferenciación osteogénica en las células HAMSC tratadas con suero urémico. Otro factor cuyos niveles fueron medidos en este estudio fue TAGLN, que es un marcador celular de músculo liso. Sorprendentemente, en este caso encontramos que los niveles de TAGLN disminuyen sólo cuando las HAMSC son expuestas a hiperfosfatemia, mientras que en presencia de

suero urémico los niveles de TAGLN no varían de manera significativa. ¿Cómo podemos conciliar estas observaciones? Es importante tener en cuenta que el tratamiento con altos niveles de Pi es extremo (de hecho utiliza concentraciones no fisiológicas); posiblemente, las condiciones en las que se encuentran las HAMSC expuestas a suero urémico corresponden a un estadio más temprano de transdiferenciación. Así, el patrón de expresión de factores celulares observado en presencia de alto Pi (RUNX2 igual o disminuido –propio de fenotipo óseo- y TAGLN disminuida –es decir, pérdida de carácter de músculo liso) parece indicar una desdiferenciación del músculo, pero no una desviación hacia un fenotipo óseo tradicional (es cierto que presenta niveles de MSX2 elevados, pero no de RUNX2, que es el regulador máster). Apoyando aún más nuestra conclusión de que la hiperfosfatemia produce un proceso de calcificación por mecanismos diferentes al suero urémico, los niveles de fosfatasa alcalina también presentan importantes diferencias entre ambas condiciones. En presencia de alto Pi, contrariamente a lo que se podría esperar en un proceso diferenciación hacia un fenotipo óseo, los niveles de expresión de fosfatasa alcalina están disminuidos. En conjunto, nuestros resultados demuestran la relevancia del modelo desarrollado, y de manera general apuntan la importancia de estudiar los mecanismos de calcificación utilizando suero urémico, que permite estudiar los mismos en un contexto más cercano al fisiológico que la hiperfosfatemia. Es éste por tanto el modelo que hemos usado en este trabajo para avanzar en el conocimiento de los mecanismos subyacentes al cambio fenotípico de las HAMSC en uremia.

Nuestro modelo también nos permitió cuantificar viabilidad celular, proliferación y muerte celular por apoptosis en células HAMSC en condiciones de uremia. Nuestros resultados muestran una menor viabilidad metabólica en HAMSC tratadas con suero, que se corresponde con una disminución del número de células en cultivo. Este efecto podría deberse a una disminución en la proliferación celular, a un aumento en la tasa de apoptosis o a una combinación de ambos mecanismos. Tras un detallado análisis de la cinética del efecto del suero urémico sobre el número de células viables en cultivo se observa que éste produce una disminución detectable desde las primeras 24 h de tratamiento. Sin embargo, la disminución de proliferación celular, detectada por incorporación de un análogo de nucleótidos, no es significativa hasta 48 h después del inicio del tratamiento. Por otra parte, el análisis de apoptosis en los cultivos

muestra un aumento en este proceso desde las primeras 24 h. Estos resultados sugieren que la disminución del número de células en cultivo es producto de un efecto combinado sobre apoptosis y proliferación celular, cuya importancia relativa varía a lo largo del tratamiento. Se ha descrito previamente que la calcificación va siempre acompañada de un aumento de apoptosis (Proudfoot et al. 2000; Shroff et al. 2010; Shroff et al. 2008). ¿Es la apoptosis causa o consecuencia de la calcificación? Nuestros resultados no permiten distinguir si ambos procesos son simultáneos o bien si uno potencia al otro. En cualquier caso, el nivel de apoptosis inducido por suero urémico en HAMSC es moderado, por lo que podría no tener gran relevancia patológica, según se ha sugerido en anteriores publicaciones (Kramann et al. 2011). Un aspecto a considerar es que las células que sobreviven y no sufren apoptosis claramente tienen una viabilidad y capacidad proliferativa disminuidas. Esto podría deberse a daños metabólicos o genéticos inducidos por el suero, o bien a que la transdiferenciación a fenotipo óseo conlleva una menor tasa de proliferación. Estos resultados contrastan con estudios previos, en modelos *in vitro* de arterias de pacientes urémicos, donde se describió que la arterioesclerosis provoca el engrosamiento fibroelástico de la íntima y de la capa media, el aumento del número de células musculares lisas y del volumen de la matriz extracelular (London et al. 1993; Fishbane, Natke, and Maesaka 1996; N. C. Edwards et al. 2006). Es necesario profundizar en la caracterización de este efecto, que podría constituir una limitación de nuestro modelo de cultivo de células aisladas.

Simultáneamente a la disminución en proliferación detectada en nuestros experimentos, observamos una disminución en la capacidad de migración celular. Se ha sugerido que la hiperplasia de la íntima incluye VSMC que han migrado hasta la misma. En los distintos modelos *in vitro*, el efecto de la calcificación sobre la capacidad de migración de VSMC presenta cierta controversia, detectándose aumentos o disminuciones dependiendo del modelo utilizado.

Entre los diversos factores que participan en los procesos de apoptosis, proliferación y transdiferenciación celular en las VSMC, un número creciente de evidencias demuestran que los canales iónicos, debido a su función clave en el control del potencial de membrana, pueden jugar un papel relevante. El potencial de membrana, modulado fundamentalmente por canales de K⁺, regula el flujo de entrada

de Ca^{2+} a la célula, que a su vez favorece la proliferación celular. Otros procesos esenciales en la fisiología de la célula, como el volumen celular y el pH intracelular también son regulados por canales iónicos. No existen trabajos previos evaluando el patrón de expresión de canales iónicos en HAMSC, ni cómo éste es alterado al exponerlas a suero urémico. En esta Tesis hemos realizado una evaluación de estos patrones, que muestran una clara alteración en canales relevantes para la fisiología de las HAMSC. El estudio de expresión en condiciones basales muestra un amplio repertorio de canales iónicos pertenecientes a todas las familias examinadas. Destacan por su alto número y nivel de expresión los canales de la familia TRP (ver introducción), así como todos los canales descritos previamente en VSMC e implicados en el control del tono vascular (Kir, Kv, Cl, Cav y K2P).

La exposición a suero urémico produce una amplia remodelación en la batería de canales iónicos disponibles en las HAMSC. En concreto, de los 62 genes correspondientes a subunidades de canales iónicos detectados, un total de 17 presentan cambios estadísticamente significativos. Entre ellos, y por su importancia para la fisiopatología de las VSMC, en esta Tesis nos hemos centrado en la caracterización de tres de ellos: la subunidad alfa del canal epitelial de sodio (αENaC), el canal Kv1.3 y el canal BK.

Como ya ha sido mencionado en la introducción, el canal BK es fundamental en el acoplamiento de la señal intracelular de calcio y el voltaje de membrana celular, proporcionando un mecanismo de retroalimentación negativa sobre la contractilidad. Esto se debe a la regulación intrínseca del canal por ambos estímulos, calcio y voltaje; cualquier alteración que afecte a dicho mecanismo tendrá consecuencias sobre el mecanismo de retroalimentación. Nuestros resultados muestran que la subunidad $\text{BK}\alpha$ muestra un aumento moderado pero significativo en sus niveles de expresión, el cual es acompañado por un gran aumento de las subunidades reguladoras, particularmente $\beta 1$ pero también $\beta 2$. Esto sugiere la posibilidad de se forme un mayor número de complejos $\text{BK}\alpha\text{-}\beta 1$ y $\text{BK}\alpha\text{-}\beta 2$ en la membrana celular. Ambas subunidades producen un aumento de la actividad de $\text{BK}\alpha$ en condiciones fisiológicas, lo cual claramente afectaría al control de la contractibilidad. Sin embargo, los estudios electrofisiológicos realizados no concuerdan con esta predicción. Así, detectamos una tendencia no significativa hacia

la disminución de la corriente BK en HASMC tratadas con suero urémico. Esto podría deberse a que las variaciones en los niveles de mRNAs no se traducen en una variación en los correspondientes niveles proteicos, a defectos en el procesamiento o modificación postraducciona de los canales (Shipston and Tian 2016) o bien a efectos indirectos del suero urémico que alteran la regulación de estos canales.

El aumento de los niveles de expresión de las subunidades del canal BK se acompaña de una clara disminución en la expresión de los canales SK, particularmente SK2 y SK4. El impacto funcional de este hecho es difícil de valorar ya que la expresión de canales SK está principalmente asociada al endotelio vascular (Marchenko and Sage 1996) con escasas referencias a su función en VSMC (Alejandro Moreno Domínguez, 2009, Tesis Doctoral, Universidad de Valladolid).

El segundo grupo de canales examinados funcionalmente fueron los canales de potasio Kv. La densidad de corriente Kv total muestra una tendencia no significativa a la disminución, si bien la proporción correspondiente a canales Kv1.3 se vio aumentada por el tratamiento con suero urémico. Este hecho concuerda con nuestros datos de expresión génica, que muestran un claro aumento de los niveles de mRNA de Kv1.3 tras el tratamiento. Esta observación es de particular importancia ya que se ha demostrado que Kv1.3 está implicado en la proliferación y migración de VSMC (Cidad et al. 2010; Jackson 2010; Ciudad et al. 2012). Con objeto de comprobar si el aumento de estas corrientes detectado en nuestro modelo tiene relevancia en dichos procesos, utilizamos herramientas farmacológicas para bloquear este canal tanto en condiciones control como en uremia. En ambos casos, el inhibidor de Kv1.3, PAP1, produjo una disminución significativa en la proliferación de HASMC. Es importante resaltar que el porcentaje de inhibición de la proliferación fue mayor en células tratadas con suero urémico, sugiriendo que en estas condiciones el canal Kv1.3 cobra mayor importancia como inductor de proliferación. En lo que respecta a la migración celular, la inhibición de Kv1.3 resultó en una disminución de este proceso, tanto en condiciones control como urémicas. Hasta ahora no se había estudiado la posible implicación de estos canales en el proceso de calcificación inducido por uremia. Por ello, en esta Tesis hemos examinado el impacto que la inhibición de Kv1.3 tiene sobre el desarrollo de depósitos minerales en HASMC. Nuestros resultados demuestran un efecto beneficioso de la

inhibición de Kv1.3, resultando en una disminución de la calcificación inducida por uremia. Es necesario profundizar en el estudio de los mecanismos subyacentes a este efecto, dada la posible relevancia terapéutica de este resultado.

Una posible implicación de la modulación de corrientes de potasio, sean o no dependientes de calcio, es la alteración de la homeostasis de este ión en las HASMC. Nuestras observaciones demuestran una reducción de corrientes de potasio en condiciones urémicas, lo cual conllevaría una despolarización de la membrana y por tanto un aumento en los niveles basales de Ca²⁺ intracelular. Los resultados obtenidos en esta Tesis, relativos al estudio del manejo intracelular de Ca²⁺ en HASMC expuestas a uremia sugieren un efecto más complejo. Además de una posible alteración de los niveles basales de Ca²⁺, hemos detectado ausencia de respuesta fisiológica a un agonista de la contracción como la Ang II. Esto podría deberse a distintos mecanismos que incluyen la pérdida del receptor o alteraciones en el acoplamiento a las cascadas de señalización intracelulares correspondientes. Es más, nuestros resultados en el experimento con el inhibidor de SERCA CPA sugiere la existencia de un defecto en la capacidad de acumulación de Ca²⁺ en reservorios intracelulares o alternativamente en el mecanismo de entrada de calcio al citosol. En cualquier caso, la conclusión principal es que el tratamiento con suero urémico conduce a una pérdida de las características fundamentales de homeostasis del calcio propias de las VSMC.

Por último, decidimos explorar el posible papel funcional de la sobreexpresión de la subunidad α ENaC inducida por uremia. Estudios previos en la literatura han propuesto un importante papel de este canal en el cierre de heridas epiteliales, tanto cutáneas como vasculares (Chifflet, Hernández, and Grasso 2005). El mecanismo implicado parece ser la acumulación de canales ENaC en el frente de avance de las células encargadas del cierre de la herida. Por este motivo, decidimos utilizar nuestro modelo de migración para examinar el efecto de la inhibición farmacológica de ENaC sobre este proceso. En células cultivadas con suero control, la inhibición de ENaC produjo una disminución en la migración celular similar a la obtenida con la inhibición de Kv1.3 y consistente con resultados previos a nuestro estudio. Sin embargo, la inhibición de ENaC con amilorida en células tratadas previamente con suero urémico produjo el efecto contrario, recuperando en parte la capacidad migratoria perdida con la uremia. Es tentador especular que este efecto se debe al beneficio de bloquear un

canal de sodio constitutivamente activo, como ENaC, que en caso de sobreexpresión puede inducir la carga inapropiada de sodio intracelular.

En conjunto, nuestro trabajo recoge el desarrollo y puesta a punto de un nuevo modelo de modulación fenotípica de VSMC humanas en respuesta a la uremia, proporcionando interesantes resultados sobre los mecanismos subyacentes a dicha modulación. Nuestro modelo abre las puertas a una comprensión más detallada y contextualizada de estos mecanismos, que podría conducir a la identificación de posibles nuevas dianas terapéuticas de relevancia en ERC.

CONCLUSIONES

VII.- CONCLUSIONES

1. La exposición de las HASMCs al suero urémico induce la calcificación vascular provocando la aparición de depósitos cálcicos, bajo condiciones normofosfatémicas.
2. La hiperfosfatemia parece favorecer el desarrollo de la calcificación en HASMC pero, no es imprescindible para desencadenarla.
3. La transdiferenciación osteogénica *in vitro* de las HASMC sometidas a condiciones urémicas está caracterizada por el incremento de genes osteogénicos, principalmente de regulador máster RUNX2. Sin embargo, no sucede así en condiciones hiperfosfatémicas.
4. En presencia de suero urémico las HASMC ven comprometida su viabilidad y su tasa proliferativa.
5. El suero urémico produce una remodelación en el perfil de expresión de canales iónicos en las HASMC que puede estar asociada a la transdiferenciación fenotípica, consecuencia de la calcificación vascular.
6. El estudio funcional revela una disminución de la amplitud de las corrientes BK_{Ca} en condiciones urémicas que no correlaciona con el incremento observado en los niveles de expresión de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$, pudiendo ser consecuencia de modificaciones postraduccionales.
7. El bloqueo selectivo del canal Kv1.3 desvela su implicación en la proliferación y migración de las HASMC.
8. La alta contribución de las corrientes Kv1.3 y el incremento de expresión génica en uremia desvelan una posible diana terapéutica para el control de la modulación fenotípica que se desarrolla durante la calcificación vascular.
9. El canal epitelial de sodio ENaC está implicado en la migración de las HASMC y su bloqueo favorece la repoblación de la herida en condiciones urémicas.

BIBLIOGRAFÍA

VIII.- BIBLIOGRAFÍA

- Aaronson, Philip I, Jeremy P T Ward, and Michelle J Connolly. 2012. *The Cardiovascular System at a Glance*. John Wiley & Sons.
- Abboud, Hanna, and William L Henrich. 2010. "Stage IV Chronic Kidney Disease." *The New England Journal of Medicine* 362 (1): 56–65. doi:10.1056/NEJMcp0906797.
- Akbarali, Hamid I. 2005. "Signal-Transduction Pathways That Regulate Smooth Muscle Function. II. Receptor-Ion Channel Coupling Mechanisms in Gastrointestinal Smooth Muscle.." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 288 (4): G598–602. doi:10.1152/ajpgi.00402.2004.
- Alves, Rodrigo DAM, Marco Eijken, Jeroen van de Peppel, and Johannes PTM van Leeuwen. 2014. "Calpain-1 Regulation of Matrix Metalloproteinase 2 Activity in Vascular Smooth Muscle Cells Facilitates Age-Associated Aortic Wall Calcification and Fibrosis." *Hypertension* 15 (1): 1192–99. doi:10.1186/1471-2164-15-965.
- Amann, K, K Tyralla, M L Gross, T Eifert, M Adamczak, and E Ritz. 2003. "Special Characteristics of Atherosclerosis in Chronic Renal Failure.." *Clinical Nephrology* 60 Suppl 1 (July): S13–S21.
- Amberg, Gregory C, Adrian D Bonev, Charles F Rossow, Mark T Nelson, and Luis F Santana. 2003. "Modulation of the Molecular Composition of Large Conductance, Ca(2+) Activated K(+) Channels in Vascular Smooth Muscle During Hypertension.." *The Journal of Clinical Investigation* 112 (5): 717–24. doi:10.1172/JCI118684.
- Avenidaño, L Hernando, Hernando. 2008. *Nefrología Clínica*. Ed. Médica Panamericana.
- Badimon, L, J J Badimon, M Cohen, J H Chesebro, and V Fuster. 1991. "Vessel Wall-Related Risk Factors in Acute Vascular Events.." *Drugs* 42 Suppl 5: 1–9.
- Barenbrock, M, C Spieker, V Laske, S Heidenreich, H Hohage, J Bachmann, A P Hoeks, and K H Rahn. 1994. "Studies of the Vessel Wall Properties in Hemodialysis Patients.." *Kidney International* 45 (5): 1397–1400.
- Baumelou, Alain, Eric Bruckert, Corinne Bagnis, and Gilbert Deray. 2005. "Renal Disease in Cardiovascular Disorders: an Underrecognized Problem.." *American Journal of Nephrology* 25 (2): 95–105. doi:10.1159/000084660.
- Becchetti, Andrea. 2011. "Ion Channels and Transporters in Cancer. 1. Ion Channels and Cell Proliferation in Cancer.." *AJP: Cell Physiology* 301 (2): C255–65. doi:10.1152/ajpcell.00047.2011.

- Beeton, Christine, Heike Wulff, Nathan E Standifer, Philippe Azam, Katherine M Mullen, Michael W Pennington, Aaron Kolski-Andreaco, et al. 2006. "Kv1.3 Channels Are a Therapeutic Target for T Cell-Mediated Autoimmune Diseases.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (46): 17414–19. doi:10.1073/pnas.0605136103.
- Berridge, M J. 1997. *Elementary and Global Aspects of Calcium Signalling. The Journal of Physiology*. Vol. 499.
- Bezánilla, F. 2005. "Voltage-Gated Ion Channels." *IEEE Transactions on Nanobioscience* 4 (1): 34–48. doi:10.1109/TNB.2004.842463.
- Blacher, J, A P Guerin, B Pannier, S J Marchais, and G M London. 2001. "Arterial Calcifications, Arterial Stiffness, and Cardiovascular Risk in End-Stage Renal Disease.." *Hypertension* 38 (4): 938–42.
- Blatz, A L, and K L Magleby. 1987. "Calcium-Activated Potassium Channels." *Trends in Neurosciences* 10 (11): 463–67. doi:10.1016/0166-2236(87)90101-9.
- Blaustein, Mordecai P, Joseph P Y Kao, and Donald R Matteson. 2011. *Cellular Physiology and Neurophysiology*. Elsevier Health Sciences.
- Block, G A, and F K Port. 2000. "Re-Evaluation of Risks Associated with Hyperphosphatemia and Hyperparathyroidism in Dialysis Patients: Recommendations for a Change in Management.." *American Journal of Kidney Diseases : the Official Journal of the National Kidney Foundation* 35 (6): 1226–37.
- Block, G A, T E Hulbert-Shearon, N W Levin, and F K Port. 1998. "Association of Serum Phosphorus and Calcium X Phosphate Product with Mortality Risk in Chronic Hemodialysis Patients: a National Study.." *American Journal of Kidney Diseases : the Official Journal of the National Kidney Foundation* 31 (4): 607–17.
- Boström, K I. 2000. "Cell Differentiation in Vascular Calcification." *Zeitschrift für Kardiologie* 89 (14): S069–S074. doi:10.1007/s003920070102.
- Boström, K, K E Watson, S Horn, C Wortham, I M Herman, and L L Demer. 1993. "Bone Morphogenetic Protein Expression in Human Atherosclerotic Lesions.." *The Journal of Clinical Investigation* 91 (4): 1800–1809. doi:10.1172/JCI116391.
- Bratz, Ian N, Ricardo Falcon, L Donald Partridge, and Nancy L Kanagy. 2002. "Vascular Smooth Muscle Cell Membrane Depolarization After NOS Inhibition Hypertension." *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 282 (5). American Physiological Society: H1648–55. doi:10.1152/ajpheart.00824.2001.

- Cahalan, M D, and K G Chandy. 2009. "The Functional Network of Ion Channels in T Lymphocytes.." *Immunological Reviews* 231 (1): 59–87. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00816.x.
- Camacho, Javier. 2006. "Ether À Go-Go Potassium Channels and Cancer.." *Cancer Letters* 233 (1): 1–9. doi:10.1016/j.canlet.2005.02.016.
- Carl, A, H K Lee, and K M Sanders. 1996. "Regulation of Ion Channels in Smooth Muscles by Calcium.." *The American Journal of Physiology* 271 (1 Pt 1): C9–C34.
- Cecelja, Marina, and Philip Chowienzyk. 2009. "Dissociation of Aortic Pulse Wave Velocity with Risk Factors for Cardiovascular Disease Other Than Hypertension: a Systematic Review.." *Hypertension* 54 (6): 1328–36. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.137653.
- Che, Yu, Chen Bing, Javed Akhtar, Zhao Tingting, Yu Kezhou, and Wang Rong. 2013. "Lanthanum Carbonate Prevents Accelerated Medial Calcification in Uremic Rats: Role of Osteoclast-Like Activity.." *Journal of Translational Medicine* 11: 308. doi:10.1186/1479-5876-11-308.
- Chen, N X, D Duan, K D O'Neill, G O Wolisi, J J Koczman, R LaClair, and S M Moe. 2006. "The Mechanisms of Uremic Serum-Induced Expression of Bone Matrix Proteins in Bovine Vascular Smooth Muscle Cells." *Kidney International* 70 (6): 1046–53. doi:10.1038/sj.ki.5001663.
- Chen, Neal X, Danxia Duan, Kalisha D O'Neill, and Sharon M Moe. 2006. "High Glucose Increases the Expression of Cbfa1 and BMP-2 and Enhances the Calcification of Vascular Smooth Muscle Cells.." *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 21 (12): 3435–42. doi:10.1093/ndt/gfl429.
- Chen, Neal X, Kalisha D O'Neill, Danxia Duan, and Sharon M Moe. 2002. "Phosphorus and Uremic Serum Up-Regulate Osteopontin Expression in Vascular Smooth Muscle Cells.." *Kidney International* 62 (5): 1724–31. doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00625.x.
- Chifflet, Silvia, Julio A Hernández, and Silvina Grasso. 2005. "A Possible Role for Membrane Depolarization in Epithelial Wound Healing.." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 288 (6): C1420–30. doi:10.1152/ajpcell.00259.2004.
- Chobanian, Aram V. 2003. "The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood PressureThe JNC 7 Report." *Jama* 289 (19). Jama: 2560. doi:10.1001/jama.289.19.2560.
- Cidad, Pilar, Alejandro Moreno-Domínguez, Laura Novensá, Mercé Roqué, Leire Barquín, Magda Heras, M Teresa Pérez-García, and José R López-López. 2010. "Characterization of Ion

- Channels Involved in the Proliferative Response of Femoral Artery Smooth Muscle Cells.." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30 (6): 1203–11. doi:10.1161/ATVBAHA.110.205187.
- Cidad, Pilar, Laura Jiménez-Pérez, Daniel García-Arribas, Eduardo Miguel-Velado, Sendoa Tajada, Christian Ruiz-McDavitt, José R López-López, and M Teresa Pérez-García. 2012. "Kv1.3 Channels Can Modulate Cell Proliferation During Phenotypic Switch by an Ion-Flux Independent Mechanism.." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32 (5): 1299–1307. doi:10.1161/ATVBAHA.111.242727.
- Coresh, Josef, Elizabeth Selvin, Lesley A Stevens, Jane Manzi, John W Kusek, Paul Eggers, Frederick Van Lente, and Andrew S Levey. 2007. "Prevalence of Chronic Kidney Disease in the United States." *Jama* 298 (17). American Medical Association: 2038–47. doi:10.1001/jama.298.17.2038.
- Covic, Adrian, Mehmet Kanbay, Luminita Voroneanu, Faruk Turgut, Dragomir N Serban, Ionela Lacramioara Serban, and David J Goldsmith. 2010. "Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease.." *Clinical Science (London, England : 1979)* 119 (3): 111–21. doi:10.1042/CS20090631.
- Cozzolino, Mario, Diego Brancaccio, Maurizio Gallieni, and Eduardo Slatopolsky. 2005. "Pathogenesis of Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease.." *Kidney International* 68 (2): 429–36. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00421.x.
- Cozzolino, Mario, Maurizio Gallieni, and Diego Brancaccio. 2006. "Vascular Calcification in Uremic Conditions: New Insights Into Pathogenesis.." *Seminars in Nephrology* 26 (1): 33–37. doi:10.1016/j.semnephrol.2005.06.008.
- Crouthamel, Matthew H, Wei Ling Lau, Elizabeth M Leaf, Nicholas W Chavkin, Mary C Wallingford, Danielle F Peterson, Xianwu Li, et al. 2013. "Sodium-Dependent Phosphate Cotransporters and Phosphate-Induced Calcification of Vascular Smooth Muscle Cells: Redundant Roles for PiT-1 and PiT-2.." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 33 (11): 2625–32. doi:10.1161/ATVBAHA.113.302249.
- Czarnecki, A, S Vaur, L Dufy-Barbe, B Dufy, and L Bresson-Bepoldin. 2000. "Cell Cycle-Related Changes in Transient K(+) Current Density in the GH3 Pituitary Cell Line.." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 279 (6): C1819–28.
- Dao, Huy Hao, Rachida Essalihi, Céline Bouvet, and Pierre Moreau. 2005. "Evolution and Modulation of Age-Related Medial Elastocalcinosis: Impact on Large Artery Stiffness and Isolated Systolic Hypertension.." *Cardiovascular Research* 66 (2): 307–17.

doi:10.1016/j.cardiores.2005.01.012.

- Davies, John D, Keri L H Carpenter, Iain R Challis, Nikki L Figg, Rosamund McNair, Diane Proudfoot, Peter L Weissberg, and Catherine M Shanahan. 2005. "Adipocytic Differentiation and Liver X Receptor Pathways Regulate the Accumulation of Triacylglycerols in Human Vascular Smooth Muscle Cells.." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (5): 3911–19. doi:10.1074/jbc.M410075200.
- Davis, M J, and M A Hill. 1999. "Signaling Mechanisms Underlying the Vascular Myogenic Response.." *Physiological Reviews* 79 (2): 387–423.
- de Nefrologia, Sociedad Española. 2012. *Documento De Consenso Sobre La Enfermedad Renal Crónica*.
- Demer, Linda L. 2002. "Vascular Calcification and Osteoporosis: Inflammatory Responses to Oxidized Lipids.." *International Journal of Epidemiology* 31 (4): 737–41.
- Edwards, F R, and G D Hirst. 1988. "Inward Rectification in Submucosal Arterioles of Guinea-Pig Ileum.." *The Journal of Physiology* 404 (October): 437–54.
- Edwards, N C, R P Steeds, C J Ferro, and J N Townend. 2006. "The Treatment of Coronary Artery Disease in Patients with Chronic Kidney Disease.." *QJM : Monthly Journal of the Association of Physicians* 99 (11): 723–36. doi:10.1093/qjmed/hcl101.
- Fang, Yifu, Charles Ginsberg, Michael Seifert, Olga Agapova, Toshifumi Sugatani, Thomas C Register, Barry I Freedman, Marie-Claude Monier-Faugere, Hartmut Malluche, and Keith A Hruska. 2014. "CKD-Induced Wingless/Integration1 Inhibitors and Phosphorus Cause the CKD-Mineral and Bone Disorder.." *Journal of the American Society of Nephrology* 25 (8): 1760–73. doi:10.1681/ASN.2013080818.
- Fishbane, S, E Natke, and J K Maesaka. 1996. "Role of Volume Overload in Dialysis-Refractory Hypertension.." *Yajkd* 28 (2): 257–61.
- Fleischmann, B K, R J Washabau, and M I Kotlikoff. 1993. "Control of Resting Membrane Potential by Delayed Rectifier Potassium Currents in Ferret Airway Smooth Muscle Cells.." *The Journal of Physiology* 469 (September): 625–38.
- Foley, R N, P S Parfrey, and M J Sarnak. 1998. "Clinical Epidemiology of Cardiovascular Disease in Chronic Renal Disease.." *Yajkd* 32 (5 Suppl 3): S112–19.
- Gendelman, Howard E, Shengyuan Ding, Nan Gong, Jianuo Liu, Servio H Ramirez, Yuri Persidsky, R Lee Mosley, Tong Wang, David J Volsky, and Huanguai Xiong. 2009. "Monocyte Chemotactic Protein-1 Regulates Voltage-Gated K⁺ Channels and Macrophage Transmigration.." *Journal of Neuroimmune Pharmacology : the Official Journal of the Society on NeuroImmune*

Pharmacology 4 (1): 47–59. doi:10.1007/s11481-008-9135-1.

- Ghatta, Srinivas, Deepthi Nimmagadda, Xiaoping Xu, and Stephen T O'Rourke. 2006. "Large-Conductance, Calcium-Activated Potassium Channels: Structural and Functional Implications.." *Pharmacology & Therapeutics* 110 (1): 103–16. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.10.007.
- Giachelli, C M, S Jono, A Shioi, Y Nishizawa, K Mori, and H Morii. 2001. "Vascular Calcification and Inorganic Phosphate.." *American Journal of Kidney Diseases : the Official Journal of the National Kidney Foundation* 38 (4 Suppl 1): S34–S37.
- Giachelli, Cecilia M. 2004. "Vascular Calcification Mechanisms.." *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 15 (12): 2959–64. doi:10.1097/01.ASN.0000145894.57533.C4.
- Giachelli, Cecilia M, Mei Y Speer, Xianwu Li, Rupak M Rajachar, and Hsueh Yang. 2005. "Regulation of Vascular Calcification: Roles of Phosphate and Osteopontin.." *Circulation Research* 96 (7): 717–22. doi:10.1161/01.RES.0000161997.24797.c0.
- Go, Alan S, Glenn M Chertow, Dongjie Fan, Charles E McCulloch, and Chi-yuan Hsu. 2004. "Chronic Kidney Disease and the Risks of Death, Cardiovascular Events, and Hospitalization.." *The New England Journal of Medicine* 351 (13): 1296–1305. doi:10.1056/NEJMoa041031.
- Goodman, W G, J Goldin, B D Kuizon, C Yoon, B Gales, D Sider, Y Wang, et al. 2000. "Coronary-Artery Calcification in Young Adults with End-Stage Renal Disease Who Are Undergoing Dialysis.." *The New England Journal of Medicine* 342 (20): 1478–83. doi:10.1056/NEJM200005183422003.
- Gregory, Carl A, W Grady Gunn, Alexandra Peister, and Darwin J Prockop. 2004. "An Alizarin Red-Based Assay of Mineralization by Adherent Cells in Culture: Comparison with Cetylpyridinium Chloride Extraction." *Analytical Biochemistry* 329 (1): 77–84. doi:10.1016/j.ab.2004.02.002.
- Grifoni, Samira C, Kimberly P Gannon, David E Stec, and Heather A Drummond. 2006. "ENaC Proteins Contribute to VSMC Migration.." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 291 (6): H3076–86. doi:10.1152/ajpheart.00333.2006.
- Guerin, A P, G M London, S J Marchais, and F Metivier. 2000. "Arterial Stiffening and Vascular Calcifications in End-Stage Renal Disease.." *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 15 (7): 1014–21.
- Guérin, Alain P, Bruno Pannier, Sylvain J Marchais, and Gerard M London. 2008. "Arterial

- Structure and Function in End-Stage Renal Disease.." *Current Hypertension Reports* 10 (2): 107–11.
- Hamill, O P, A Marty, E Neher, B Sakmann, and F J Sigworth. 1981. "Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording From Cells and Cell-Free Membrane Patches.." *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 391 (2): 85–100.
- Hanner, M, W A Schmalhofer, B Green, C Bordallo, J Liu, R S Slaughter, G J Kaczorowski, and M L Garcia. 1999. "Binding of Correolide to K(v)1 Family Potassium Channels. Mapping the Domains of High Affinity Interaction.." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (36): 25237–44.
- Haroun, M K. 2003. "Risk Factors for Chronic Kidney Disease: a Prospective Study of 23,534 Men and Women in Washington County, Maryland." *Journal of the American Society of Nephrology* 14 (11): 2934–41. doi:10.1097/01.ASN.0000095249.99803.85.
- Hashitani, H, and H Suzuki. 1997. "K⁺ Channels Which Contribute to the Acetylcholine-Induced Hyperpolarization in Smooth Muscle of the Guinea-Pig Submucosal Arteriole." *The Journal of Physiology* 501 (2). Blackwell Publishing Ltd: 319–29. doi:10.1111/j.1469-7793.1997.319bn.x.
- Hemmelgarn, B R, J Zhang, B J Manns, and M Tonelli. 2006. "Progression of Kidney Dysfunction in the Community-Dwelling Elderly." *Kidney ...*
- Hilgers, RHP, L M Jin, and T D Palmer. 2005. *Characterization of Signaling Pathways Involved in the Spontaneous Tone in Hypertensive Rats*. FASEB
- Hille, Bertil. 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates Incorporated.
- Hsueh, Chia-Hsiang, Neal X Chen, Shien-Fong Lin, Peng-Sheng Chen, Vincent H Gattone, Matthew R Allen, Michael C Fishbein, and Sharon M Moe. 2014. "Pathogenesis of Arrhythmias in a Model of CKD.." *Journal of the American Society of Nephrology* 25 (12): 2812–21. doi:10.1681/ASN.2013121343.
- Hujairi, Nabil M A, Behdad Afzali, and David J A Goldsmith. 2004. "Cardiac Calcification in Renal Patients: What We Do and Don't Know." *American Journal of Kidney Diseases* 43 (2): 234–43. doi:10.1053/j.ajkd.2003.10.014.
- Hunt, Jennifer L, Ronald Fairman, Marc E Mitchell, Jeffrey P Carpenter, Michael Golden, Tigran Khalapyan, Megan Wolfe, et al. 2002. "Bone Formation in Carotid Plaques: a Clinicopathological Study.." *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 33 (5): 1214–19.
- Hübner, Christian A, and Thomas J Jentsch. 2002. "Ion Channel Diseases.." *Human Molecular Genetics* 11 (20): 2435–45.

- Inker, Lesley A, Brad C Astor, Chester H Fox, Tamara Isakova, James P Lash, Carmen A Peralta, Manjula Kurella Tamura, and Harold I Feldman. 2014. "KDOQI US Commentary on the 2012 KDIGO Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of CKD.." *American Journal of Kidney Diseases : the Official Journal of the National Kidney Foundation* 63 (5): 713–35. doi:10.1053/j.ajkd.2014.01.416.
- Iyemere, V P, D Proudfoot, P L Weissberg, and C M Shanahan. 2006. "Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Plasticity and the Regulation of Vascular Calcification.." *Journal of Internal Medicine* 260 (3): 192–210. doi:10.1111/j.1365-2796.2006.01692.x.
- Jackson, W F. 2000. "Ion Channels and Vascular Tone.." *Hypertension* 35 (1 Pt 2): 173–78.
- Jackson, W F. 2005a. "Potassium Channels and Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells." *Circulation Research* 97 (12): 1211–12. doi:10.1161/01.RES.0000196742.65848.56.
- Jackson, W F. 2010. "KV1.3: a New Therapeutic Target to Control Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30 (6). American Heart Association, Inc.: 1073–74. doi:10.1161/ATVBAHA.110.206565.
- Jackson, W F, and K L Blair. 1998. "Characterization and Function of Ca(2+)-Activated K+ Channels in Arteriolar Muscle Cells.." *The American Journal of Physiology* 274 (1 Pt 2): H27–H34.
- Jackson, William F. 2005b. "Potassium Channels in the Peripheral Microcirculation.." *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)* 12 (1): 113–27. doi:10.1080/10739680590896072.
- Jaggari, J H, A S Stevenson, and M T Nelson. 1998. "Voltage Dependence of Ca²⁺ Sparks in Intact Cerebral Arteries.." *The American Journal of Physiology* 274 (6 Pt 1): C1755–61.
- Jaggari, J H, V A Porter, W J Lederer, and M T Nelson. 2000. "Calcium Sparks in Smooth Muscle.." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 278 (2): C235–56.
- Johnson, Rebecca C, Jane A Leopold, and Joseph Loscalzo. 2006. "Vascular Calcification: Pathobiological Mechanisms and Clinical Implications." *Circulation Research* 99 (10): 1044–59. doi:10.1161/01.RES.0000249379.55535.21.
- Jono, S, M D McKee, C E Murry, A Shioi, Y Nishizawa, K Mori, H Morii, and C M Giachelli. 2000. "Phosphate Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Calcification.." *Circulation Research* 87 (7): e10–e17. doi:10.1161/01.RES.87.7.e10.
- Jungers, P, T Nguyen Khoa, Z A Massy, J Zingraff, M Labrunie, B Descamps-Latscha, and N K Man. 1999. "Incidence of Atherosclerotic Arterial Occlusive Accidents in Predialysis and Dialysis Patients: a Multicentric Study in the Ile De France District.." *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association* -

European Renal Association 14 (4): 898–902.

- Kaplan-Albuquerque, Nihal, Yolanda E Bogaert, Vicki Van Putten, Mary C Weiser-Evans, and Raphael A Nemenoff. 2005. "Patterns of Gene Expression Differentially Regulated by Platelet-Derived Growth Factor and Hypertrophic Stimuli in Vascular Smooth Muscle Cells: Markers for Phenotypic Modulation and Response to Injury.." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (20): 19966–76. doi:10.1074/jbc.M500917200.
- Kawagishi, T, Y Nishizawa, T Konishi, K Kawasaki, M Emoto, T Shoji, T Tabata, T Inoue, and H Morii. 1995. "High-Resolution B-Mode Ultrasonography in Evaluation of Atherosclerosis in Uremia.." *Kidney International* 48 (3): 820–26.
- Keith, Douglas S, Gregory A Nichols, Christina M Gullion, Jonathan Betz Brown, and David H Smith. 2004. "Longitudinal Follow-Up and Outcomes Among a Population with Chronic Kidney Disease in a Large Managed Care Organization.." *Archives of Internal Medicine* 164 (6): 659–63. doi:10.1001/archinte.164.6.659.
- Kim, K M. 1976. "Calcification of Matrix Vesicles in Human Aortic Valve and Aortic Media.." *Federation Proceedings* 35 (2): 156–62.
- King, Kathryn E, Valentine P Iyemere, Peter L Weissberg, and Catherine M Shanahan. 2003. "Krüppel-Like Factor 4 (KLF4/GKLF) Is a Target of Bone Morphogenetic Proteins and Transforming Growth Factor Beta 1 in the Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype.." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (13): 11661–69. doi:10.1074/jbc.M211337200.
- Kinoshita, Hiroyuki, Toshiharu Azma, Katsutoshi Nakahata, Hiroshi Iranami, Yoshiki Kimoto, Mayuko Dojo, Osafumi Yuge, and Yoshio Hatano. 2004. "Inhibitory Effect of High Concentration of Glucose on Relaxations to Activation of ATP-Sensitive K⁺ Channels in Human Omental Artery.." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24 (12): 2290–95. doi:10.1161/01.ATV.0000148006.78179.c7.
- Kircelli, F, M E Peter, E Sevinc Ok, F G Celenk, M Yilmaz, S Steppan, G Asci, E Ok, and J Passlick-Deetjen. 2012. "Magnesium Reduces Calcification in Bovine Vascular Smooth Muscle Cells in a Dose-Dependent Manner." *Nephrology Dialysis Transplantation* 27 (2): 514–21. doi:10.1093/ndt/gfr321.
- Klassen, Preston S, Edmund G Lowrie, Donal N Reddan, Elizabeth R DeLong, Joseph A Coladonato, Lynda A Szczech, J Michael Lazarus, and William F Owen. 2002. "Association Between Pulse Pressure and Mortality in Patients Undergoing Maintenance Hemodialysis.." *Jama* 287 (12): 1548–55.

- Ko, Eun A, Jin Han, In Duk Jung, and Won Sun Park. 2008. "Physiological Roles of K⁺ Channels in Vascular Smooth Muscle Cells.." *Journal of Smooth Muscle Research = Nihon Heikatsukin Gakkai Kikanshi* 44 (2): 65–81.
- Kramann, Rafael, Simone K Couson, Sabine Neuss, Uta Kunter, Manfred Bovi, Jörg Bornemann, Ruth Knüchel, Willi Jahnen-Dechent, Jürgen Floege, and Rebekka K Schneider. 2011. "Exposure to Uremic Serum Induces a Procalcific Phenotype in Human Mesenchymal Stem Cells.." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31 (9): e45–e54. doi:10.1161/ATVBAHA.111.228601.
- Kumar, Meena S, and Gary K Owens. 2003. "Combinatorial Control of Smooth Muscle-Specific Gene Expression.." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (5): 737–47. doi:10.1161/01.ATV.0000065197.07635.BA.
- Kwak, Y G, N Hu, J Wei, A L George, T D Grobaski, M M Tamkun, and K T Murray. 1999. "Protein Kinase a Phosphorylation Alters K_vβ1.3 Subunit-Mediated Inactivation of the K_v1.5 Potassium Channel.." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (20): 13928–32.
- Lang, Florian, Erich Gulbins, Ildiko Szabo, Albrecht Lepple Wienhues, Stephan M Huber, Christophe Duranton, Karl S Lang, Philipp A Lang, and Thomas Wieder. 2004. "Cell Volume and the Regulation of Apoptotic Cell Death." *Journal of Molecular Recognition* 17 (5). John Wiley & Sons, Ltd.: 473–80. doi:10.1002/jmr.705.
- Ledoux, J. 2006. "Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone." *Physiology* 21 (1): 69–78. doi:10.1152/physiol.00040.2005.
- Levey, A S, R Atkins, J Coresh, E P Cohen, A J Collins, K-U Eckardt, M E Nahas, et al. 2007. "Chronic Kidney Disease as a Global Public Health Problem: Approaches and Initiatives - a Position Statement From Kidney Disease Improving Global Outcomes.." In, 72:247–59. doi:10.1038/sj.ki.5002343.
- Levey, Andrew S, and Josef Coresh. 2012. "Chronic Kidney Disease.." *Lancet (London, England)* 379 (9811): 165–80. doi:10.1016/S0140-6736(11)60178-5.
- Li, X. 2006. "Role of the Sodium-Dependent Phosphate Cotransporter, Pit-1, in Vascular Smooth Muscle Cell Calcification." *Circulation Research* 98 (7): 905–12. doi:10.1161/01.RES.0000216409.20863.e7.
- Li, Xianwu, Hsueh-Ying Yang, and Cecilia M Giachelli. 2008. "BMP-2 Promotes Phosphate Uptake, Phenotypic Modulation, and Calcification of Human Vascular Smooth Muscle Cells.." *Atherosclerosis* 199 (2): 271–77. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.11.031.
- Libby, Peter. 2002. "Inflammation in Atherosclerosis.." *Nature* 420 (6917): 868–74.

doi:10.1038/nature01323.

- Lin, Jinghan, Shanshan Zhou, Tingting Zhao, Ting Ju, and Liming Zhang. 2016. "TRPM7 Channel Regulates Ox-LDL-Induced Proliferation and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells via MEK-ERK Pathways.." *FEBS Letters* 590 (4): 520–32. doi:10.1002/1873-3468.12088.
- Liu, Yaorong, Lin Zhang, Zhaohui Ni, Jiaqi Qian, and Wei Fang. 2016. "Calcium Phosphate Crystals From Uremic Serum Promote Osteogenic Differentiation in Human Aortic Smooth Muscle Cells.." *Calcified Tissue International* 99 (5). Springer US: 543–55. doi:10.1007/s00223-016-0182-y.
- Livak, K J, and T D Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method.." *Methods* 25 (4): 402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- Lomashvili, Koba A, Scott Cobbs, Randolph A Hennigar, Kenneth I Hardcastle, and W Charles O'Neill. 2004. "Phosphate-Induced Vascular Calcification: Role of Pyrophosphate and Osteopontin.." *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 15 (6): 1392–1401.
- London, G M, A P Guerin, S J Marchais, B Pannier, M E Safar, M Day, and F Metivier. 1996. "Cardiac and Arterial Interactions in End-Stage Renal Disease.." *Kidney International* 50 (2): 600–608.
- London, G M, S J Marchais, A P Guerin, F Metivier, and B Pannier. 1993. "Cardiac Hypertrophy and Arterial Alterations in End-Stage Renal Disease: Hemodynamic Factors.." *Kidney International. Supplement* 41 (May): S42–S49.
- London, Gerard M, Alain P Guérin, Sylvain J Marchais, Fabien M etivier, Bruno Pannier, and Hasan Adda. 2003. "Arterial Media Calcification in End-Stage Renal Disease: Impact on All-Cause and Cardiovascular Mortality.." *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 18 (9): 1731–40.
- Lopez, Jose J, Letizia Albarran, Luis J Gómez, Tarik Smani, Gines M Salido, and Juan A Rosado. 2016. "Molecular Modulators of Store-Operated Calcium Entry.." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1863 (8): 2037–43. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.04.024.
- L ohn, Matthias, Birgit Lauterbach, Hermann Haller, Olaf Pongs, Friedrich C Luft, and Maik Gollasch. 2001. "B1-Subunit of BK Channels Regulates Arterial Wall [Ca²⁺] and Diameter in Mouse Cerebral Arteries." *Journal of Applied Physiology* 91 (3). American Physiological Society: 1350–54.
- Lu, Kuo-Cheng, Chia-Chao Wu, Jen-Fen Yen, and Wen-Chih Liu. 2014. "Vascular Calcification and

- Renal Bone Disorders.." *TheScientificWorldJournal* 2014: 637065. doi:10.1155/2014/637065.
- Lu, Yanjie, Salma T Hanna, Guanghua Tang, and Rui Wang. 2002. "Contributions of Kv1.2, Kv1.5 and Kv2.1 Subunits to the Native Delayed Rectifier K(+) Current in Rat Mesenteric Artery Smooth Muscle Cells.." *Life Sciences* 71 (12): 1465–73.
- Lusis, Aldons J. 2000. "Atherosclerosis.." *Nature* 407 (6801): 233–41. doi:10.1038/35025203.
- Mancia, Giuseppe, Guy De Backer, Anna Dominiczak, Renata Cifkova, Robert Fagard, Giuseppe Germano, Guido Grassi, et al. 2007. "2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC).." *Journal of Hypertension* 25 (6): 1105–87. doi:10.1097/HJH.0b013e3281fc975a.
- Mandegar, Mehran, and Jason X J Yuan. 2002. "Role of K+ Channels in Pulmonary Hypertension.." *Vascular Pharmacology* 38 (1): 25–33.
- Maravall, M, Z F Mainen, B L Sabatini, and K Svoboda. 2000. "Estimating Intracellular Calcium Concentrations and Buffering Without Wavelength Ratioing.." *Biophysical Journal* 78 (5): 2655–67. doi:10.1016/S0006-3495(00)76809-3.
- Marchais, S J, A P Guerin, and G M London. 1992. "Arterial Calcinosi, Chronic Renal Failure and Calcium Antagonism.." *Drugs* 44 Suppl 1: 119–22.
- Marchenko, S M, and S O Sage. 1996. "Calcium-Activated Potassium Channels in the Endothelium of Intact Rat Aorta.." *The Journal of Physiology* 492 (1): 53–60. doi:10.1113/jphysiol.1996.sp021288.
- Martens, J R, and C H Gelband. 1996. "Alterations in Rat Interlobar Artery Membrane Potential and K+ Channels in Genetic and Nongenetic Hypertension.." *Circulation Research* 79 (2): 295–301.
- Matheu, Melanie P, Christine Beeton, Adriana Garcia, Victor Chi, Srikant Rangaraju, Olga Safrina, Kevin Monaghan, et al. 2008. "Imaging of Effector Memory T Cells During a Delayed-Type Hypersensitivity Reaction and Suppression by Kv1.3 Channel Block.." *Immunity* 29 (4): 602–14. doi:10.1016/j.immuni.2008.07.015.
- Mayhan, W G, and F M Faraci. 1993. "Responses of Cerebral Arterioles in Diabetic Rats to Activation of ATP-Sensitive Potassium Channels.." *The American Journal of Physiology* 265 (1 Pt 2): H152–57.
- McGahon, Mary K, Jennine M Dawicki, Aruna Arora, D A Simpson, T A Gardiner, A W Stitt, C Norman Scholfield, J Graham McGeown, and Tim M Curtis. 2007. "Kv1.5 Is a Major

- Component Underlying the a-Type Potassium Current in Retinal Arteriolar Smooth Muscle.." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 292 (2): H1001–8. doi:10.1152/ajpheart.01003.2006.
- McManus, O B, and K L Magleby. 1991. "Accounting for the Ca (2+)-Dependent Kinetics of Single Large-Conductance Ca (2+)-Activated K⁺ Channels in Rat Skeletal Muscle.." *The Journal of Physiology*.
- Meyer, Timothy W, and Thomas H Hostetter. 2007. "Uremia.." *The New England Journal of Medicine* 357 (13): 1316–25. doi:10.1056/NEJMra071313.
- Micheletti, Robert G, Gregory A Fishbein, Judith S Currier, and Michael C Fishbein. 2008. "Mönckeberg Sclerosis Revisited: a Clarification of the Histologic Definition of Mönckeberg Sclerosis.." *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 132 (1): 43–47. doi:10.1043/1543-2165(2008)132[43:MSRACO]2.0.CO;2.
- Miguel-Velado, Eduardo, Alejandro Moreno-Domínguez, Olaia Colinas, Pilar Ciudad, Magda Heras, M Teresa Pérez-García, and José Ramón López-López. 2005. "Contribution of Kv Channels to Phenotypic Remodeling of Human Uterine Artery Smooth Muscle Cells.." *Circulation Research* 97 (12): 1280–87. doi:10.1161/01.RES.0000194322.91255.13.
- Miguel-Velado, Eduardo, Francisco D Pérez-Carretero, Olaia Colinas, Pilar Ciudad, Magda Heras, José R López-López, and M Teresa Pérez-García. 2010. "Cell Cycle-Dependent Expression of Kv3.4 Channels Modulates Proliferation of Human Uterine Artery Smooth Muscle Cells.." *Cardiovascular Research* 86 (3): 383–91. doi:10.1093/cvr/cvq011.
- Milesi, V, E A Aiello, A Rebolledo, A Gomez Alvis, and A O Grassi de Gende. 1999. "Role of a Ca²⁺-Activated K⁺ Current in the Maintenance of Resting Membrane Potential of Isolated, Human, Saphenous Vein Smooth Muscle Cells.." *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 437 (3): 455–61.
- Miura, H. 2002. "Diabetes Mellitus Impairs Vasodilation to Hypoxia in Human Coronary Arterioles: Reduced Activity of ATP-Sensitive Potassium Channels." *Circulation Research* 92 (2): 151–58. doi:10.1161/01.RES.0000052671.53256.49.
- Mizobuchi, M, D Towler, and E Slatopolsky. 2009. "Vascular Calcification: the Killer of Patients with Chronic Kidney Disease." *Journal of the American Society of Nephrology* 20 (7): 1453–64. doi:10.1681/ASN.2008070692.
- Mizobuchi, Masahide, Hiroaki Ogata, Ikuji Hatamura, Fumihiko Koiwa, Fumie Saji, Kazuhiro Shiizaki, Shigeo Negi, et al. 2006. "Up-Regulation of Cbfa1 and Pit-1 in Calcified Artery of Uraemic Rats with Severe Hyperphosphataemia and Secondary Hyperparathyroidism.."

- Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 21 (4): 911–16. doi:10.1093/ndt/gfk008.
- Moe, S, T Drüeke, J Cunningham, W Goodman, K Martin, K Olgaard, S Ott, et al. 2006. "Definition, Evaluation, and Classification of Renal Osteodystrophy: a Position Statement From Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)." In, 69:1945–53. doi:10.1038/sj.ki.5000414.
- Moe, Sharon M, Danxia Duan, Brian P Doehle, Kalisha D O'Neill, and Neal X Chen. 2003. "Uremia Induces the Osteoblast Differentiation Factor Cbfa1 in Human Blood Vessels.." *Kidney International* 63 (3): 1003–11. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00820.x.
- Murphy, M E, and J E Brayden. 1995. "Nitric Oxide Hyperpolarizes Rabbit Mesenteric Arteries via ATP-Sensitive Potassium Channels.." *The Journal of Physiology* 486 (1): 47–58. doi:10.1113/jphysiol.1995.sp020789.
- National Kidney Foundation. 2002. "K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification.." *American Journal of Kidney Diseases : the Official Journal of the National Kidney Foundation*.
- Nelson, M T, and J M Quayle. 1995. "Physiological Roles and Properties of Potassium Channels in Arterial Smooth Muscle.." *The American Journal of Physiology* 268 (4 Pt 1): C799–822.
- Nelson, M T, M A Conway, H J Knot, and J E Brayden. 1997. "Chloride Channel Blockers Inhibit Myogenic Tone in Rat Cerebral Arteries.." *The Journal of Physiology* 502 (Pt 2) (July): 259–64.
- Neylon, Craig B. 2002. "Potassium Channels and Vascular Proliferation.." *Vascular Pharmacology* 38 (1): 35–41.
- Nilius, B, G Schwarz, and G Droogmans. 1993. "Control of Intracellular Calcium by Membrane Potential in Human Melanoma Cells.." *The American Journal of Physiology* 265 (6 Pt 1): C1501–10.
- Nitta, Kosaku. 2011. "Vascular Calcification in Patients with Chronic Kidney Disease." *Therapeutic Apheresis and Dialysis* 15 (6): 513–21. doi:10.1111/j.1744-9987.2011.00979.x.
- O'Neill, W Charles, and Koba A Lomashvili. 2010. "Recent Progress in the Treatment of Vascular Calcification.." *Kidney International* 78 (12): 1232–39. doi:10.1038/ki.2010.334.
- Olschewski, Andrea, Yingji Li, Bi Tang, Jörg Hanze, Bastian Eul, Rainer M Bohle, Jochen Wilhelm, et al. 2006. "Impact of TASK-1 in Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells.." *Circulation Research* 98 (8): 1072–80. doi:10.1161/01.RES.0000219677.12988.e9.

- Owens, G K. 1995. "Regulation of Differentiation of Vascular Smooth Muscle Cells.." *Physiological Reviews* 75 (3): 487–517.
- Owens, Gary K, Meena S Kumar, and Brian R Wamhoff. 2004. "Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease.." *Physiological Reviews* 84 (3): 767–801. doi:10.1152/physrev.00041.2003.
- Pai, Ashwini, Elizabeth M Leaf, Mohga El-Abbadi, and Cecilia M Giachelli. 2011. "Elastin Degradation and Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype Change Precede Cell Loss and Arterial Medial Calcification in a Uremic Mouse Model of Chronic Kidney Disease.." *The American Journal of Pathology* 178 (2): 764–73. doi:10.1016/j.ajpath.2010.10.006.
- Pardo, Luis A. 2004. "Voltage-Gated Potassium Channels in Cell Proliferation.." *Physiology (Bethesda, Md.)* 19 (October): 285–92. doi:10.1152/physiol.00011.2004.
- Parikh, Nisha I, Shih-Jen Hwang, Martin G Larson, Daniel Levy, and Caroline S Fox. 2008. "Chronic Kidney Disease as a Predictor of Cardiovascular Disease (From the Framingham Heart Study).." *The American Journal of Cardiology* 102 (1): 47–53. doi:10.1016/j.amjcard.2008.02.095.
- Patidar, Ashish, Dhruv K Singh, Peter Winocour, Ken Farrington, and Anwar R Baydoun. 2013. "Human Uraemic Serum Displays Calcific Potential in Vitro that Increases with Advancing Chronic Kidney Disease." *Clinical Science (London, England : 1979)* 125 (5): 237–45. doi:10.1007/s00467-007-0743-4.
- Perneger, Thomas V. 1994. "End-Stage Renal Disease Attributable to Diabetes Mellitus." *Annals of Internal Medicine* 121 (12): 912. doi:10.7326/0003-4819-121-12-199412150-00002.
- Pérez, G J, A D Bonev, J B Patlak, and M T Nelson. 1999. "Functional Coupling of Ryanodine Receptors to K_{Ca} Channels in Smooth Muscle Cells From Rat Cerebral Arteries.." *The Journal of General Physiology* 113 (2): 229–38.
- Pluger, S, J Faulhaber, M Furstenu, M Lohn, R Waldschutz, M Gollasch, H Haller, F C Luft, H Ehmke, and O Pongs. 2000. "Mice with Disrupted BK Channel 1 Subunit Gene Feature Abnormal Ca²⁺ Spark/STOC Coupling and Elevated Blood Pressure." *Circulation Research* 87 (11). American Heart Association, Inc.: e53–e60. doi:10.1161/01.RES.87.11.e53.
- Pocock, Gillian, and Christopher D Richards. 2005. *Fisiología Humana*. Elsevier España.
- Popele, N M van, D E Grobbee, M L Bots, R Asmar, J Topouchian, R S Reneman, A P Hoeks, D A van der Kuip, A Hofman, and J C Witteman. 2007. "Association Between Arterial Stiffness and Atherosclerosis: the Rotterdam Study;."
- Proudfoot, D, J N Skepper, L Hegyi, M R Bennett, C M Shanahan, and P L Weissberg. 2000.

- “Apoptosis Regulates Human Vascular Calcification in Vitro: Evidence for Initiation of Vascular Calcification by Apoptotic Bodies.” *Circulation Research* 87 (11): 1055–62.
- Retailleau, Kevin, Fabrice Duprat, Malika Arhatte, Sanjeev Sumant Ranade, Rémi Peyronnet, Joana Raquel Martins, Martine Jodar, et al. 2015. “Piezo1 in Smooth Muscle Cells Is Involved in Hypertension-Dependent Arterial Remodeling.” *Cell Reports* 13 (6): 1161–71. doi:10.1016/j.celrep.2015.09.072.
- Reynolds, Joanne L, Alexis J Joannides, Jeremy N Skepper, Rosamund McNair, Leon J Schurgers, Diane Proudfoot, Willi Jahnen-Dechent, Peter L Weissberg, and Catherine M Shanahan. 2004. “Human Vascular Smooth Muscle Cells Undergo Vesicle-Mediated Calcification in Response to Changes in Extracellular Calcium and Phosphate Concentrations: a Potential Mechanism for Accelerated Vascular Calcification in ESRD.” *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 15 (11): 2857–67. doi:10.1097/01.ASN.0000141960.01035.28.
- Ruffenach, Grégoire, Sophie Chabot, Virginie F Tanguay, Audrey Courboulain, Olivier Boucherat, Francois Potus, Jolyane Meloche, et al. 2016. “Role for RUNX2 in Proliferative and Calcified Vascular Lesions in Pulmonary Arterial Hypertension.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, May. doi:10.1164/rccm.201512-2380OC.
- Sambrook, J, E F Fritsch, and T Maniatis. 1989. *Molecular Cloning*.
- Sarnak, M J, B E Coronado, T Greene, S R Wang, J W Kusek, G J Beck, and A S Levey. 2002. “Cardiovascular Disease Risk Factors in Chronic Renal Insufficiency.” *Clinical Nephrology* 57 (5): 327–35.
- Sarnak, Mark J, and Andrew S Levey. 1999. “Epidemiology of Cardiac Disease in Dialysis Patients.” *Seminars in Dialysis* 12 (2). Blackwell Science Inc: 69–76. doi:10.1046/j.1525-139X.1999.00006.x.
- Sarnak, Mark J, Andrew S Levey, Anton C Schoolwerth, Josef Coresh, Bruce Culleton, L Lee Hamm, Peter A McCullough, Bertram L Kasiske, Ellie Kelepouris, Michael J Klag, Patrick Parfrey, Marc Pfeffer, Leopoldo Raij, David J Spinosa, and Peter W Wilson. 2003. “Kidney Disease as a Risk Factor for Development of Cardiovascular Disease: a Statement From the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention.” *Hypertension* 42 (5): 1050–65. doi:10.1161/01.HYP.0000102971.85504.7c.
- Sarnak, Mark J, Andrew S Levey, Anton C Schoolwerth, Josef Coresh, Bruce Culleton, L Lee Hamm, Peter A McCullough, Bertram L Kasiske, Ellie Kelepouris, Michael J Klag, Patrick Parfrey, Marc Pfeffer, Leopoldo Raij, David J Spinosa, Peter W Wilson, et al. 2003. “Kidney

- Disease as a Risk Factor for Development of Cardiovascular Disease: a Statement From the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention.." *Circulation* 108 (17): 2154–69. doi:10.1161/01.CIR.0000095676.90936.80.
- Savage, T, A L Clarke, M Giles, C R Tomson, and A E Raine. 1998. "Calcified Plaque Is Common in the Carotid and Femoral Arteries of Dialysis Patients Without Clinical Vascular Disease.." *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 13 (8): 2004–12.
- Schiffrin, Ernesto L, and Rhian M Touyz. 2004. "From Bedside to Bench to Bedside: Role of Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Remodeling of Resistance Arteries in Hypertension.." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 287 (2): H435–46. doi:10.1152/ajpheart.00262.2004.
- Schmitz, Alexander, Ananthkrishnan Sankaranarayanan, Philippe Azam, Kristina Schmidt-Lassen, Daniel Homerick, Wolfram Hänsel, and Heike Wulff. 2005. "Design of PAP-1, a Selective Small Molecule Kv1.3 Blocker, for the Suppression of Effector Memory T Cells in Autoimmune Diseases.." *Molecular Pharmacology* 68 (5): 1254–70. doi:10.1124/mol.105.015669.
- Schneider, Caroline A, Wayne S Rasband, and Kevin W Eliceiri. 2012. "NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis.." *Nature Methods* 9 (7): 671–75.
- Schwarz, U, M Buzello, E Ritz, G Stein, G Raabe, G Wiest, G Mall, and K Amann. 2000. "Morphology of Coronary Atherosclerotic Lesions in Patients with End-Stage Renal Failure.." *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 15 (2): 218–23.
- Scudiero, D A, R H Shoemaker, K D Paull, A Monks, S Tierney, T H Nofziger, M J Currens, D Seniff, and M R Boyd. 1988. "Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines.." *Cancer Research* 48 (17): 4827–33.
- Setoguchi, Motoko, Yusuke Ohya, Isao Abe, and Masatoshi Fujishima. 1997. "Stretch-Activated Whole-Cell Currents in Smooth Muscle Cells From Mesenteric Resistance Artery of Guinea-Pig." *The Journal of Physiology* 501 (2). Blackwell Publishing Ltd: 343–53. doi:10.1111/j.1469-7793.1997.343bn.x.
- Shanahan, C M, and P L Weissberg. 1999. "Smooth Muscle Cell Phenotypes in Atherosclerotic Lesions.." *Current Opinion in Lipidology* 10 (6): 507–13.

- Shanahan, C M, M H Crouthamel, A Kapustin, and C M Giachelli. 2011. "Arterial Calcification in Chronic Kidney Disease: Key Roles for Calcium and Phosphate." *Circulation Research* 109 (6): 697–711. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.234914.
- Shanahan, C M, N R Cary, J C Metcalfe, and P L Weissberg. 1994. "High Expression of Genes for Calcification-Regulating Proteins in Human Atherosclerotic Plaques.." *The Journal of Clinical Investigation* 93 (6): 2393–2402. doi:10.1172/JCI117246.
- Shanahan, C M, N R Cary, J R Salisbury, D Proudfoot, P L Weissberg, and M E Edmonds. 1999. "Medial Localization of Mineralization-Regulating Proteins in Association with Mönckeberg's Sclerosis: Evidence for Smooth Muscle Cell-Mediated Vascular Calcification.." *Circulation* 100 (21): 2168–76.
- Shimizu, Takehisa, Toru Tanaka, Tatsuya Iso, Keiko Kawai-Kowase, and Masahiko Kurabayashi. 2012. "Azelnidipine Inhibits Msx2-Dependent Osteogenic Differentiation and Matrix Mineralization of Vascular Smooth Muscle Cells.." *International Heart Journal* 53 (5): 331–35.
- Shin, Mee-Young, and In-Sook Kwun. 2013. "Phosphate-Induced Rat Vascular Smooth Muscle Cell Calcification and the Implication of Zinc Deficiency in A7r5 Cell Viability.." *Preventive Nutrition and Food Science* 18 (2): 92–97. doi:10.3746/pnf.2013.18.2.092.
- Shioi, A, Y Nishizawa, S Jono, H Koyama, M Hosoi, and H Morii. 1995. "Beta-Glycerophosphate Accelerates Calcification in Cultured Bovine Vascular Smooth Muscle Cells.." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 15 (11): 2003–9.
- Shipston, M J, and L Tian. 2016. "Posttranscriptional and Posttranslational Regulation of BK Channels.." *International Review of Neurobiology* 128: 91–126. doi:10.1016/bs.irn.2016.02.012.
- Shobeiri, Navid, Michael A Adams, and Rachel M Holden. 2010. "Vascular Calcification in Animal Models of CKD: a Review.." *American Journal of Nephrology* 31 (6): 471–81. doi:10.1159/000299794.
- Shroff, Rukshana C, Rosamund McNair, Jeremy N Skepper, Nichola Figg, Leon J Schurgers, John Deanfield, Lesley Rees, and Catherine M Shanahan. 2010. "Chronic Mineral Dysregulation Promotes Vascular Smooth Muscle Cell Adaptation and Extracellular Matrix Calcification.." *Journal of the American Society of Nephrology* 21 (1): 103–12. doi:10.1681/ASN.2009060640.
- Shroff, Rukshana C, Rosamund McNair, Nichola Figg, Jeremy N Skepper, Leon Schurgers, Ashmeet Gupta, Melanie Hiorns, et al. 2008. "Dialysis Accelerates Medial Vascular

- Calcification in Part by Triggering Smooth Muscle Cell Apoptosis." *Circulation* 118 (17): 1748–57. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.783738.
- Smith, P K, R I Krohn, G T Hermanson, A K Mallia, F H Gartner, M D Provenzano, E K Fujimoto, N M Goeke, B J Olson, and D C Klenk. 1985. "Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid.." *Analytical Biochemistry* 150 (1): 76–85.
- Speer, Mei Y, Xianwu Li, Pranoti G Hiremath, and Cecilia M Giachelli. 2010. "Runx2/Cbfa1, but Not Loss of Myocardin, Is Required for Smooth Muscle Cell Lineage Reprogramming Toward Osteochondrogenesis." *Journal of Cellular Biochemistry* 110 (4): 935–47. doi:10.1002/jcb.22607.
- Stryer, L. 2000. "Natural History of Calcium Deposits in Atherosclerosis Progression and Regression.." *Zeitschrift Fur Kardiologie* 89 Suppl 2: 28–35.
- Steitz, S A, M Y Speer, G Curinga, H Y Yang, P Haynes, R Aebbersold, T Schinke, G Karsenty, and C M Giachelli. 2001. "Smooth Muscle Cell Phenotypic Transition Associated with Calcification: Upregulation of Cbfa1 and Downregulation of Smooth Muscle Lineage Markers.." *Circulation Research* 89 (12): 1147–54. doi:10.1161/hh2401.101070.
- Sun, Y, C H Byon, K Yuan, J Chen, X Mao, J M Heath, A Javed, K Zhang, P G Anderson, and Y Chen. 2012. "Smooth Muscle Cell-Specific Runx2 Deficiency Inhibits Vascular Calcification." *Circulation Research* 111 (5): 543–52. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.267237.
- Tanaka, Toru, Hiroko Sato, Hiroshi Doi, Carolina A Yoshida, Takehisa Shimizu, Hiroki Matsui, Miki Yamazaki, et al. 2008. "Runx2 Represses Myocardin-Mediated Differentiation and Facilitates Osteogenic Conversion of Vascular Smooth Muscle Cells.." *Molecular and Cellular Biology* 28 (3): 1147–60. doi:10.1128/MCB.01771-07.
- Tanaka, Yoshio, Katsuo Koike, Abderrahmane Alioua, Koki Shigenobu, Enrico Stefani, and Ligia Toro. 2004. "Beta1-Subunit of MaxiK Channel in Smooth Muscle: a Key Molecule Which Tunes Muscle Mechanical Activity.." *Journal of Pharmacological Sciences* 94 (4): 339–47.
- Tintut, Yin, Zeni Alfonso, Trishal Saini, Kristen Radcliff, Karol Watson, Kristina Boström, and Linda L Demer. 2003. "Multilineage Potential of Cells From the Artery Wall.." *Circulation* 108 (20): 2505–10. doi:10.1161/01.CIR.0000096485.64373.C5.
- Tiwari, Swasti, Yuwei Zhang, Jennifer Heller, Darrell R Abernethy, and Nikolai M Soldatov. 2006. "Atherosclerosis-Related Molecular Alteration of the Human CaV1.2 Calcium Channel alpha1C Subunit.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (45): 17024–29. doi:10.1073/pnas.0606539103.
- Tomaselli, G F, and E Marbán. 1999. "Electrophysiological Remodeling in Hypertrophy and

- Heart Failure.." *Cardiovascular Research* 42 (2): 270–83.
- Tonelli, Marcello, Natasha Wiebe, Bruce Culleton, Andrew House, Chris Rabbat, Mei Fok, Finlay McAlister, and Amit X Garg. 2006. "Chronic Kidney Disease and Mortality Risk: a Systematic Review.." *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 17 (7): 2034–47. doi:10.1681/ASN.2005101085.
- Tyson, Kerry L, Joanne L Reynolds, Rosamund McNair, Qiuping Zhang, Peter L Weissberg, and Catherine M Shanahan. 2003. "Osteo/Chondrocytic Transcription Factors and Their Target Genes Exhibit Distinct Patterns of Expression in Human Arterial Calcification.." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (3): 489–94. doi:10.1161/01.ATV.0000059406.92165.31.
- Vergara, C, R Latorre, and N V Marrion. 1998. "Calcium-Activated Potassium Channels." *Current Opinion in*
- Villa-Bellocosta, R, A Millan, and V Sorribas. 2010. "Role of Calcium-Phosphate Deposition in Vascular Smooth Muscle Cell Calcification." *AJP: Cell Physiology* 300 (1): C210–20. doi:10.1152/ajpcell.00229.2010.
- Villa-Bellocosta, R, and V Sorribas. 2009. "Phosphonoformic Acid Prevents Vascular Smooth Muscle Cell Calcification by Inhibiting Calcium-Phosphate Deposition." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29 (5): 761–66. doi:10.1161/ATVBAHA.108.183384.
- Villa-Bellocosta, R, X Wang, J L Millan, G R Dubyak, and W C O'Neill. 2011. "Extracellular Pyrophosphate Metabolism and Calcification in Vascular Smooth Muscle." *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 301 (1): H61–H68. doi:10.1152/ajpheart.01020.2010.
- Villa-Bellocosta, R, Y E Bogaert, M Levi, and V Sorribas. 2007. "Characterization of Phosphate Transport in Rat Vascular Smooth Muscle Cells: Implications for Vascular Calcification." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (5): 1030–36. doi:10.1161/ATVBAHA.106.132266.
- Wang, Ningning, Junwei Yang, Xiangbao Yu, Jianming Hu, Changying Xing, Xiaobing Ju, Xia Shen, Jun Qian, Xiufen Zhao, and Xiaoyun Wang. 2008. "Radial Artery Calcification in End-Stage Renal Disease Patients Is Associated with Deposition of Osteopontin and Diminished Expression of Alpha-Smooth Muscle Actin.." *Nephrology* 13 (5): 367–75. doi:10.1111/j.1440-1797.2008.00941.x.
- Webb, R Clinton. 2003. "Smooth Muscle Contraction and Relaxation.." *Advances in Physiology Education* 27 (1-4): 201–6.
- Wellman, G C, L Cartin, D M Eckman, A S Stevenson, C M Saundry, W J Lederer, and M T Nelson.

2001. "Membrane Depolarization, Elevated Ca(2+) Entry, and Gene Expression in Cerebral Arteries of Hypertensive Rats.." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 281 (6): H2559-67.
- Willis, A I, D Pierre-Paul, B E Sumpio, and V Gahtan. 2004. "Vascular Smooth Muscle Cell Migration: Current Research and Clinical Implications.." *Vascular and Endovascular Surgery* 38 (1): 11-23.
- Wonderlin, W F, and J S Strobl. 1996. "Potassium Channels, Proliferation and G1 Progression.." *The Journal of Membrane Biology* 154 (2): 91-107.
- Work, Global Outcomes KDIGO CKD-MBD. 2009. "KDIGO Clinical Practice Guideline for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD).." *Kidney International*.
- Wu, Jason, Amanda H Lewis, and Jörg Grandl. 2016. "Touch, Tension, and Transduction - the Function and Regulation of Piezo Ion Channels.." *Trends in Biochemical Sciences*, October. doi:10.1016/j.tibs.2016.09.004.
- Yamada, Shunsuke, Masanori Tokumoto, Kazuhiko Tsuruya, Narihito Tatsumoto, Hideko Noguchi, Takanari Kitazono, and Hiroaki Ooboshi. 2015. "Fetuin-a Decrease Induced by a Low-Protein Diet Enhances Vascular Calcification in Uremic Rats with Hyperphosphatemia." *AJP: Renal Physiology* 309 (8): F744-54. doi:10.1152/ajprenal.00017.2015.
- Yamazaki, J, D Duan, R Janiak, K Kuenzli, B Horowitz, and J R Hume. 1998. "Functional and Molecular Expression of Volume-Regulated Chloride Channels in Canine Vascular Smooth Muscle Cells.." *The Journal of Physiology* 507 (Pt 3) (March): 729-36.
- Yuan, J X, A M Aldinger, M Juhaszova, J Wang, J V Conte, S P Gaine, J B Orens, and L J Rubin. 1998. "Dysfunctional Voltage-Gated K+ Channels in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells of Patients with Primary Pulmonary Hypertension.." *Circulation* 98 (14): 1400-1406.
- Yuan, X J. 1995. "Voltage-Gated K+ Currents Regulate Resting Membrane Potential and [Ca2+]I in Pulmonary Arterial Myocytes.." *Circulation Research* 77 (2). American Heart Association, Inc.: 370-78. doi:10.1161/01.RES.77.2.370.
- Yuan, X J, M L Tod, L J Rubin, and M P Blaustein. 1996. "NO Hyperpolarizes Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells and Decreases the Intracellular Ca2+ Concentration by Activating Voltage-Gated K+ Channels.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (19): 10489-94.
- Zhang, Janet C L, Steven Kim, Brian P Helmke, William W Yu, Kevin L Du, Min Min Lu, Mark

Strobeck, Qian-Chun Yu, and Michael S Parmacek. 2001. "Analysis of SM22 α -Deficient Mice Reveals Unanticipated Insights Into Smooth Muscle Cell Differentiation and Function."

Zoccali, C, F A Benedetto, F Mallamaci, G Tripepi, G Giaccone, A Cataliotti, G Seminara, B Stancanelli, and L S Malatino. 2001. "Prognostic Impact of the Indexation of Left Ventricular Mass in Patients Undergoing Dialysis.." *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 12 (12): 2768-74.

1992. "Comorbid Conditions and Correlations with Mortality Risk Among 3,399 Incident Hemodialysis Patients.." *Yajkd* 20 (5 Suppl 2): 32-38.

2012. "KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease," December, 1-163.

