



Universidad de Oviedo

PROGRAMA DE DOCTORADO: INVESTIGACIÓN EN MEDICINA

**Polimorfismos de proteínas de la matriz
extracelular y perfil de expresión
diferencial en la calcificación vascular**

DIEGO TUÑÓN LE POULTEL

Imagen de portada: Tomada de Angelo Farina, Panorama Anatómico, 1984

El esqueleto de la ciencia son los hechos, pero los músculos y los nervios son el significado que se les confiere, y el alma de la ciencia son las ideas.

(Dr. Ruy Pérez Tamayo)

Al Dr. Jorge B. Cannata Andía, a su voto de confianza, a su tutela y por descubrirme el apasionante mundo en el que me ha tocado trabajar.

A los Dres. ISABEL RODRÍGUEZ y MANUEL NAVES, por ser como son investigadores con mayúsculas, motivarme, apoyarme y tener la paciencia de enseñarme.

Al Dr. José Luis Fernández Martín, por salvaguardar la calidad de mis experimentos.

A los Dres. Bernardino López, Carlos Gómez y Minerva Rodríguez, por tantas dudas clínicas resueltas.

A mis compañeros de laboratorio Natalia, Pablo, Edu, Sara P., Cris, Isa Q., Iván, Sara B., Ana R. y Ana I., mejores de lo que jamás podría haber imaginado.

A Mercedes, Ángeles, Carmen y Asun, por escucharme no solo en el descanso de media mañana.

A Marisa y Sandra, por su incalculable colaboración en la labor administrativa.

A Elo, Nieves y Sonia, por derrochar simpatía.

Este trabajo no habría sido posible sin la ayuda de la Fundación Renal Álvarez de Toledo, el Instituto Reina Sofía de Investigación y la Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (FICYT).

A mis amigos, los que fueron y siguen siendo, los que son y los que serán.

A mi familia con cariño, en particular a mis padres, por su comprensión durante todos estos años.

A Silvi, por estar a mi lado y ser un encanto.

ABREVIATURAS

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADNc:	ADN copia
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNm:	ARN mensajero
BMP:	Proteína morfogenética ósea
CMLV:	Células de músculo liso vascular
DMO:	Densidad mineral ósea
EVOS:	Estudio europeo sobre osteoporosis vertebral
EPOS:	Estudio prospectivo europeo sobre osteoporosis
IC:	Intervalo de confianza
IMC:	Índice de masa corporal
MGP:	Proteína Gla de la matriz
MMP:	Metaloproteasa de la matriz extracelular
OPG:	Osteoprotegerina
OPN:	Osteopontina
OR:	Odds ratio
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PTH:	Parathormona/ hormona paratiroidea
PTHrP:	Péptido relacionado con la PTH
qRT-PCR:	PCR cuantitativa a tiempo real
RUNX2:	Factor de transcripción 2 relacionado con Runt
SNP:	Polimorfismo de nucleótido simple

1. INTRODUCCIÓN:	19
1.1 Calcificación vascular	22
1.1.1 Promotores de la calcificación vascular.	23
1.1.1.1 Calcio y fósforo.	24
1.1.1.2 Vitamina D.	25
1.1.1.3 Estrés oxidativo.	25
1.1.2 Inhibidores de la calcificación vascular.	26
1.1.2.1 Proteína Gla de la Matriz.	26
1.1.2.2 Vitamina K.	28
1.1.2.3 Pirofosfato.	29
1.2 Relación entre calcificación vascular y pérdida de masa ósea	30
1.3 Aspectos genéticos relacionados con calcificación vascular	31
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:	35
2.1 Hipótesis de trabajo	37
2.2 Objetivos:	39
3. SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS:	41
3.1 Caracterización de la población EVOS / EPOS.	43
3.1.1 Antropometría.	44
3.1.2 Cuestionario de factores de riesgo.	44
3.1.3 Densitometría ósea.	44
3.1.4 Evaluación de la calcificación aórtica.	45
3.1.5 Extracción de ADN genómico.	46
3.2 Análisis de genotipos.	46
3.2.1 Análisis de haplotipos.	48
3.3 Análisis informático de secuencias.	49
3.4 Construcción de plásmidos.	50
3.4.1 Mutagénesis dirigida.	50
3.5 Cultivo celular	51
3.5.1 Transfección transitoria.	51
3.6 Medida de actividad luciferasa.	52
3.7 Modelos de calcificación vascular <i>in vitro</i>.	52
3.7.1 Detección de mineralización.	53
3.7.1.1 Tinción con rojo de alizarina.	53
3.7.1.2 Cuantificación del depósito de calcio.	53
3.8 PCR cuantitativa	54
3.9 Western blot	54
3.10 Electroforesis bidimensional.	56
3.11 Espectrometría de masas	57
3.12 Análisis estadístico	57
4. RESULTADOS:	59
4.1 Asociación de calcificación aórtica y DMO con variantes genéticas.	61
4.1.1 Características generales de la población.	61
4.1.2 Asociación entre calcificación aórtica, DMO y Ser37Ala de <i>BMP2</i> .	63
4.1.3 Asociación entre calcificación aórtica, DMO y Val667Met de <i>LRP5</i> .	64
4.1.4 Asociación entre calcificación aórtica, DMO y -1607 1G>2G de <i>MMP1</i> .	65
4.1.5 Asociación entre calcificación aórtica, DMO y -138T>C de <i>MGP</i> .	66
4.1.6 Asociación entre calcificación aórtica, DMO y -7G>A de <i>MGP</i> .	67
4.1.7 Asociación entre calcificación aórtica, DMO y Thr83Ala de <i>MGP</i> .	69
4.1.8 Asociación entre calcificación aórtica, DMO y haplotipos de <i>MGP</i> .	71
4.1.9 Estudio informático de -7G>A y Thr83Ala de <i>MGP</i> .	72
4.1.10 Efecto de -7G>A de <i>MGP</i> en la actividad transcripcional.	76
4.1.11 Efecto de Thr83Ala de <i>MGP</i> en la calcificación vascular <i>in vitro</i> .	77

TABLA DE CONTENIDO

4.2 Calcificación vascular <i>in vitro</i>.....	79
4.2.1 Efecto del calcitriol sobre el depósito de calcio en el modelo de calcificación vascular por exceso de calcio y de fósforo.	79
4.2.2 Efectos en la expresión génica.	81
4.2.3 Aproximación proteómica al efecto del calcitriol sobre la calcificación vascular.	82
4.2.4 Efecto del ácido fosfonofórmico en la calcificación vascular.....	84
5. DISCUSIÓN:	87
5.1 Influencia de las variantes génicas de proteínas de la matriz en la calcificación aórtica y en la DMO.	89
5.2 Estudios funcionales de los polimorfismos -7G>A y Thr83Ala de MGP..	94
5.3 Calcificación vascular <i>in vitro</i>: factores implicados.....	99
6. CONCLUSIONES:	105
7. BIBLIOGRAFÍA:	109

Figura 1: Promotores e inhibidores de la calcificación vascular.....	23
Figura 2: Patrón electroforético de los fragmentos de restricción obtenidos en la digestión de los productos de las PCRs conteniendo los polimorfismos estudiados.....	48
Figura 3: Alineamiento parcial de las secuencias nucleotídicas del gen <i>MGP</i> en distintas especies donde se muestra el nivel de conservación a nivel del cambio -7G>A.....	73
Figura 4: Predicción de sitios de unión a factores de transcripción en el promotor del gen <i>MGP</i>	84
Figura 5: Estructuras secundarias de mínima ΔG del ARNm del gen <i>MGP</i> con los dos alelos en la posición 83.....	75
Figura 6: Alineamiento parcial de las secuencias aminoacídicas de la <i>MGP</i> en distintas especies.....	76
Figura 7: Modelo tridimensional de la <i>MGP</i>	76
Figura 8: Medida de la actividad luciferasa relativa generada por las construcciones en pGL3 con los alelos -7G y -7A de <i>MGP</i> en células óseas y vasculares.....	77
Figura 9: Niveles de expresión de <i>MGP</i> humana en células vasculares transfectadas con pcDNA3 vacío, pcDNA3- <i>MGP</i> 83Thr o pcDNA3- <i>MGP</i> 83Ala.....	78
Figura 10: Determinación del depósito de calcio en células vasculares transfectadas con pcDNA3 vacío, pcDNA3- <i>MGP</i> 83Thr o pcDNA3- <i>MGP</i> 83Ala cultivadas en medio CaPi durante 4 días.....	79
Figura 11: Macro y microfotografías de la tinción de rojo de alizarina de células vasculares cultivadas en medios control, CaPi y CaPi+CTR, a los 4 y 8 días de tratamiento.....	80
Figura 12: Determinación del depósito de calcio en células vasculares cultivadas en medios control, CaPi y CaPi+CTR, a los 4 y 8 días de tratamiento.....	81
Figura 13: Niveles relativos de ARNm de RUNX2, OPN, ALP, SM22 y ELN en células vasculares cultivadas en medios control, CaPi y CaPi+CTR durante 4 días.....	82
Figura 14: Geles bidimensionales de extractos proteicos de células vasculares cultivadas en medios control y CTR durante 10 días.....	83
Figura 15: Listado de proteínas expresadas diferencialmente en células vasculares tratadas diariamente con CTR durante 10 días, respecto a las células control.....	84
Figura 16: Expresión de las proteínas RUNX2, SOD2 y GAPDH en células vasculares cultivadas en medios control, BGP y BGP+PFA durante 4, 6 y 24 horas.....	85
Figura 17: Esquema de la regulación de la transcripción en el promotor del gen <i>MGP</i>	97
Figura 18: Esquema de las principales vías moleculares en las que está involucrada la <i>MGP</i>	98
Figura 19: Estructuras químicas del ácido fosfonofórmico, del pirofosfato y de los bisfosfonatos.....	102

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Parejas de oligonucleótidos usadas en las PCRs para el estudio de los polimorfismos.	47
Tabla 2: Características de la población separada por sexos.....	62
Tabla 3: Frecuencias genóticas y alélicas de los distintos polimorfismos estudiados en función del sexo.	63
Tabla 4: Porcentaje de individuos con presencia y progresión de calcificación aórtica, valores basales de DMO y tasa de cambio en DMO a los 4 años en función de los genotipos del polimorfismo Ser37Ala de <i>BMP2</i>	64
Tabla 5: Porcentaje de individuos con presencia y progresión de calcificación aórtica, valores basales de DMO y tasa de cambio en DMO a los 4 años en función de los genotipos del polimorfismo Val667Met de <i>LRP5</i>	65
Tabla 6: Porcentaje de individuos con presencia y progresión de calcificación aórtica, valores basales de DMO y tasa de cambio en DMO a los 4 años en función de los genotipos del polimorfismo -1607 1G>2G de <i>MMP1</i> . .	66
Tabla 7: Porcentaje de individuos con presencia y progresión de calcificación aórtica, valores basales de DMO y tasa de cambio en DMO a los 4 años en función de los genotipos del polimorfismo -138T>C de <i>MGP</i>	67
Tabla 8: Porcentaje de individuos con presencia y progresión de calcificación aórtica, valores basales de DMO y tasa de cambio en DMO a los 4 años en función de los genotipos del polimorfismo -7G>A de <i>MGP</i>	69
Tabla 9: Porcentaje de individuos con presencia y progresión de calcificación aórtica, valores basales de DMO y tasa de cambio en DMO a los 4 años en función de los genotipos del polimorfismo Thr83Ala de <i>MGP</i>	71
Tabla 10: Efecto del haplotipo TAG frente a TGA de <i>MGP</i> sobre las distintas variables.....	72

1. INTRODUCCIÓN:

Bajo la denominación de tejidos conectivos se agrupan aquellos que están constituidos por células rodeadas de fibras y de una matriz extracelular, cuya función es servir de sostén y armazón para otros tejidos, así como “conectar” o mantener una comunicación entre las células y las distintas partes del organismo.

La mayor parte se originan a partir del mesodermo, una de las tres hojas embrionarias, a partir del cual se forma el mesénquima, cuyas células migran a todo el organismo dando lugar a los distintos tejidos conectivos, tanto a los no especializados (el conjuntivo y el adiposo), como a los especializados (el muscular, el óseo, el cartilaginoso y la sangre).

La calcificación de la matriz extracelular puede ser fisiológica o patológica. Por un lado, la calcificación fisiológica se produce en los dientes y en los huesos por osificación intramembranosa o endocondral, cuando la matriz se convierte en un material rígido capaz de mantener la fuerza mecánica. Por otro lado, la calcificación patológica puede ocurrir en arterias, cartílagos, piel, cerebro y en otros tejidos blandos. Si bien las bases moleculares que regulan la calcificación aún no han sido identificadas, el hecho de que sólo la matriz extracelular del esqueleto mineralice bajo condiciones fisiológicas induce a pensar que la calcificación es un proceso activo, determinado genéticamente mediante la expresión de proteínas específicas. Con respecto a la calcificación patológica, el tejido que más frecuentemente se ve afectado es el de las capas media e íntima de las arterias.

1.1 Calcificación vascular.

Durante el siglo XVI, Benivieni y Fallopio fueron los primeros en describir la arteriosclerosis como una degeneración de las “arterias en hueso”. Virchow, en 1863, describió la aparición de calcificaciones ectópicas en pacientes con insuficiencia renal crónica como “osificaciones”. Contiguglia, en 1973, mostró que el calcio encontrado en los vasos de pacientes urémicos se encontraba en forma de cristales de hidroxapatita, con la misma estructura y composición que los del hueso ¹.

El mecanismo por el cual se produce la calcificación vascular es complejo y no está totalmente comprendido. Inicialmente, se pensaba que consistía en una simple precipitación de calcio y fósforo en un microambiente apropiado. Sin embargo, en mamíferos, incluidos los humanos, las concentraciones séricas de calcio y fósforo exceden en varias veces la solubilidad del producto calcio-fósforo (Ca₂P), sin que exista precipitación dentro de los vasos. Así, varias líneas de evidencia indicaron que mecanismos activos discurrían a la par que los procesos pasivos ². Durante estos procesos activos, las células de músculo liso vascular (CMLV), debido a ciertos promotores de la calcificación, sufren un mayor grado de apoptosis, forman vesículas y finalmente cambian su fenotipo de células musculares lisas de la pared arterial a células de tipo osteoblasto, induciendo formación de matriz y también atrayendo factores locales determinantes del proceso de mineralización ³. El proceso de calcificación vascular, además, cursa con una bajada de los inhibidores de la calcificación, lo que favorece este proceso de diferenciación adaptativa (Figura 1).

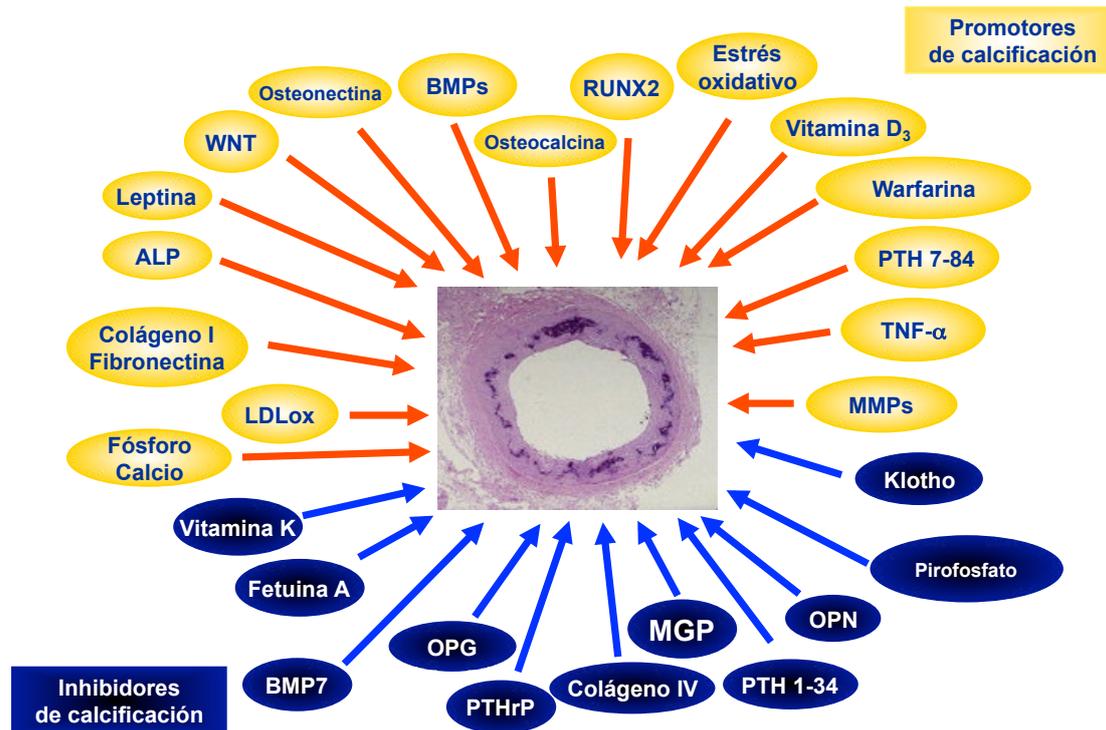


Figura 1: Promotores e inhibidores de la calcificación vascular. Adaptado de Cannata-Andía *et al*⁴.

1.1.1 Promotores de la calcificación vascular.

La hipercalcemia y la hiperfosfatemia son factores asociados con un incremento de calcificación vascular y morbi-mortalidad cardiovascular en población general⁵. Concentraciones dentro del rango fisiológico de metabolitos activos de vitamina D se han relacionado con efectos beneficiosos en la homeostasis mineral⁶, mientras que dosis altas de metabolitos activos de vitamina D se han asociado experimentalmente con un incremento de la calcificación vascular⁷. Dilucidar las bases moleculares de la calcificación humana presenta ciertas dificultades, dado que existen diferencias funcionales con respecto a lo descrito en modelos de experimentación animal.

1.1.1.1 Calcio y fósforo.

El calcio, además de ser el principal componente del hueso, es necesario para procesos fisiológicos como la contracción muscular, las señales neuronales y la coagulación sanguínea. Su homeostasis está regulada por las hormonas paratiroidea (PTH), calcitonina y vitamina D, entre otros factores.

El fósforo, además de ser un elemento mineral extracelular que colabora con el calcio en la mineralización de la matriz del hueso; también es un factor importante en los mecanismos de señalización de las CMLV⁸, aunque su función como activador de vías de señalización intracelulares permanece poco clara. Puede incorporarse a las células a través de un canal específico dependiente de sodio llamado Pit-1; de hecho, al interferir la expresión de Pit-1 se previene la calcificación vascular *in vitro* mediada por un exceso de fósforo en el medio de cultivo⁹. Otros modelos de calcificación vascular *in vitro* han mostrado que niveles elevados de fósforo pueden actuar directamente en la transcripción de genes relacionados con el hueso, como el factor de transcripción 2 relacionado con Runt (RUNX2) y la osteocalcina, activando varias vías osteogénicas en las CMLV y dando lugar al cambio fenotípico^{10,11}. Además, en ratas con insuficiencia renal crónica alimentadas con una dieta con altos niveles de fósforo, se han observado incrementos en la expresión de Pit-1 y de RUNX2 en las CMLV de las arterias calcificadas¹². El factor RUNX2 promueve la expresión de las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), una familia de proteínas implicadas en la formación ósea y en la calcificación vascular^{13,14}.

1.1.1.2 Vitamina D.

Tradicionalmente usada para el tratamiento y prevención del raquitismo y de la osteomalacia, ejerce su principal efecto fisiológico sobre la homeostasis del calcio y del fósforo. Se hidroxila en el riñón por acción de la 25-hidroxivitamina D-1 α hidroxilasa dando lugar a 1,25(OH) $_2$ D o calcitriol, que es el metabolito más activo ¹⁵. Profundizando en los mecanismos propios de la calcificación vascular provocada por calcitriol, se describió que, a altas concentraciones, induce un incremento de la calcificación dependiente de la concentración en CMLV *in vitro*, acompañado de un incremento de la carga de calcio ¹⁶, de la actividad fosfatasa alcalina y una regulación a la baja del péptido relacionado con la PTH (PTHrP) ⁷. Estudios posteriores confirmaron el efecto promotor de la calcificación del calcitriol al aumentar el depósito de calcio en la aorta de ratas con función renal normal ¹⁷ y al incrementar los niveles de ARN mensajero (ARNm) de las proteínas óseas RUNX2, osteocalcina, osteoprotegerina, ligando del receptor activador de NF κ B (RANKL) y BMP4 en la aorta de ratas nefrectomizadas ^{18,19}.

1.1.1.3 Estrés oxidativo.

Las enzimas que regulan el estrés oxidativo constituyen una serie de sistemas acoplados encargados de la depuración de especies reactivas de oxígeno como el ión superóxido (O $_2^-$) o el peróxido de hidrógeno (H $_2$ O $_2$). El aumento de estas especies y ciertas modificaciones en los niveles y actividad de diversas enzimas relacionadas con el estrés oxidativo se han relacionado con el aumento del potencial de membrana mitocondrial y la activación de las vías de osificación de BMP2 y Wnt con la subsiguiente expresión de genes osteogénicos y calcificación vascular ²⁰. El hecho de que las CMLV cultivadas

con H₂O₂ presenten calcificación, a través de la estimulación directa de RUNX2 con un aumento en los niveles de NAD(P)H oxidasa ²¹, induce a pensar que el desequilibrio en los sistemas propios del estrés oxidativo puede actuar como un promotor de la calcificación vascular.

1.1.2 Inhibidores de la calcificación vascular.

Estudios en proteínas de la matriz extracelular han sugerido que la calcificación extraósea se produce por un defecto de sus inhibidores, y que su inhibición es un proceso activo. Dentro de los inhibidores de la calcificación vascular se encuentran la proteína Gla de la matriz (MGP, que requiere vitamina K para activarse), los pirofosfatos y la osteoprotegerina, entre otros ⁴.

1.1.2.1 Proteína Gla de la Matriz.

La MGP es una proteína producida en multitud de tejidos, entre ellos arterias, huesos y cartílagos. Se secreta al medio extracelular y sufre fundamentalmente dos tipos de modificaciones postraduccionales: tres fosforilaciones y cinco γ -carboxilaciones dependientes de vitamina K ²². Las primeras evidencias de la función inhibidora de dicha proteína se describieron con el ratón mutante nulo MGP^{-/-}, que mostró calcificaciones en todo el árbol arterial y osteopenia. Los ratones que no expresaban MGP presentaban un reducido tamaño y un fallecimiento prematuro por rotura de la aorta calcificada ²³. Por tanto, el ratón MGP^{-/-} demuestra que la inhibición de la calcificación requiere la expresión de un producto génico específico en las arterias, en el cartílago y en el hueso, sugiriendo que la calcificación es un proceso ubicuo ²³. De hecho, se ha conseguido evitar la calcificación vascular

de dichos ratones mediante la sobreexpresión de MGP en células del músculo liso²⁴. Por otra parte, cuando son los osteoblastos los que expresan al alza la MGP, disminuye la mineralización en el cráneo y en las vértebras, aumentando la cantidad de osteoide sin mineralizar (osteoidosis)²⁴. Los ratones MGP^{-/-}, además, muestran una pérdida de marcadores musculares en las CMLV, con un aumento en la expresión del RUNX2 y de la osteopontina (OPN)¹¹.

También se observó que el tratamiento de ratas con un antagonista de la vitamina K (warfarina) provoca una extensa calcificación del cartílago, provocando un crecimiento anormal del animal²⁵. Al ser necesaria la γ -carboxilación de sus residuos de ácido glutámico, la warfarina y otros inhibidores de dicha reacción promueven la calcificación al no permitir la activación de la MGP²⁶. Estudios en los que se encuentra menor expresión de MGP en las arterias de pacientes diabéticos con calcificación en la capa media muscular apoyan esta teoría²⁷. Otros estudios en familias han mostrado que la expresión de una MGP no funcional, debido a mutaciones sin sentido, origina el síndrome de Keutel, y es también causa de extensas calcificaciones extraóseas²⁸.

El mecanismo preciso por el cual la MGP inhibe la calcificación vascular se desconoce, pero se han sugerido varias posibilidades. En algunos estudios se ha descrito que la MGP se une a los cristales de hidroxapatita impidiendo su crecimiento²⁶. También se ha observado que la MGP es capaz de inhibir la diferenciación fenotípica de las CMLV a células de tipo osteoblasto²⁹, debido a que es capaz de unirse a la BMP2 e inhibir su actividad promotora de la calcificación³⁰. Sin embargo, la MGP también es

capaz de unirse e inhibir a la BMP4, la cual es necesaria para la formación del árbol vascular³¹.

1.1.2.2 Vitamina K.

La vitamina K actúa como un cofactor de la carboxilación postraducciona de los residuos glutamato (Glu) a residuos de ácido glutámico γ -carboxilados (Gla). Los residuos Gla fueron inicialmente identificados en protrombina y factores de coagulación, pero posteriormente se describieron otras proteínas Gla óseas, como la osteocalcina y la MGP. La no activación de la MGP, debido a una carboxilación incompleta, conlleva un aumento del riesgo de desarrollar calcificación vascular. Este hecho, junto con una deficiencia alimentaria de vitamina K, podría dar lugar a un efecto no deseado en el tratamiento con anticoagulantes cumarínicos como la warfarina. Otras proteínas de la familia Gla se pueden ver afectadas, como la proteína específica de parada del crecimiento (Gas6), activadora del eje Gas/Axl/Pi3K/AKT, implicado en la inhibición de la apoptosis y liberación de vesículas en el proceso de calcificación vascular³². Cabe destacar que siguen apareciendo proteínas implicadas en este proceso, como la recientemente identificada proteína rica en Gla (GRP), aunque su función aún no ha sido detallada³³. En individuos sanos, la circulación de fracciones sustanciales de osteocalcina y MGP sin carboxilar indican un déficit en vitamina K, cuya suplementación podría prevenir las alteraciones vasculares en la población general, al igual que en pacientes bajo tratamiento anticoagulante, en los que ofrecería protección contra los efectos secundarios derivados del uso de los anticoagulantes cumarínicos³⁴.

1.1.2.3 Pirofosfato.

El pirofosfato es una molécula ubicua del entorno extracelular que inhibe la calcificación al impedir la formación de depósitos de fosfato cálcico, bloqueando la formación de cristales de hidroxiapatita ³⁵. Varios estudios han descrito la importancia del pirofosfato y del metabolismo del fosfato en la calcificación arterial. La ecto-nucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 1 (NPP1), codificada por el gen *ENPP1*, es la enzima que convierte los nucleótidos 5'-trifosfato extracelulares en sus correspondientes nucleótidos 5'-monofosfato y genera pirofosfato. En ratones, una NPP1 truncada conlleva una osificación de los ligamentos espinales ³⁶. Se ha descrito que las mutaciones del gen *ENPP1* son responsables de la calcificación arterial idiopática de la infancia ³⁷. La calcificación también se produce cuando la fosfatasa alcalina digiere el pirofosfato, aún en presencia de otros inhibidores de la calcificación como la OPN, dado que la calcificación no está aumentada en los cultivos primarios obtenidos de la aorta de ratones mutantes nulos para este gen ³⁸. Se ha observado que la administración sistémica del pirofosfato previene y reduce la calcificación vascular asociada con la uremia, sin consecuencias aparentes para el hueso y sin depósitos de pirofosfato cálcico ³⁹. En la actualidad, existen nuevas opciones terapéuticas que pueden tener utilidad en la prevención de la aparición de calcificación vascular. En modelos de cultivo celular, la inducción de la calcificación por fósforo se previene con el uso de bisfosfonatos y del ácido fosfonofórmico, un inhibidor competitivo de transportadores de membrana de fósforo ⁴⁰. De manera similar, los bisfosfonatos han mostrado también su capacidad de inhibir la calcificación vascular inducida por la vitamina D en ratas ⁴¹.

1.2 Relación entre calcificación vascular y pérdida de masa ósea.

Los estudios epidemiológicos realizados en la población general han mostrado una relación entre la calcificación vascular y la alteración ósea ⁴². En el estudio Framingham, la pérdida ósea cortical en las mujeres se asoció con la progresión de la calcificación aórtica abdominal ⁴³. Además, un estudio en mujeres posmenopáusicas reveló que la calcificación aórtica representa un potente factor de riesgo para una baja densidad mineral ósea (DMO) y fracturas por fragilidad ⁴⁴. Otro estudio prospectivo, también en mujeres posmenopáusicas, demostró que la presencia de calcificación aórtica se asociaba de forma significativa con baja DMO y con una pérdida rápida de masa ósea en el fémur proximal ⁴⁵. Además, los datos clínicos revelan que el paciente hospitalizado por fracturas osteoporóticas sufre de eventos cardiovasculares, como infarto agudo de miocardio o accidente cerebrovascular ⁴⁶ y la baja masa ósea en la menopausia ha mostrado ser un factor de riesgo para un mayor incremento de eventos cerebro-vasculares ⁴⁷.

La calcificación vascular y la osteoporosis están determinadas por factores de riesgo comunes como el envejecimiento ⁴⁸, el estado de menopausia ^{49,50}, la diabetes ⁵¹, la dislipemia ⁵², el hábito tabáquico ⁵³, el alcohol, el déficit de estrógenos y de las vitaminas D y K ⁵⁴. Todos estos factores de riesgo convergen, culminando en los mecanismos finales de inflamación ⁵⁵ y de respuesta al estrés oxidativo ^{56,57}.

La pérdida de DMO es consecuencia del desequilibrio entre la resorción y la formación ósea. Un aumento en la resorción podría traducirse en una secreción de factores reguladores desde la matriz ósea, entre los que

se incluyen el calcio y el fósforo, los cuales desempeñan un papel importante en la modulación fenotípica de las CMLV. Igualmente, los trabajos a nivel experimental han permitido establecer similitudes entre la formación ósea y la mineralización en el proceso de calcificación vascular ^{58,59}. El proceso de calcificación conlleva la diferenciación de las CMLV a células tipo osteoblasto, lo que conlleva la posterior mineralización ⁶⁰. En este proceso participan, entre otros, la inflamación y los acúmulos de especies reactivas de oxígeno, factores capaces de promover el cambio hacia fenotipo óseo mediante la activación de las vías de osificación de BMP2 y Wnt ²⁰. Esta activación permite la entrada al núcleo de la β -catenina y regula al alza la expresión de RUNX2, Osterix (SP7), MSX2 y fosfatasa alcalina (ALP), promotores de la diferenciación osteogénica. Paralelamente, la apoptosis de las CMLV se asocia con el inicio de la calcificación vascular, al provocar la secreción de vesículas que concentran los cristales de hidroxapatita ⁶¹.

1.3 Aspectos genéticos relacionados con calcificación vascular.

Se ha determinado que entre el 40 y el 50% de la variación en la calcificación aórtica o coronaria puede ser atribuida a la constitución genética del individuo ⁶². Un estudio en 698 adultos, sanos, originarios de 302 familias, estimó que el 42% de la variación en la calcificación de las arterias coronarias puede ser atribuida a factores genéticos, tras realizar un ajuste por factores de riesgo comunes como la edad, el sexo, la diabetes, la presión sistólica, el hábito tabáquico y el colesterol transportado por la lipoproteína de baja densidad (LDL) ⁶³.

El estudio de las variantes génicas, bien sean mutaciones o polimorfismos presentes en los genes de las diferentes proteínas implicadas en los trastornos del metabolismo óseo y mineral, podría colaborar a mejorar su entendimiento. Los polimorfismos son variaciones en la secuencia del genoma que existen con relativa frecuencia en la población y diferencian a unos individuos de otros. Polimorfismos en algunos genes se han asociado con la susceptibilidad a padecer enfermedades, con diferencias en las manifestaciones clínicas de las mismas y/o con diferencias en la respuesta a los tratamientos. Existen diferentes tipos de polimorfismos genéticos: el cambio de un único nucleótido en la secuencia de ADN (SNP), la ganancia (inserción) o la pérdida (delección) de un fragmento de número variable de nucleótidos (I/D) y la variación en el número de repeticiones en tándem de un número variable de nucleótidos (VNTR).

Entre los genes en los que se han descrito variantes que pueden afectar a la calcificación, se incluyen algunos pertenecientes a las vías mencionadas previamente, como la *BMP2*, la proteína 5 relacionada con el receptor de LDL (*LRP5*), la metaloproteasa de la matriz 1 (*MMP1*) y la *MGP*, los cuales se detallarán a continuación.

Las BMP1 a 7 están presentes en el tejido óseo y pueden presentar propiedades osteoinductivas⁶⁴. Mientras que un estudio previo mostró una asociación entre la región cromosómica 20p12, donde se sitúa el gen *BMP2*, con osteoporosis⁶⁵, el estudio Rotterdam no reveló asociación entre los polimorfismos Ser37Ala ni Arg190Ser de *BMP2* y la osteoporosis⁶⁶. Se ha descrito la asociación entre dos SNPs de *BMP7*, uno con calcificación de las arterias coronarias y carótidas y otro con menor masa ósea en la columna

torácica, en la columna lumbar y en la cadera ⁶⁷, mostrando que las BMPs pueden ejercer un papel tanto en la calcificación vascular como en la mineralización ósea.

La formación de hueso también se regula por la vía de señalización de Wnt. Mutaciones de ganancia de función del co-receptor LRP5 se asocian con un fenotipo de masa ósea alta ⁶⁸. Sin embargo, mutaciones de pérdida de función de la misma proteína originan el síndrome autosómico recesivo de osteoporosis-pseudoglioma ⁶⁹. Además, se ha descrito la asociación entre los polimorfismos Val667Met y Ala1330Val de *LRP5* y menores niveles de DMO, fenotipo similar al de las mutaciones de pérdida de función del receptor ^{70,71}.

Las metaloproteasas de la matriz (MMPs) son una familia de enzimas que participan en el desarrollo embrionario y el remodelado tisular, así como en procesos patológicos, como la artritis ⁷². Las MMPs que degradan el colágeno tipo I juegan un papel crítico en el remodelado fisiológico del hueso y otros tejidos conectivos. En el hueso, la MMP1 es secretada por los fibroblastos del estroma, los osteoblastos y los osteoclastos ⁷³. Se ha descrito una relación inversa entre la expresión de MMP1 y la diferenciación a osteoblasto ^{74,75}. La inhibición de su actividad en cultivo *in vitro* da lugar a un aumento de los marcadores osteoblásticos RUNX2 y osteocalcina, sugiriendo que una inhibición de su actividad se asocia con la formación ósea. Sin embargo, la inhibición de la actividad metaloproteasa se asoció con una menor calcificación vascular, tanto *in vitro* como *in vivo* ⁷⁶, sugiriendo que su actividad es específica de tejido.

El gen *MGP* se expresa en todos los tejidos analizados en vertebrados, con los niveles más altos en arterias, hueso, cartílago, pulmón,

corazón y riñón ⁷⁷. Mutaciones en el gen *MGP* causan el síndrome de Keutel, una alteración autosómica recesiva caracterizada por extensas calcificaciones extraóseas. El análisis mutacional en tres casos no relacionados identificó tres mutaciones que codifican una *MGP* no funcional, confirmando su efecto en la regulación de la calcificación de la matriz extracelular ²⁸. Una repetición microsatélite en el promotor del gen *MGP* se ha asociado con variaciones en la DMO ⁷⁸. Por otra parte, los polimorfismos -7G>A y Thr83Ala de *MGP* se asociaron con un mayor riesgo de calcificación de la placa aterosclerótica y con mayor riesgo de infarto de miocardio ⁷⁹. Además, los polimorfismos -138T>C y -7G>A se asociaron con infarto de miocardio en la insuficiencia renal crónica a causa de la calcificación arterial coronaria ⁸⁰.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:

2.1 Hipótesis de trabajo.

Las bases moleculares que regulan la calcificación vascular aún no han sido completamente identificadas. El hecho de que sólo la matriz extracelular del hueso mineralice bajo condiciones fisiológicas induce a pensar que la calcificación de los vasos es un proceso activo similar al del hueso, determinado por los cambios en la expresión de proteínas específicas.

Las variantes genéticas en las regiones promotoras o en los exones de los genes pueden alterar los niveles de expresión o la estructura de la proteína, respectivamente. Esto hace que pueda variar su función y afectar a los procesos en los que está involucrada dicha proteína. Polimorfismos en genes de proteínas inhibidoras de la calcificación, pueden determinar un aumento del riesgo de presentar calcificaciones aórticas o pérdidas en DMO. De manera similar, polimorfismos en genes de proteínas inductoras de la formación de hueso podrían desencadenar una formación ósea desequilibrada, viéndose reflejado en la DMO o en la presencia de depósitos de calcio en los vasos.

El estudio funcional de los polimorfismos asociados con la presencia o progresión de la calcificación vascular o con la pérdida de DMO puede profundizar en la comprensión de la relación entre dichas alteraciones previamente observada en estudios epidemiológicos y experimentales.

Por otra parte, el exceso de vitamina D, junto con un aumento en la concentración de calcio y de fósforo, puede modular la expresión génica en las CMLV. La identificación del perfil de expresión diferencial de las proteínas involucradas en el cambio fenotípico que se produce en la calcificación

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

vascular *in vitro* puede contribuir al conocimiento del proceso que lleva a las CMLV a diferenciarse a células tipo osteoblasto.

2.2 Objetivos:

1. Determinar las frecuencias de polimorfismos de los genes *BMP2*, *LRP5*, *MMP1* y *MGP* en la población general.

2. Analizar la posible asociación entre dichos polimorfismos y la prevalencia o progresión de la calcificación aórtica y la DMO o su tasa de cambio.

3. Realizar estudios funcionales *in vitro* de los polimorfismos en los que se encuentre asociación, en modelos celulares vasculares y óseos.
 - Estudios de luciferasa para polimorfismos situados en la región reguladora.
 - Estudios de expresión para polimorfismos en la región codificante.

4. Caracterizar el perfil diferencial de expresión proteica en modelos de calcificación de células vasculares *in vitro*.
 - Mediante un exceso de vitamina D.
 - Mediante un aumento en las concentraciones de calcio y de fósforo.

3. SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS:

3.1 Caracterización de la población EVOS / EPOS.

La muestra que participó en el estudio se seleccionó de forma aleatoria del padrón municipal de Oviedo del año 1986, con el único requisito de ser mayores de 50 años, siguiendo las directrices del *European Vertebral Osteoporosis Study / European Prospective Osteoporosis Study* (EVOS / EPOS), estudio multicéntrico en el cual participaron 17.342 personas, de 36 centros correspondientes a 19 países europeos, con el objetivo de conocer la prevalencia de la fractura vertebral en Europa ⁸¹. La selección de la muestra fue realizada por el Servicio de Informática del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), utilizando tablas de números aleatorios. A todos los individuos se les envió una carta personalizada para invitarles a participar en un estudio europeo sobre osteoporosis.

Un total de 624 personas (308 mujeres y 316 hombres) aceptaron participar en dicho estudio. A partir de dos evaluaciones transversales realizadas con un lapso de 4 años, se obtuvieron datos de 305 personas (150 mujeres y 155 hombres). En una primera evaluación se realizaron medidas antropométricas y un cuestionario de factores de riesgo de enfermedades óseas, de acuerdo con el protocolo general del estudio EVOS / EPOS. El análisis densitométrico de la columna lumbar, del cuello del fémur y de la cadera total y el análisis radiológico de la columna vertebral a nivel dorsal y lumbar se llevaron a cabo en la primera y en la segunda evaluación a los 4 años ⁸². En la segunda visita se llevó a cabo la extracción de sangre para obtener el ADN genómico.

3.1.1 Antropometría.

La talla se determinó mediante un estadiómetro digital tipo Harpenden (Holtain® Ltd) y el peso mediante una báscula clínica (Seca®). El índice de masa corporal (IMC) se determinó dividiendo el peso del individuo (kg) entre el cuadrado de la altura (m²).

3.1.2 Cuestionario de factores de riesgo.

Se recogieron variables tales como: la fecha de nacimiento, el sexo, los antecedentes de riesgo (hábito tabáquico) y si habían tenido fracturas vertebrales o periféricas. En el caso de las mujeres, además, la edad de la menarquia, la edad de la menopausia, el número de partos, la lactancia... El cuestionario se realizó siempre por el mismo encuestador ⁸³.

3.1.3 Densitometría ósea.

En la primera evaluación y a los 4 años, la determinación de la DMO se realizó mediante un densitómetro radiológico digital de doble energía QDR 1000® (Hologic Inc) en el Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral del HUCA. El estudio densitométrico se llevó a cabo siguiendo normas predefinidas. Se excluyeron del estudio aquellos sujetos con marcada osteoartritis (n=9). En todos los casos se realizó, en la cadera derecha, la exploración del cuello del fémur y de la cadera total, con unos coeficientes de variación del 1,9 y del 0,6%, respectivamente ⁸⁴. Sin embargo, la DMO lumbar no se analizó por la influencia que la calcificación aórtica puede tener en su determinación. La tasa de cambio de DMO en el cuello del fémur y en la cadera después de 4 años se calculó restando los valores de DMO ósea obtenidos en la primera determinación de los obtenidos en la segunda, divididos por los de la primera

y multiplicado por 100 para expresarlo como porcentaje. Se consideró la tasa de cambio de masa ósea negativa como una pérdida de DMO. En el caso del estudio de haplotipos, teniendo en cuenta que el programa THESIAS solo utiliza variables dependientes cualitativas, se consideró transformar una tasa de cambio de masa ósea negativa en el valor 1 y una tasa de cambio de masa ósea nula o positiva como valor 0.

3.1.4 Evaluación de la calcificación aórtica.

Para evaluar la presencia de calcificación aórtica se realizaron dos radiografías laterales centradas en las vértebras dorsal 7 y lumbar 2, utilizando idéntica metodología. Todas las radiografías se realizaron con el paciente en decúbito lateral, con las piernas semiflexionadas y utilizando diversas almohadillas de apoyo para garantizar el adecuado posicionamiento del sujeto. Tras 4 años se repitió la evaluación radiológica.

Dos observadores independientes, mediante un diseño ciego, determinaron la presencia de calcificación aórtica como cualquier calcificación observada en el territorio de la aorta. Las calcificaciones se dividieron según su severidad en:

- Grado 0: no existían calcificaciones.
- Grado 1 (leves-moderadas): cuando existían varias calcificaciones puntiformes aisladas o cuando existía una calcificación lineal visible en extensión menor de dos cuerpos vertebrales o una placa densa o varias poco densas.

- Grado 2 (severas): cuando se observó una calcificación lineal de extensión igual o mayor a dos cuerpos vertebrales y/o dos o más placas densas.

La progresión de la calcificación aórtica se determinó comparando las radiografías obtenidas de forma basal y a los 4 años, usando el mismo protocolo. Se consideró progresión de calcificación en dos circunstancias:

- Al aparecer una nueva calcificación o,
- Si el grado de severidad de la calcificación se incrementaba en la segunda radiografía.

3.1.5 Extracción de ADN genómico.

Las muestras de ADN para la caracterización genética de los individuos se obtuvieron a partir de sangre periférica recogida en un tubo con EDTA. Para extraer el ADN se utilizó el método de la precipitación salina modificado ⁸⁵. El ADN se conservó congelado a -20°C o alicuotado para su uso a 4°C.

3.2 Análisis de genotipos.

A partir del ADN genómico, se caracterizó el genotipo de 296 individuos para los polimorfismos rs2273073 Ser37Ala del gen *BMP2* (20p12), rs4988321 Ala667Met del gen *LRP5* (11q13.4) y rs11292517 -1607 1G>2G del gen *MMP1* (11q22-q23). Además, se seleccionaron tres SNPs del gen *MGP* (12p13.1-p12.3): rs1800802, localizado en la posición -194T>C del promotor contando desde el ATG (también nombrado -138T>C); rs1800801, localizado en la región 5' no traducida en la posición c.-63G>A (también nombrado -7G>A); y rs4236, localizado en el exón 4, que produce un cambio

no sinónimo de treonina (ACC) por alanina (GCC) en el aminoácido p.Thr102Ala considerando la secuencia de la proteína completa con el péptido señal (también nombrado Thr83Ala).

Para la amplificación de los fragmentos de ADN, conteniendo los distintos polimorfismos, se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ⁸⁶. Se diseñaron parejas de cebadores basándose en las secuencias depositadas en *GenBank* con números de acceso NG_023233.1 (*BMP2*), NG_015835.1 (*LRP5*), AJ002550.1 (*MMP1*) y M55270.1 (*MGP*).

Tabla 1: Parejas de oligonucleótidos usadas en las PCRs para el estudio de los polimorfismos. Se muestran subrayadas las bases desapareadas, la temperatura de anillamiento (T_a), el tamaño de los productos de la PCR en pares de bases (pb), las enzimas de restricción utilizadas y el tamaño de los fragmentos obtenidos según el alelo presente. F=*Forward* (sentido), R=*Reverse* (antisentido).

SNPs	Oligonucleotidos	Ta	Producto	Encima	Fragmentos
Ser37Ala <i>BMP2</i>	F:CCGCAGGAAGTTCGCGGCG <u>A</u> R:CGGGTGAGCCCCGGCTGAC	63°	220 pb	<i>HaeIII</i>	G: 220 pb T: 197 pb
Val667Met <i>LRP5</i>	F: GTGTGCGGACAGGAACGGGG R: CACGCCCGTGAGCGGGATGGCG	66°	205 pb	<i>AatII</i>	A: 205 pb G: 190 pb
-1607 1G>2G <i>MMP1</i>	F:AAGTGTTCTTTGGTCTCTGC R:GGATTGATTTGAGATAAGTCAGATC	58°	209 pb	<i>BglII</i>	2G: 209 pb 1G: 176 pb
-138 T>C <i>MGP</i>	F:GGTAGATCATGTGTTTGTGGC R:GCATTGGAACTTTTCCCA <u>CC</u>	60°	195 pb	<i>BsrI</i>	C: 195 pb T: 175 pb
-7 G>A <i>MGP</i>	F:CAGTCAGGTCCAGCAGTTAGG R:CAGTAGGGAGAGAGGCTCC <u>CA</u>	61°	217 pb	<i>NcoI</i>	G: 217 pb A: 197 pb
Thr83Ala <i>MGP</i>	F:CCTGTCCACGAGCTCAATAGGG R:GCTGCTACAGGGGGATACAAAA	56°	195 pb	<i>HaeIII</i>	A: 195 pb G: 115+70 pb

Todas las reacciones fueron llevadas a cabo con la ADN polimerasa *Taq* (Biotools), con una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato a una concentración final de 200 μ M, los cebadores adecuados a una concentración final de 1 μ M y una concentración de 2 mM de $MgCl_2$, en un termociclador MyCycler (Bio-Rad). Se llevó a cabo una desnaturalización previa a la reacción de amplificación a 95°C durante 3 min. La reacción de amplificación consistió en una desnaturalización a 95°C durante 30 s, anillado de los oligonucleótidos a temperatura adecuada (Tabla 1) durante 30 s y extensión a 72°C durante 30 s. Estos tres pasos se repitieron durante 32 ciclos. Los productos de amplificación de la PCR fueron comprobados en geles al 2% de agarosa y visualizados con SYBR® Safe (Invitrogen™) con transiluminación ultravioleta. Los alelos de los productos de amplificación fueron distinguidos mediante polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) separados en un gel al 4% de agarosa (Figura 2). Las enzimas utilizadas (New England Biolabs®) se detallan en la Tabla 1, así como los tamaños obtenidos para los distintos alelos.

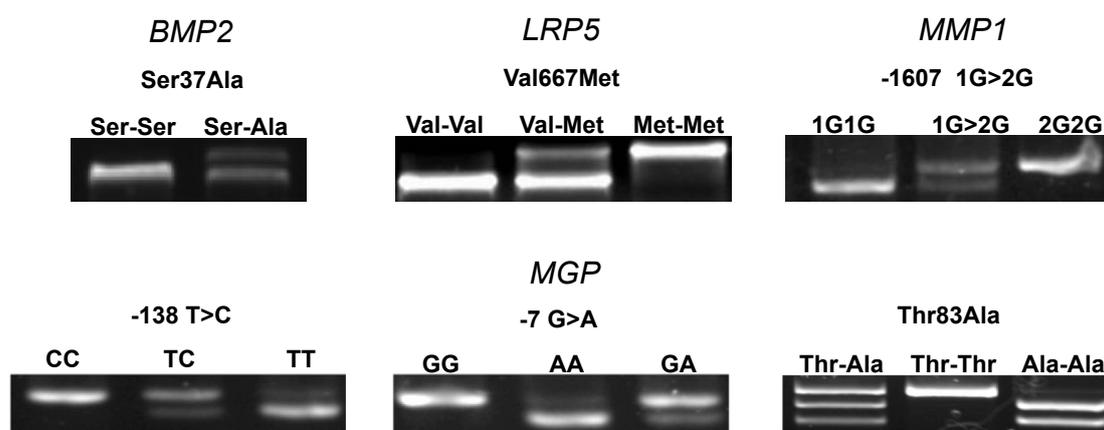


Figura 2: Patrón electroforético de los fragmentos de restricción obtenidos en la digestión de los productos de las PCRs conteniendo los polimorfismos estudiados.

3.2.1 Análisis de haplotipos.

Para analizar el desequilibrio de ligamiento entre polimorfismos se utilizó el programa SHEsis (<http://www.analysis.bio-x.cn/SHEsisMain.htm>)⁸⁷ que permite calcular el coeficiente de desequilibrio (D'). El análisis de haplotipos se llevó a cabo con el programa THESIAS basado en el algoritmo SEM (<http://www.geneconvas.org>)⁸⁸. Se estimaron las frecuencias haplotípicas para los SNPs -138T>C, -7G>A y Thr83Ala del gen *MGP* y los efectos haplotípicos estimados al comparar con el haplotipo de referencia que corresponde al más frecuente en la población, tras ajuste por variables de confusión.

3.3 Análisis informático de secuencias.

El alineamiento entre las secuencias del gen *MGP* entre *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* y otras especies de mamíferos se llevó a cabo con el programa de alineación múltiple de secuencias Clustal W⁸⁹. El alineamiento entre las secuencias proteicas de las distintas especies se analizó mediante la herramienta del NCBI *Homologene Database* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/HomoloGene/>).

Se evaluaron los posibles sitios de unión de factores de transcripción en la región promotora del gen *MGP* mediante dos programas predictivos: MatInspector de GENOMATIX⁹⁰, con el límite umbral en 0,75; y TFSEARCH⁹¹, con un umbral de aceptación en 85.

Las posibles islas CpG de metilación se analizaron mediante el programa Methylator (<http://bio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/Methylator/main.pl>).

La predicción de la estructura secundaria del ARNm se realizó mediante el programa Mfold (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>)⁹² y el plegamiento de la proteína mediante I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)⁹³.

3.4 Construcción de plásmidos.

Para los ensayos reporteros de actividad luciferasa, se amplificaron los dos alelos A y G del polimorfismo MGP -7G>A dentro de un fragmento del promotor del gen *MGP* humano (NM_000900.2) de 306 pares de bases, desde la posición -330 a -24, contando desde el ATG iniciador de la traducción. Se utilizó la ADN polimerasa *Accuzyme*[™] (Bioline) y la siguiente pareja de cebadores: F: 5'- GCT TTT GCC CAG GTC TGT CC -3' y R: 5'- CAG GGT CTT GTG TAG CAG CAG TAG -3'. Como molde, se usó el ADN genómico de un participante del estudio EVOS / EPOS con la secuencia de referencia en la posición -138 (homocigoto TT) y heterocigoto para el polimorfismo -7 (GA). Para obtener los dos clones con ambos alelos (pGL3MGP-7G y pGL3MGP-7A), se clonaron los productos de PCR con el *Zero Blunt PCR Cloning kit* (Invitrogen[™]) y se confirmaron mediante secuenciación. A partir de los clones con la secuencia correcta, se extrajeron los insertos con las enzimas de restricción *KpnI* y *HindIII* y se ligaron en los mismos puntos de corte del vector pGL3 Basic (Promega), que contiene el gen reportero de la luciferasa.

3.4.1 Mutagénesis dirigida.

Se clonaron las dos variantes del ADN copia (ADNc) del gen *MGP* humano para el polimorfismo Thr83Ala. La variante con el alelo 83Ala se

obtuvo del clon IRAUp969D1042D (ImaGenes™) y se extrajo mediante digestión con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* para su clonación en los mismos puntos de corte del vector de expresión en células eucariotas pcDNA3 (Invitrogen™). Para crear el alelo 83Thr se realizó la mutagénesis dirigida con el kit *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis* (Agilent Technologies Inc) usando la siguiente pareja complementaria de cebadores: F: 5'-GAA GCG CCG AGG GAC CAA ATG AGA CTG AG -3' y R: 5'-CTC AGT CTC ATT IGG TCC CTC GGC GCT TC -3' (el nucleótido que introduce el cambio está subrayado) y utilizando como molde el vector pcDNA3-MGP83Ala para obtener la construcción pcDNA3-MGP83Thr.

3.5 Cultivo celular.

Las líneas celulares de osteosarcoma de rata UMR106-01 (CRL-1661) y de células vasculares de músculo liso A7r5 (CRL-1444), ambas de la *American Type Culture Collection* (ATCC®), fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ en *Dulbecco's Modified Eagle Medium* DMEM (Lonza) con 10% de suero fetal bovino (FBS) (HyClone® Thermo Scientific), penicilina 100 UI/mL, estreptomycin 100 µg/mL y glutamina 2 mM (Biochrom AG).

3.5.1 Transfección transitoria.

El día antes de la transfección se sembraron las células en placas de 24 pocillos a una concentración de 40.000 (UMR106-01) o 20.000 (A7r5) células por pocillo. Siguiendo el protocolo especificado, las transfecciones transitorias de las construcciones se llevaron a cabo con Fugene HD (Promega). Se co-transfectó el plásmido reportero pRL-TK (Promega) que

expresa la luciferasa de *Renilla*, como control interno de la transfección. Se expusieron las células a un medio de transfección que contenía 0,8 µg de las construcciones (pGL3 Basic, pGL3MGP-7G, pGL3MGP-7A y 0,1 µg de pRL-TK, o pcDNA3, pcDNA3-MGP83Thr y pcDNA3-MGP83Ala) y una ratio 3:1 de Eugene HD:ADN. Tras los tratamientos apropiados, las células se recogieron a la 48h para extraer ARNm o proteínas.

3.6 Medida de actividad luciferasa.

Para medir la actividad luciferasa generada por las distintas construcciones (pGL3 Basic, pGL3MGP-7G, pGL3MGP-7A), se recogieron las células en *Passive Lysis Buffer* (PLB) y los extractos se ensayaron con *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega) en el luminómetro FB12 (Berthold Detection Systems). La actividad del promotor de la MGP se calculó como la ratio entre la actividad luciferasa generada por las construcciones pGL3 Basic, pGL3MGP-7G, pGL3MGP-7A divididas por la actividad de *Renilla*. Los datos se obtuvieron de cinco experimentos en cada línea celular, en los cuales se realizaron transfecciones por duplicado para cada construcción.

3.7 Modelos de calcificación vascular in vitro.

Alcanzada la confluencia necesaria, se cambió el medio de cultivo por DMEM F-12 suplementado con 0,1% de albúmina sérica bovina (BSA). En las células vasculares transfectadas con las construcciones pcDNA3, pcDNA3-MGP83Thr y pcDNA3-MGP83Ala, se promovió la calcificación cultivándolas en medio suplementado con 0,1% BSA y con concentraciones finales de 2 mM calcio y 3 mM fósforo (CaPi) durante 4 días. De la misma forma se

promovió la calcificación en las células vasculares no transfectadas cultivándolas en el medio anterior (CaPi), así como añadiendo 10^{-7} M calcitriol (CaPi+CTR) cada 24h durante los dos últimos días de cultivo. Con el fin de estudiar el efecto individual del calcitriol, éste se añadió diariamente durante diez días. Para estudiar el efecto del ácido fosfonofórmico (PFA) $100 \mu\text{M}$, inhibidor de los transportadores de fósforo tipo II, se añadió β glicerol-fosfato (BGP) 10 mM y calcio $2,5 \text{ mM}$, como inductores de calcificación, durante 4, 6 y 24 horas. En todos los casos, las células también fueron cultivadas con $0,1\%$ de BSA para ser usadas como control negativo de la calcificación. El medio se renovó cada 48 horas.

3.7.1 Detección de mineralización.

3.7.1.1 Tinción con rojo de alizarina.

Para observar los depósitos de fosfato cálcico extracelulares en cada grupo de cultivo, previo lavado con un tampón fosfato salino (PBS), las células se fijaron con formaldehído al 10% durante 45 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, posteriormente se lavaron con agua y se tiñeron con solución de rojo de alizarina al 2% . La evaluación de la tinción y la toma de microfotografías se realizaron con el equipo Olympus CKX-41.

3.7.1.2 Cuantificación del depósito de calcio.

Una vez retirado el medio de cultivo, las células fueron lavadas con PBS. El calcio se extrajo con $0,6 \text{ N}$ de HCl en agitación a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Posteriormente, se realizó una ultracentrifugación a 14.000 g durante 20 minutos a 4°C . En el sobrenadante se determinó el contenido de calcio mediante el método del complejo de la 0-cresolftaleína⁹⁴. El sedimento se

resuspendió en tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, NP-40 1%, deoxicolato sódico 0,5%, EDTA 1 mM y SDS 0,1%) para la cuantificación de la proteína total mediante el método DC (Bio-Rad). La cantidad de calcio se expresó corregida por proteína total ($\mu\text{g Ca/mg proteína}$).

3.8 PCR cuantitativa.

Para la extracción del ARN total se empleó Tri Reagent (Ambion) siguiendo un protocolo estándar. La concentración y pureza del ARN se determinaron con un espectrofotómetro ND-1000 UV-VIS (Nanodrop Technologies) midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm.

A partir de 2 μg de ARN total, se obtuvo el ADNc utilizando el *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para cuantificar la expresión relativa de los genes, se utilizó un termociclador de PCR en tiempo real modelo Stratagene Mx3005P QPCR System (Agilent Technologies) y reactivos Taqman® (Taqman® Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems). Se utilizaron los ensayos correspondientes a los siguientes genes: MGP (Hs00969490_m1), fosfatasa alcalina (ALP) (Rn 01516028_m1), OPN (Rn 00563571_m1), RUNX2 (Rn 01512296_m1), transgelina (SM22) (Rn 00580659_m1) y elastina (ELN) (Rn 01499782_m1). Los resultados se normalizaron frente al gen constitutivo gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Rn 99999916_m1). La interpretación de los datos se realizó mediante la comparación del ciclo umbral ($\Delta\Delta\text{Ct}$)⁹⁵.

3.9 Western blot.

La extracción de las proteínas totales de las células en cultivo se realizó homogeneizando éstas en tampón de lisis RIPA. Se sometieron a ultrasonidos en un baño durante 1 minuto a 4°C y a ultracentrifugación a 14.000 g durante 20 minutos a 4°C. Tras ese período se recogió el sobrenadante que contenía las proteínas de la muestra. La cuantificación se realizó mediante el método estándar de Bradford (Bio-Rad)⁹⁶. Los extractos proteicos ya cuantificados se almacenaron a -70°C hasta su utilización.

De cada extracto proteico, 30 µg se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida de 0,75 mm de grosor en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) junto con marcadores de peso molecular (Rainbow™ Molecular Weight Markers, GE Healthcare). Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Hybond™ P, GE Healthcare) y se llevaron a cabo los *Western Blot* siguiendo un protocolo estándar⁹⁷. Los anticuerpos primarios utilizados fueron, por un lado anti-MGP humana a una dilución 1:500 (ab70193, Abcam), y por otro frente a proteínas de rata anti-RUNX2 1:100 (ab54868, Abcam), anti-SOD2 1:1000 (sc30080, Santa Cruz Biotech) y anti-GAPDH 1:30.000 (sc25778, Santa Cruz Biotech). Los anticuerpos secundarios ligados a peroxidasa específicos para cada anticuerpo primario fueron, frente a ratón (401215; Calbiochem) o frente a conejo (sc 2001; Santa Cruz Biotech). Por último, se llevó a cabo la detección mediante el *ECL Western Blotting Detection kit* (Amersham Biosciences). El revelado se llevó a cabo usando el equipo Chemidoc XRS+ (Bio-Rad). La determinación de la intensidad de las bandas obtenidas en el *Western Blot* se realizó con el programa informático Image Lab (Bio-Rad).

3.10 Electroforesis bidimensional.

La extracción de las proteínas se realizó homogeneizando las células en un tampón de lisis UTC compuesto por urea 7 M, tiourea 2 M y CHAPS 2%. Las proteínas fueron purificadas y desaladas empleando el kit *Ready Prep Clean-up* (Bio-Rad) y cuantificadas mediante el ensayo de Bradford.

El isoelectroenfoque o primera dimensión, se realizó por triplicado con 150 µg de proteína de cada grupo, en tiras de poliacrilamida deshidratada IPG-Strip de 24 cm con un rango de pH 3-10 no lineal. Las tiras se rehidrataron con *DeStreak Rehydration Solution* y con los anfolitos IPG al 0,5% (ambos de GE HealthCare), 24 horas antes del isoelectroenfoque. El isoelectroenfoque, realizado en un Ettan IPGphor3 (GE HealthCare), comenzó con un primer paso a 300 V durante 3 horas, seguido de dos gradientes, el primero hasta 1.000 V durante 6 horas y el segundo hasta 10.000 V durante 3 horas para mantenerse a 10.000 V durante 4 horas y media más. Una vez terminado el isoelectroenfoque, las tiras se lavaron con el tampón de equilibrado (urea 6 M, Tris-HCL 75 mM, glicerol 30% y SDS 2%) con dos lavados de 15 minutos, el primero con dithiothreitol (DTT) 1% y el segundo con iodoacetamida 2,5% para la reducción-alkilación de las proteínas.

La segunda separación se realizó mediante SDS-PAGE en geles al 12% de poliacrilamida en una cubeta múltiple (GE Healthcare). La electroforesis se llevó a cabo a 9-11°C, la primera hora fijando las condiciones a 60 mA, 80 V y 6 W para evitar la electroendosmosis y durante las siguientes seis horas a 240 mA, 500 V y 78 W. Una vez terminada la electroforesis, los geles fueron fijados durante 30 minutos en una solución de

ácido acético al 5% y metanol al 50%, sensibilizados un minuto con tiosulfato sódico 0,01%, teñidos veinte minutos con nitrato de plata 0,1% y revelados en carbonato sódico 2% y formaldehído 0,04% hasta la aparición de las manchas (*spots*), momento en que se paró la reacción con ácido acético 5%. Entre los pasos de fijación, sensibilización, tinción y revelado, se realizaron lavados con agua. Una vez teñidos, los geles se digitalizaron con un densitómetro calibrado GS-800 y se analizó la diferente intensidad de las manchas mediante el software PDQuest, ambos de Bio-Rad.

3.11 Espectrometría de masas.

Las proteínas expresadas de manera diferencial en las distintas condiciones de cultivo fueron recortadas del gel, troceadas y desteñidas en incubación durante 10 minutos con ferrocianuro potásico 30 mM y tiosulfato sódico 100 mM y deshidratadas en acetonitrilo. Finalmente, fueron digeridas con tripsina 13 ng/μl en bicarbonato amónico 10 mM/ acetonitrilo 10% durante 24 horas a 37°C. Los péptidos obtenidos de la digestión con tripsina se identificaron mediante cromatografía de líquidos (nanoHPLC) y espectrometría de masas por trampa iónica (Q-TRAP de Applied Biosystems) (LC-MS/MS). Los espectros de masas de las proteínas expresadas diferencialmente fueron identificados usando la base de datos *UniProtKB/Swissprot* (www.uniprot.org) y el motor de búsqueda *Mascot*.

3.12 Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó utilizando el *software* SPSS para Windows 17.0 (SPSS Inc) y se consideraron diferencias significativas con un p valor menor de 0,05. En el estudio epidemiológico, el equilibrio de *Hardy-*

Weinberg y la presencia y la progresión de calcificación aórtica se evaluaron mediante el test de la χ^2 y los valores de DMO y su tasa de cambio mediante ANOVA. El análisis multivariante de la asociación entre los genotipos y la presencia o la progresión de la calcificación aórtica tras el ajuste por factores de riesgo, se realizó mediante una regresión logística que reveló una odds ratio (OR) con intervalos de confianza del 95%; y la tasa de cambio en DMO, mediante un análisis de covarianza. La actividad de luciferasa, corregida por la actividad de *Renilla*, y el depósito de calcio en los experimentos de calcificación vascular *in vitro* se expresaron como media \pm desviación estándar y se analizaron mediante la t de Student. Las diferencias de expresión génica y proteica entre las distintas condiciones de cultivo también se evaluaron mediante la t de Student.

4. RESULTADOS:

4.1 Asociación de calcificación aórtica y DMO con variantes genéticas.

4.1.1 Características generales de la población.

Las características generales de la población a estudio se muestran en la Tabla 2. La población no mostró diferencias significativas entre mujeres y hombres en cuanto a edad media, ni se observaron diferencias en la tasa de cambio de DMO en el cuello del fémur ni en la cadera total. No obstante, sí se observaron diferencias significativas en el IMC, que fue significativamente mayor en mujeres ($p=0,012$) y en el hábito tabáquico, más frecuente en hombres ($p<0,001$). Además, en las mujeres, los valores de DMO en las zonas esqueléticas analizadas (cuello del fémur y cadera total) fueron significativamente menores ($p<0,001$). Sin embargo, la prevalencia y la progresión de calcificación aórtica fueron significativamente mayores en hombres ($p=0,008$ y $p<0,001$; respectivamente).

Los individuos de la población que presentaban progresión de calcificación aórtica tenían un incremento en la tasa de cambio de DMO a nivel lumbar ($1,55\pm 5,24$ %), respecto a aquellos en los que la calcificación no había progresado ($-0,58\pm 4,71$ %; $p=0,002$). Por dicho motivo, este segmento esquelético no se analizó, como ya se comentó con anterioridad en el apartado 3.1.3 de Sujetos, material y métodos.

RESULTADOS

Tabla 2: Características de la población separada por sexos. N=número de individuos.

Características generales	MUJERES	HOMBRES	p valor
Edad (años)	63,7 ± 8,6	64,4 ± 8,4	0,49
IMC (Kg/m ²)	28,6 ± 4,2	27,5 ± 3,3	0,012
Habito tabáquico (%)	5,3	26,9	<0,001
Calcificación aórtica (%)	29,1	43,3	0,008
DMO cuello del fémur (g/cm ²)	0,78 ± 0,1	0,96 ± 0,1	<0,001
DMO cadera total (g/cm ²)	0,79 ± 0,1	0,96 ± 0,1	<0,001
Progresión calcificación aórtica (%)	34,1	56,7	<0,001
Tasa cambio DMO fémur (%)	0,25 ± 6,2	0,82 ± 5,8	0,43
Tasa cambio DMO cadera (%)	-0,92 ± 4,5	-0,07 ± 4,4	0,13

Debido a estas diferencias observadas en diversas características por género, el posterior análisis de asociación entre los polimorfismos de las proteínas de la matriz extracelular y las distintas variables se llevó a cabo en mujeres y en hombres por separado. La mayoría de las mujeres que participaron en el estudio eran post-menopáusicas (94%).

Se determinaron los genotipos para los SNPs no sinónimos Ser37Ala de *BMP2* y Val667Met de *LRP5*, para la inserción / deleción -1607 1G>2G en el promotor de *MMP1* y para tres polimorfismos de *MGP*: dos en su región promotora (-138T>C y -7G>A) y un cambio no sinónimo en el exón 4 (Thr83Ala). No se obtuvieron los genotipos de algunos individuos debido principalmente a la calidad del ADN almacenado. Se pudo comprobar, mediante el test de la χ^2 , cómo las frecuencias genotípicas observadas en la población separada por sexos no diferían de las esperadas ($\chi^2 < 3,84$) y, por tanto, la población estaba en equilibrio de *Hardy-Weinberg* para dichos

polimorfismos. Tampoco la distribución de frecuencias alélicas fue distinta entre mujeres y hombres (Tabla 3).

Tabla 3: Frecuencias genotípicas y alélicas de los distintos polimorfismos estudiados en función del sexo.

SNP		MUJERES, n (%)	HOMBRES, n (%)	p
<i>BMP2</i>	<i>Ser37Ser</i>	138 (96,5)	131 (99,2)	0,25
	<i>Ser37Ala</i>	5 (3,5)	1 (0,8)	
	<i>Ser (T)</i>	281 (98,3)	263 (99,6)	0,25
	<i>Ala (G)</i>	5 (1,7)	1 (0,4)	
<i>LRP5</i>	<i>Val667Val</i>	114 (89,1)	104 (88,1)	0,52
	<i>Val667Met</i>	13 (10,2)	14 (11,9)	
	<i>Met667Met</i>	1 (0,8)	0 (0)	0,83
	<i>Val (G)</i>	241 (94,5)	222 (94,1)	
<i>MMP1</i>	<i>Met (A)</i>	14 (6,5)	14 (5,9)	0,97
	<i>-16072G2G</i>	43 (28,9)	39 (27,7)	
	<i>-16072G1G</i>	69 (46,3)	66 (46,8)	0,81
	<i>-16071G1G</i>	37 (24,8)	36 (25,5)	
	<i>2G</i>	155 (52)	144 (51,1)	
<i>MGP</i>	<i>1G</i>	143 (48)	138 (48,9)	0,52
	<i>-138TT</i>	75 (51,7)	64 (45,1)	
	<i>-138TC</i>	56 (38,6)	62 (43,7)	0,28
	<i>-138CC</i>	14 (9,7)	16 (11,3)	
	<i>T</i>	206 (71)	190 (66,9)	
<i>MGP</i>	<i>C</i>	84 (29)	94 (33,1)	0,34
	<i>-7GG</i>	56 (41,5)	62 (45,6)	
	<i>-7GA</i>	57 (42,2)	60 (44,1)	0,21
	<i>-7AA</i>	22 (16,3)	14 (10,3)	
	<i>G</i>	169 (62,6)	184 (67,6)	
<i>MGP</i>	<i>A</i>	101 (37,4)	88 (32,4)	0,21
	<i>Thr83Thr</i>	50 (34,2)	59 (41,3)	
	<i>Thr83Ala</i>	70 (47,9)	68 (47,5)	0,09
	<i>Ala83Ala</i>	26 (17,8)	16 (11,2)	
	<i>Thr (A)</i>	170 (58,2)	186 (65)	
	<i>Ala (G)</i>	122 (41,8)	100 (35)	

4.1.2 Asociación entre calcificación aórtica, DMO y Ser37Ala de *BMP2*.

En ambos sexos, no se observaron diferencias significativas en cuanto a las frecuencias genotípicas del polimorfismo Ser37Ala en relación con la prevalencia de calcificación aórtica, ni con los valores basales de DMO en el cuello del fémur, ni en la cadera total. En mujeres, tampoco se encontraron

RESULTADOS

diferencias significativas, ni con la progresión de la calcificación, ni con la tasa de cambio en DMO en las dos zonas esqueléticas estudiadas. En hombres, no se obtuvo ningún dato concluyente de progresión de la calcificación, ni dato alguno de la tasa de cambio en DMO, debido a la exigua presencia del alelo poco frecuente (Tabla 4).

Tabla 4: Porcentaje de individuos con presencia y progresión de calcificación aórtica, valores basales de DMO y tasa de cambio en DMO a los 4 años en función de los genotipos del polimorfismo Ser37Ala de *BMP2*. P calculada mediante t de Student para variables independientes.

Ser37Ala <i>BMP2</i>	MUJERES			HOMBRES			
	Ser-Ser	Ser-Ala	p	Ser-Ser	Ser-Ala	p	
Calcificaciones aórticas (%)	No	99 (73,3%)	4 (80%)	73 (55,7%)	1 (100%)	0,37	
	Si	36 (26,7%)	1 (20%)	58 (44,3%)	0 (0%)		
DMO cuello del fémur (g/cm ²)		0,682 ± 0,105	0,696 ± 0,061	0,89	0,807 ± 0,125	0,788	0,837
DMO cadera total (g/cm ²)		0,782 ± 0,120	0,801 ± 0,042	0,61	0,960 ± 0,123	1,069	0,336
Progresión calcificación aórtica (%)	No	83 (64,8%)	3 (75%)	53 (42,7%)	-	0,67	-
	Si	45 (35,2%)	1 (25%)	71 (57,3%)	-		-
Tasa cambio DMO fémur (%)		0,53 ± 6,27	-2,93 ± 2,56	0,27	0,87 ± 5,23	-	-
Tasa cambio DMO cadera (%)		-0,86 ± 4,85	-1,19 ± 2,78	0,89	0,15 ± 3,77	-	-

4.1.3 Asociación entre calcificación aórtica, DMO y Val667Met de *LRP5*.

La presencia de calcificación aórtica fue más frecuente entre las mujeres heterocigotas Val-Met, aunque sin alcanzarse diferencias significativas (Tabla 5). Además, la única mujer homocigota para el alelo menos frecuente (Met) presentó niveles menores de DMO en las dos

regiones esqueléticas estudiadas. Sin embargo, en hombres no se vio ninguna diferencia remarcable.

Tabla 5: Porcentaje de individuos con presencia y progresión de calcificación aórtica, valores basales de DMO y tasa de cambio en DMO a los 4 años en función de los genotipos del polimorfismo Val667Met de *LRP5*. P calculada mediante ANOVA de una vía.

Val667Met <i>LRP5</i>	MUJERES				HOMBRES			
	Val-Val	Val-Met	Met-Met	p	Val-Val	Val-Met	p	
Calcificaciones aórticas (%)	No	84 (73,7%)	6 (46,2%)	1 (100%)	58 (54,7%)	5 (50%)	0,77	
	Si	30 (26,3%)	7 (53,8%)	0 (0%)	48 (45,3%)	5 (50%)		
DMO cuello del fémur (g/cm ²)		0,688 ± 0,112	0,615 ± 0,079	0,576	0,09	0,818 ± 0,125	0,770 ± 0,125	0,27
DMO cadera total (g/cm ²)		0,776 ± 0,116	0,787 ± 0,094	0,634	0,44	0,971 ± 0,126	0,941 ± 0,01	0,47
Progresión calcificación aórtica (%)	No	68 (63,5%)	9 (75%)	1 (100%)	42 (41,2%)	3 (33,3%)	0,64	
	Si	39 (36,5%)	3 (25%)	0 (0%)	60 (58,8%)	6 (66,7%)		
Tasa cambio DMO fémur (%)		0,36 ± 6,11	2,44 ± 4,58	2,60	0,54	0,04 ± 4,63	1,40 ± 3,88	0,4
Tasa cambio DMO cadera (%)		-0,83 ± 4,86	-0,97 ± 2,97	-1,10	0,99	-0,46 ± 3,82	1,77 ± 3,55	0,09

4.1.4 Asociación entre calcificación aórtica, DMO y -1607 1G>2G de *MMP1*.

No se encontraron diferencias significativas, ni en mujeres ni en hombres, en las frecuencias del SNP -1607 1G>2G, ni en cuanto a la presencia ni en cuanto a la progresión de la calcificación aórtica. Así como tampoco en los valores basales ni en la tasa de cambio de DMO en las dos zonas esqueléticas estudiadas. No obstante, en mujeres, el genotipo 1G1G presentó niveles mayores de DMO a nivel de la cadera, siendo esta tendencia no significativa (Tabla 6).

RESULTADOS

Tabla 6: Porcentaje de individuos con presencia y progresión de calcificación aórtica, valores basales de DMO y tasa de cambio en DMO a los 4 años en función de los genotipos del polimorfismo -1607 1G>2G de *MMP1*. P calculada mediante ANOVA de una vía.

-1607 1G>2G <i>MMP1</i>	MUJERES				HOMBRES				
	2G2G	2G1G	1G1G	p	2G2G	2G1G	1G1G	p	
Calcificaciones aórticas (%)	No	32 (74,4%)	48 (69,6%)	25 (67,6%)		19 (50%)	38 (58,5%)	21 (58,3%)	
	Si	11 (25,6%)	21 (30,4%)	12 (32,4%)	0,77	19 (50%)	27 (41,5%)	15 (41,7%)	0,67
DMO cuello del fémur (g/cm ²)		0,685 ± 0,103	0,664 ± 0,098	0,707 ± 0,121	0,18	0,833 ± 0,134	0,822 ± 0,122	0,803 ± 0,13	0,65
DMO cadera total (g/cm ²)		0,781 ± 0,106	0,76 ± 0,119	0,823 ± 0,122	0,06	0,983 ± 0,137	0,981 ± 0,114	0,926 ± 0,127	0,12
Progresión calcificación aórtica (%)	No	27 (67,5%)	42 (64,6%)	23 (63,9%)		12 (32,4%)	28 (45,9%)	17 (50%)	
	Si	13 (32,5%)	23 (35,4%)	13 (36,1%)	0,93	25 (67,6%)	33 (54,1%)	17 (50%)	0,27
Tasa cambio DMO fémur (%)		-0,41 ± 5,88	0,57 ± 5,66	-0,01 ± 6,83	0,73	0,95 ± 5,8	1,52 ± 5,06	0,21 ± 4,57	0,56
Tasa cambio DMO cadera (%)		-1,66 ± 4,23	-0,10 ± 4,59	-1,81 ± 4,36	0,12	0,03 ± 4,24	-0,3 ± 4,41	1,11 ± 3,16	0,33

4.1.5 Asociación entre calcificación aórtica, DMO y -138T>C de *MGP*.

Ni en mujeres ni en hombres se observó asociación entre los genotipos para el polimorfismo -138 en el promotor de *MGP*, con presencia o progresión de la calcificación aórtica (Tabla 7). El polimorfismo -138T>C tampoco se asoció con menores valores basales de DMO, ni con la tasa de cambio de DMO en ninguno de los segmentos esqueléticos analizados.

Tabla 7: Porcentaje de individuos con presencia y progresión de calcificación aórtica, valores basales de DMO y tasa de cambio en DMO a los 4 años en función de los genotipos del polimorfismo -138T>C de *MGP*. P calculada mediante ANOVA de una vía.

	-138 T>C <i>MGP</i>	MUJERES				HOMBRES			
		CC	CT	TT	p	CC	CT	TT	p
Calcificaciones aórticas (%)	No	10 (71,4%)	40 (71,4%)	52 (69,3%)	0,96	8 (50%)	37 (60,7%)	34 (54%)	0,64
	Si	4 (28,6%)	16 (28,6%)	23 (30,7%)		8(50%)	24 (39,3%)	29 (46%)	
DMO cuello del fémur (g/cm ²)		0,673 ± 0,09	0,704 ± 0,119	0,664 ± 0,098	0,14	0,773 ± 0,105	0,825 ± 0,116	0,817 ± 0,145	0,45
DMO cadera total (g/cm ²)		0,768 ± 0,094	0,809 ± 0,132	0,761 ± 0,109	0,1	0,939 ± 0,10	0,972 ± 0,114	0,958 ± 0,144	0,69
Progresión calcificación aórtica (%)	No	8 (61,5%)	36 (69,2%)	48 (66,7%)	0,86	6 (40%)	26 (44,1%)	26 (44,1%)	0,95
	Si	5 (38,5%)	16 (30,8%)	24 (33,3%)		9 (60%)	33 (55,9%)	33 (55,9%)	
Tasa cambio DMO fémur (%)		-0,66 ± 8,12	1,06 ± 5,8	-0,21 ± 6,15	0,5	1,92 ± 2,37	0,03 ± 5,05	1,76 ± 5,79	0,21
Tasa cambio DMO cadera (%)		-0,65 ± 4,83	-1,08 ± 4,75	-0,77 ± 4,36	0,92	0,35 ± 3,7	0,32 ± 3,77	0,14 ± 4,58	0,97

4.1.6 Asociación entre calcificación aórtica, DMO y -7G>A de *MGP*.

El porcentaje de hombres que presentaron calcificación aórtica en el primer estudio transversal fue mayor entre los homocigotos -7AA (79%) comparado con los genotipos -7GA (37%, p=0,005) y -7GG (44%, p=0,02), siguiendo un modelo recesivo de herencia (Tabla 8). Esta asociación en el modelo univariante se confirmó en un modelo multivariante tras ajustar por edad, IMC y hábito tabáquico. Así, el genotipo -7AA mostró mayor riesgo de presencia de calcificación aórtica (OR=5; IC 95%=[1,2-19,4]), frente a los individuos portadores del alelo G (-7GG y -7GA).

En mujeres, el polimorfismo -7G>A se asoció significativamente con una DMO más baja a nivel de cadera (p=0,03). Agrupando a las mujeres portadoras del alelo -7G (es decir, las GG más las GA) y comparando su

RESULTADOS

DMO con la de las mujeres -7AA, las diferencias seguían siendo significativas ($p=0,04$). En el caso del cuello del fémur, se observaron diferencias significativas al comparar el genotipo -7AA frente a -7GG ($p=0,04$).

En hombres, no se observó asociación entre los genotipos de este polimorfismo de *MGP* y niveles de DMO en el cuello del fémur o en la cadera total. No obstante, el porcentaje de hombres entre los cuales la calcificación aórtica progresó, fue ligeramente mayor entre los homocigotos -7AA (77%) comparado con los genotipos -7GA (63%, $p=0,52$) y -7GG (47%, $p=0,069$). Mediante un análisis de regresión logística, ajustado por edad, IMC y hábito tabáquico, el homocigoto -7AA mostró mayor riesgo de progresión de calcificación aórtica comparado con -7GG (OR=5,6; IC 95%=[1,2-27,8]), aunque no llegó a ser significativo frente al heterocigoto -7GA (OR=2,9; IC 95%=[0,6-14,7]). Además, mientras que los genotipos -7GG y -7GA no presentaron pérdida de DMO a nivel de cuello del fémur pasados los 4 años de seguimiento, los individuos con el genotipo -7AA presentaron descensos en la DMO de 1,6%. El análisis de covarianza ajustado por edad, índice de masa corporal y hábito tabáquico mostró una asociación positiva del genotipo -7AA con pérdida de DMO en cuello del fémur, frente a los genotipos -7GG y -7GA agrupados ($p=0,039$). Se observó una misma tendencia entre el -7AA de *MGP* y las pérdidas de DMO a nivel de la cadera total, aunque la asociación no llegó a ser significativa.

En las mujeres, aunque se observó también que la calcificación aórtica progresó más frecuentemente entre las homocigotas -7AA (36%) comparado con los genotipos -7GA (33%) y -7GG (29%), siendo esta tendencia no

significativa, no se observó asociación entre el genotipo -7AA de *MGP* y la tasa de cambio de DMO en el cuello del fémur ni en la cadera total.

Tabla 8: Porcentaje de individuos con presencia y progresión de calcificación aórtica, valores basales de DMO y tasa de cambio en DMO a los 4 años en función de los genotipos del polimorfismo -7G>A de *MGP*. P calculada mediante ANOVA de una vía.

	-7 G>A <i>MGP</i>	MUJERES				HOMBRES			
		GG	GA	AA	p	GG	GA	AA	p
Calcificaciones aórticas (%)	No	39 (69,6%)	43 (75,4%)	15 (68,2%)	0,72	34 (55,7%)	37 (62,7%)	3 (21,4%)	0,02
	Si	17 (30,4%)	14 (24,6%)	7 (31,8%)		27 (44,3%)	22 (37,3%)	11 (78,6%)	
DMO cuello del fémur (g/cm ²)		0,703 ± 0,101	0,682 ± 0,114	0,638 ± 0,079	0,07	0,788 ± 0,099	0,842 ± 0,148	0,809 ± 0,12	0,12
DMO cadera total (g/cm ²)		0,814 ± 0,117	0,774 ± 0,12	0,734 ± 0,098	0,03	0,936 ± 0,106	0,988 ± 0,136	0,937 ± 0,137	0,11
Progresión calcificación aórtica (%)	No	34 (66,7%)	39 (70,9%)	14 (63,6%)	0,79	30 (52,6%)	21 (36,8%)	3 (23,1%)	0,076
	Si	17 (33,3%)	16 (29,1%)	8 (36,4%)		27 (47,4%)	36 (63,2%)	10 (76,9%)	
Tasa cambio DMO fémur (%)		0,66 ± 5,42	-0,36 ± 6,01	-0,27 ± 4,67	0,6	1,07 ± 4,8	1,54 ± 5,48	-1,63 ± 3,33	0,13
Tasa cambio DMO cadera (%)		-0,9 ± 4,37	-1,28 ± 4,86	0,54 ± 3,05	0,19	0,49 ± 3,43	0,60 ± 4,44	-1,15 ± 4,09	0,35

4.1.7 Asociación entre calcificación aórtica, DMO y Thr83Ala de *MGP*.

El porcentaje de hombres que presentaron calcificación aórtica en el primer estudio transversal fue mayor entre los homocigotos 83Ala-Ala (75%) comparado con los genotipos 83Thr-Thr (40%, p=0,010) y 83Thr-Ala (40%, p=0,014), siguiendo un modelo recesivo de herencia (Tabla 9). Esta asociación en el modelo univariante se confirmó en un modelo multivariante tras ajustar por la edad, el IMC y el hábito tabáquico. El genotipo 83Ala-Ala se asoció con un mayor riesgo de presencia de calcificación aórtica (OR=4,6;

RESULTADOS

IC 95%=[1,1-13,9]) frente a los individuos portadores del alelo Thr (83Thr-Thr y 83Thr-Ala).

En ninguno de los sexos se observó asociación entre los genotipos de los polimorfismos de *MGP* y niveles basales de DMO en cuello del fémur o en cadera total.

Sin embargo, el porcentaje de hombres entre los cuales la calcificación aórtica progresó fue mayor entre los homocigotos 83Ala-Ala (81%), comparado con los genotipos 83Thr-Ala (57%, $p=0,091$) y 83Thr-Thr (49%, $p=0,025$). El genotipo homocigoto 83Ala-Ala mostró un riesgo significativamente mayor de progresión de la calcificación aórtica comparado con ambos: el homocigoto 83Thr-Thr (OR=6,8; IC 95%=[1,4-32,3]) y el heterocigoto 83Thr-Ala (OR=2,9; IC 95%=[1,0-23,9]). Además, el polimorfismo Thr83Ala se asoció con una tasa de cambio de DMO negativa a nivel de cuello del fémur ($p=0,049$). Mientras que los genotipos 83Thr-Thr y 83Thr-Ala no presentaron pérdida de DMO a nivel del cuello del fémur pasados los 4 años de seguimiento, los individuos con el genotipo 83Ala-Ala presentaron descensos en la DMO de 2,4% ($p<0,05$). El análisis de covarianza ajustado por edad, IMC y hábito tabáquico mostró una asociación positiva entre el genotipo 83Ala-Ala con pérdida de DMO en el cuello del fémur, frente a los genotipos portadores del alelo Thr (83Thr-Thr y Thr-Ala, $p=0,009$). Aunque no se observaron diferencias entre el polimorfismo Thr83Ala de *MGP* y pérdidas de DMO a nivel de la cadera total, sí se apreció una tendencia similar.

En las mujeres, se observó también que la calcificación aórtica progresó más frecuentemente entre las homocigotas 83Ala-Ala (42%) que

entre las 83Thr-Ala (30%) y 83Thr-Thr (36%). Además, el genotipo 83Ala-Ala de *MGP* mostró una tasa de cambio de DMO más negativa en el cuello del fémur y en la cadera total, siendo esta tendencia no significativa.

Tabla 9: Porcentaje de individuos con presencia y progresión de calcificación aórtica, valores basales de DMO y tasa de cambio en DMO a los 4 años en función de los genotipos del polimorfismo Thr83Ala de *MGP*. P calculada mediante ANOVA de una vía.

Thr83Ala <i>MGP</i>	MUJERES				HOMBRES				
		Thr-Thr	Thr-Ala	Ala-Ala	p	Thr-Thr	Thr-Ala	Ala-Ala	p
Calcificaciones aórticas (%)	No	34 (68%)	54 (77,1%)	17 (65,4%)	0,39	34 (59,6%)	41 (60,3%)	4 (25%)	0,029
	Si	16 (32%)	16 (22,9%)	9 (34,6%)		23 (40,4%)	27 (39,7%)	12 (75%)	
DMO cuello del fémur (g/cm ²)		0,694 ± 0,112	0,681 ± 0,105	0,658 ± 0,089	0,41	0,808 ± 0,104	0,822 ± 0,146	0,821 ± 0,123	0,84
DMO cadera total (g/cm ²)		0,772 ± 0,131	0,803 ± 0,116	0,760 ± 0,091	0,25	0,947 ± 0,111	0,972 ± 0,137	0,975 ± 0,135	0,58
Progresión calcificación aórtica (%)	No	29 (64,4%)	47 (70,1%)	15 (57,7%)	0,5	28 (50,9%)	27 (42,9%)	3 (18,8%)	0,073
	Si	16 (35,6%)	20 (29,9%)	11 (42,3%)		27 (49,1%)	36 (57,1%)	13 (81,2%)	
Tasa cambio DMO fémur (%)		0,42 ± 5,85	-0,13 ± 5,79	-0,79 ± 5,62	0,93	1,70 ± 4,51	0,55 ± 6,09	-2,39 ± 3,71	0,049
Tasa cambio DMO cadera (%)		-0,94 ± 4,07	-1,12 ± 4,87	-1,17 ± 4,13	0,78	0,15 ± 3,35	0,11 ± 4,19	-0,71 ± 4,68	0,77

4.1.8 Asociación entre calcificación aórtica, DMO y haplotipos de *MGP*.

Se calculó el coeficiente de desequilibrio de ligamiento D' entre los polimorfismos -138, -7 y 83 de *MGP* y se encontró que los más fuertemente ligados eran el -7 y el 83 (D'=7,3), aunque los tres mostraron estar ligados de manera estadísticamente significativa ($\chi^2 > 3,84$). Los polimorfismos de la *MGP* se agruparon en haplotipos, nombrados con los alelos colocados en orden según su posición en el gen (-138T>C, -7G>A y 83Thr[A]>Ala[G]). Los

RESULTADOS

haplotipos en orden de mayor a menor frecuencia en la población fueron: TGA (25,9%), TGG (16,7%), TAA (15,1%), CGA (12,4%), TAG (9,7%), CGG (8,0%) y CAA (7,3%). Los haplotipos con una frecuencia menor del 5% no fueron analizados. El programa estadístico *Thesias*, utilizado para el análisis de haplotipos, enfrenta los distintos haplotipos contra el más frecuente, que en nuestra población fue el TGA. En hombres, únicamente el haplotipo TAG resultó ser determinante de riesgo de prevalencia de calcificación aórtica (OR=3,9; IC 95%=[1,3-11,7]), de progresión de calcificación aórtica (OR=5; IC 95%=[1,5-16,2]) y de pérdida de DMO en el cuello del fémur (OR=3,3; IC 95%=[1,1-10,2]) tras ajustar por la edad, el IMC y el hábito tabáquico. Sin embargo, en las mujeres, ningún haplotipo mostró asociación con calcificación aórtica o con DMO (Tabla 10).

Tabla 10: Efecto del haplotipo TAG (-138T/-7A/83G[Ala]) frente a TGA (-138T/-7G/83A[Thr]) de *MGP* sobre las distintas variables. Se muestra la OR y el intervalo de confianza del 95%.

	MUJERES		HOMBRES	
	TAG frente a TGA	p	TAG frente a TGA	p
Calcificación aórtica	0,65 [0,33-1,31]	0,22	3,9 [1,3-11,75]	0,045
Progresión calcificación aórtica	1,45 [0,75-2,85]	0,27	5 [1,56-16,2]	0,04
T score < -1 cuello del fémur	0,8 [0,41-1,58]	0,52	1,02 [0,47-2,2]	0,96
T score < -1 cadera total	1,06 [0,53-2,12]	0,86	1,01 [0,4-2,5]	0,98
Pérdida DMO cuello del fémur	0,83 [0,48-1,45]	0,51	3,3 [1,1-10,2]	0,03
Pérdida DMO cadera total	0,89 [0,51-1,56]	0,67	1,07 [0,56-2,04]	0,82

4.1.9 Estudio informático de -7G>A y Thr83Ala de *MGP*.

Los polimorfismos en los que se encontró alguna asociación se analizaron con diversos programas informáticos. Se comprobó que la posición -7G de *MGP* está conservada, al menos, entre distintas especies de mamíferos (Figura 3).

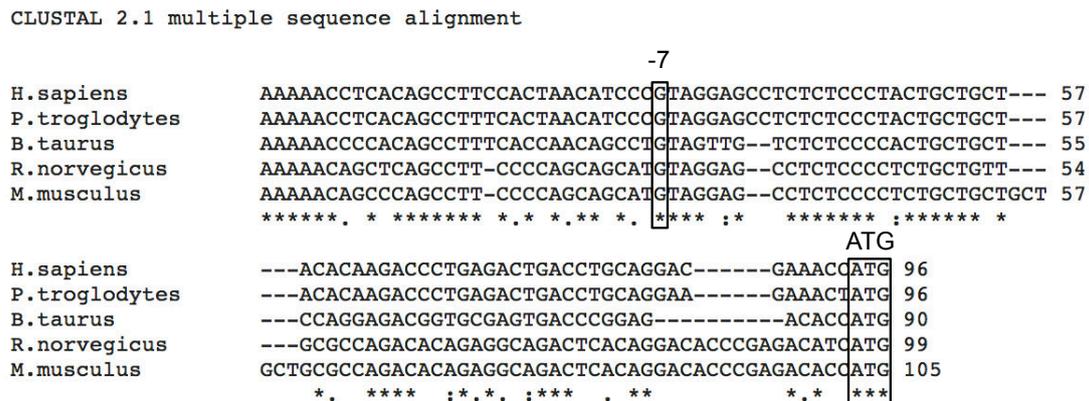


Figura 3: Alineamiento parcial de las secuencias nucleotídicas del gen *MGP* en distintas especies donde se muestra el nivel de conservación a nivel del cambio -7G>A, obtenido con ClustalW.

Se observó que el alelo -7G forma parte de un dinucleótido CpG susceptible de ser metilado (datos no mostrados), hecho que puede afectar a la regulación del promotor del gen *MGP* y por tanto, a su posterior transcripción.

Además, el análisis de la secuencia en busca de sitios de reconocimiento de factores de transcripción potencialmente afectables por el polimorfismo reveló que el alelo *MGP* -7A supone la pérdida de la secuencia de reconocimiento para la unión del factor de transcripción c-Ets, con respecto al alelo -7G (Figura 4).

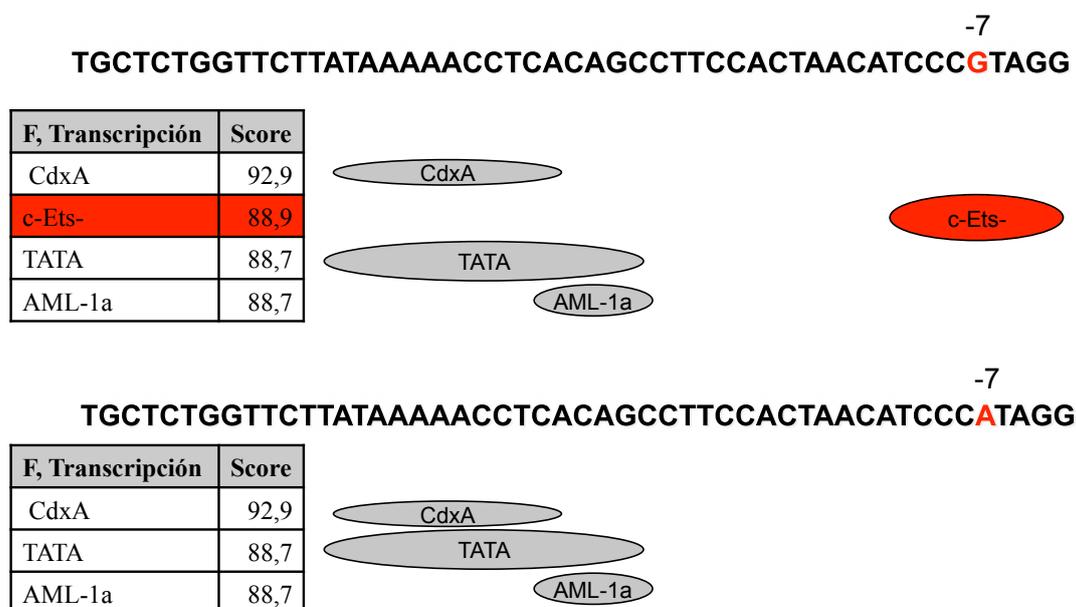


Figura 4: Predicción de sitios de unión a factores de transcripción en el promotor del gen *MGP* realizado mediante TFSEARCH.

El análisis de la estructura secundaria del ARNm reveló la posibilidad de un plegamiento diferente entre las moléculas, siendo la estructura del alelo 83Thr menos estable ($\Delta G = -168,10$ kcal/mol) que la del alelo 83Ala ($\Delta G = -171,20$ kcal/mol) (Figura 5).

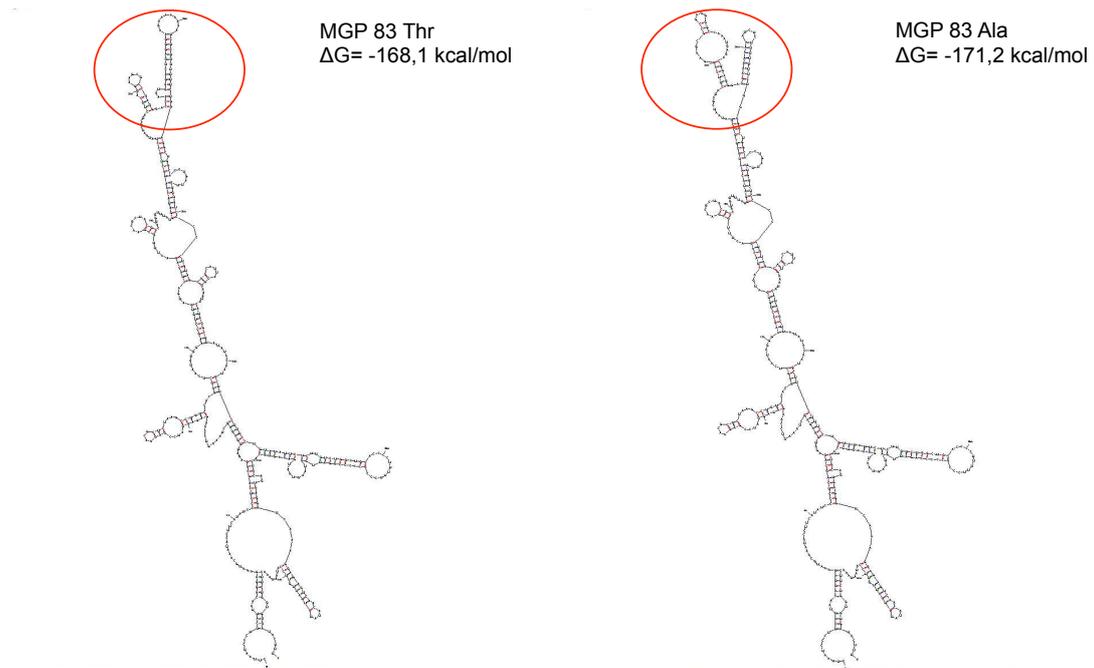


Figura 5: Estructuras secundarias de mínima energía libre (ΔG) calculadas con el programa Mfold, del ARNm del gen *MGP* con los dos alelos en la posición 83 de la proteína (83Thr y 83Ala). Los círculos señalan la región afectada por el cambio.

El alelo que codifica para la MGP 83Ala, si bien está conservado entre las especies de mamíferos *R. norvegicus*, *M. musculus*, *P. troglodytes* y *B. Taurus*, en humanos es polimórfico y en poblaciones caucásicas, el alelo más frecuente es el que codifica para la MGP 83Thr (Figura 6).

RESULTADOS

```
[M.musculus]      MKSLLPLAIIAALAVATLCYESHESMESYEISPFINRRNANTFMSPPQQRWRAKAQKRVQE 60
[R.norvegicus]   MKSLLPLAIIAALAVAALCYESHESMESYEVSPFTTRRNANTFISPPQQRWHAKAQERVRE 60
[B.taurus]       MKSLLLLSIIAALAVAALCYESHESLESYEINPFINRRNANSFISPPQQRWRAKAQERIRE 60
[P.troglodytes] MKSLILLAIILAALAVVTLCYESHESMESYELNPFINRRHANTFISPPQQRWRAKVQERIRE 60
[H.sapiens]      MKSLILLAIILAALAVVTLCYESHESMESYELNPFINRRNANTFISPPQQRWRAKVQERIRE 60
***: *:*****.:*****:****:.*. **:***:*****:*.*:*:*

[M.musculus]      RNKPAYEINREACDDYKLCERYAMVYGYNAAYNRYFRQRRGAKY 104
[R.norvegicus]   LNKPAQEINREACDDYKLCERYALIYGYNAAYNRYFRQRRGAK- 103
[B.taurus]       LNKPQYELNREACDDFKLCERYAMVYGYNAAYDRYFRQRRGAK- 103
[P.troglodytes] RSKPVHELNREACDDYRLCERYAMVYGYNAAYNRYFRKRRGAK- 103
[H.sapiens]      RSKPVHELNREACDDYRLCERYAMVYGYNAAYNRYFRKRRGTK- 103
.* *:******.:*****:*****:****:***:*
```

Figura 6: Alineamiento parcial de las secuencias aminoacídicas de la MGP en distintas especies donde se muestra el nivel de conservación del aminoácido en la posición 102 (83 de la proteína procesada), obtenido de *HomoloGene*.

En tres predicciones realizadas para las dos variantes de la proteína MGP 83Thr y 83Ala, su estructura secundaria coincidió en un 91,9%, revelando distinto plegamiento de la región C-terminal.

La MGP 83Thr está estructuralmente compuesta en un 5,8% por hélice alfa, 14,6% plegamiento beta y 79,6 % plegamiento aleatorio y MGP 83Ala en un 7,8% por hélice alfa, 15,5 % plegamiento beta y 76,7% plegamiento aleatorio (Figura 7).

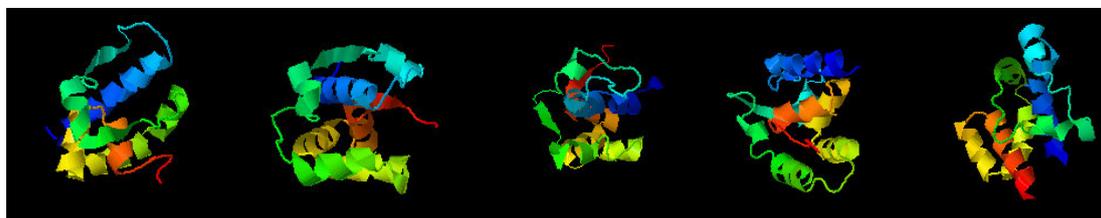


Figura 7: Modelo tridimensional de la MGP realizado mediante I-TASSER.

4.1.10 Efecto de -7G>A de *MGP* en la actividad transcripcional.

Para analizar si el polimorfismo -7G>A podría afectar a la transcripción de *MGP* en osteoblastos o en células vasculares, ambas líneas (UMR 106-01 y A7r5, respectivamente) fueron transfectadas con el vector vacío pGL3-Basic y con las construcciones pGL3-MGP-7G y pGL3-MGP-7A. Se determinó la actividad luciferasa generada, observándose una actividad transcripcional diferente entre ambos alelos en las dos líneas celulares, con una reducción de la actividad del alelo -7A respecto al -7G del 34% en las células óseas ($p=0,012$) y del 47% en las vasculares ($p=0,001$). Además, la actividad del promotor de la *MGP* fue del orden de cuatro veces menor en las células óseas que en las vasculares (Figura 8).

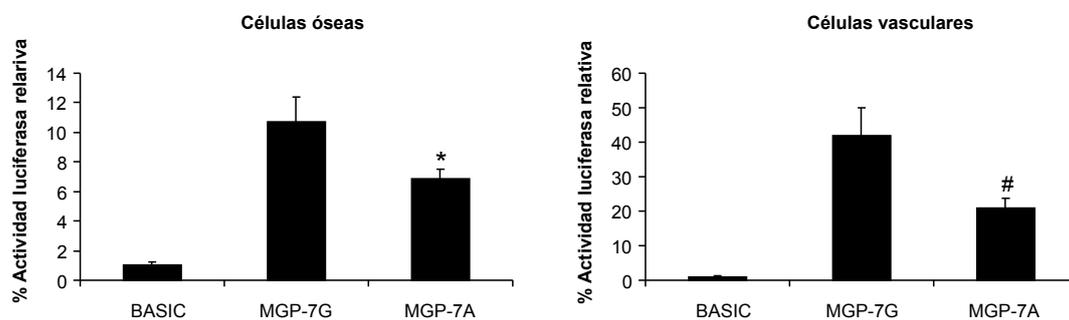


Figura 8: Medida de la actividad luciferasa relativa generada por las construcciones en pGL3 con los alelos -7G y -7A de *MGP* en células óseas (UMR 106-01) y vasculares (A7r5). Las barras representan la media de la actividad luciferasa relativa (corregida por actividad *Renilla*) \pm desviación estándar, de cinco experimentos realizados por duplicado. La actividad obtenida por pGL3-Basic se ajustó a la unidad. * $p=0,012$ y # $p=0,001$ al comparar con MGP-7G.

4.1.11 Efecto de Thr83Ala de *MGP* en la calcificación vascular *in vitro*.

Una de las principales funciones de la MGP es la inhibición de la calcificación vascular. Para determinar si el polimorfismo Thr83Ala de *MGP* podía afectar a esta función, se transfectaron células vasculares (A7r5) con el vector vacío pcDNA3 y con las construcciones pcDNA3-MGP83Thr y pcDNA3-MGP83Ala. Pasados dos días, mediante PCR cuantitativa a tiempo real, se cuantificaron los niveles de ARNm generado por las dos construcciones de MGP en las células vasculares transfectadas (Figura 9A) y mediante *Western blot* se cuantificaron también los niveles de la proteína MGP humana (10 kDa) con el alelo 83Thr y con 83Ala (Figura 9B).

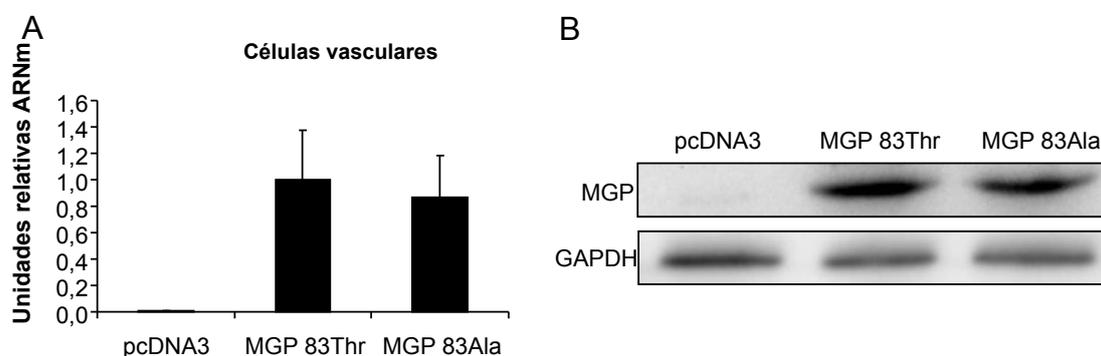


Figura 9: Niveles de expresión de MGP humana en células vasculares (A7r5) transfectadas con pcDNA3 vacío, pcDNA3-MGP83Thr o pcDNA3-MGP83Ala. A) ARNm medido mediante PCR cuantitativa. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de tres experimentos llevados a cabo por triplicado como unidades relativas frente a las células transfectadas con pcDNA3-MGP 83Thr. B) Análisis de la proteína mediante *Western blot*.

Estas células transfectadas se mantuvieron en un medio con 2 mM de calcio y 3 mM de fósforo durante 4 días (CaPi4). Al cabo de ese tiempo se determinó la concentración de calcio depositado y se observó que las células transfectadas con ambas variantes de la MGP (83Thr y 83Ala) presentaron una inhibición del contenido en calcio con respecto a las células control, transfectadas con el vector vacío pcDNA3 (Figura 10). Además, la MGP con el alelo 83Thr presentó una mejor eficacia en la inhibición del depósito de calcio (85%) que la MGP con el alelo 83Ala (65%), siendo esta diferencia no significativa ($p=0,094$).

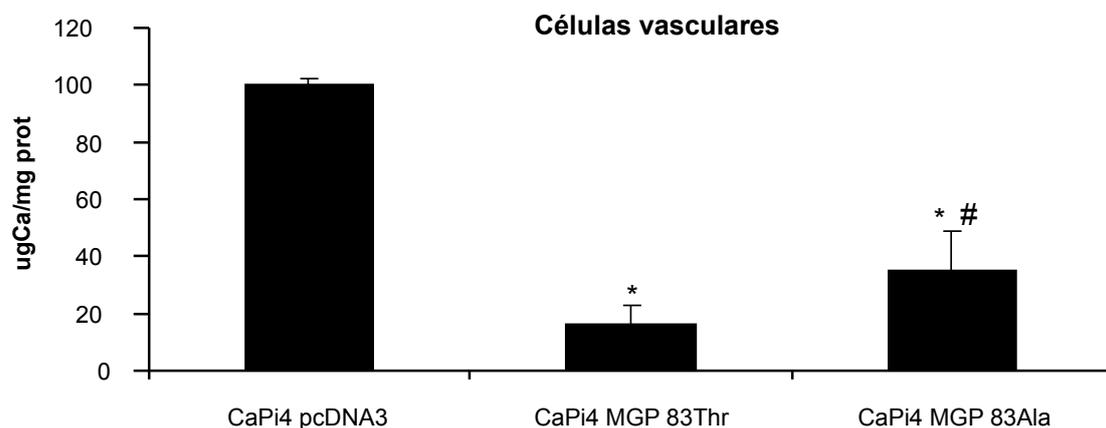


Figura 10: Determinación del depósito de calcio en células vasculares (A7r5) transfectadas con pcDNA3 vacío, pcDNA3-MGP83Thr o pcDNA3-MGP83Ala cultivadas en medio con 2 mM de calcio + 3 mM de fósforo (CaPi) durante 4 días. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de tres experimentos llevados a cabo por triplicado, relativizados frente al contenido en calcio en células transfectadas con sus respectivas construcciones cultivadas en medio control. * $p<0,05$ frente a CaPi pcDNA3 y # $p=0,094$ frente a CaPi MGP 83Ala.

4.2 Calcificación vascular in vitro.

4.2.1 Efecto del calcitriol sobre el depósito de calcio en el modelo de calcificación vascular por exceso de calcio y de fósforo.

La adición al medio de cultivo de calcio 2 mM, de fósforo 3 mM y de calcitriol 10^{-7} M se relacionó de manera directa con un mayor contenido en los depósitos minerales. Se pudo observar que la tinción con rojo de Alizarina empezó a hacerse visible a los 4 días, con un aumento del depósito mineral a los 8 días; tanto en las células vasculares (A7r5) tratadas con calcio 2 mM y fósforo 3 mM (CaPi 8) como en las que se adicionó también calcitriol 10^{-7} M (CaPi+CTR 8) (Figura 11). Se descartó la precipitación pasiva de mineral al comprobar que no había depósitos de calcio al incubar el medio (CaPi) durante 4 y 8 días en ausencia de células (datos no mostrados).

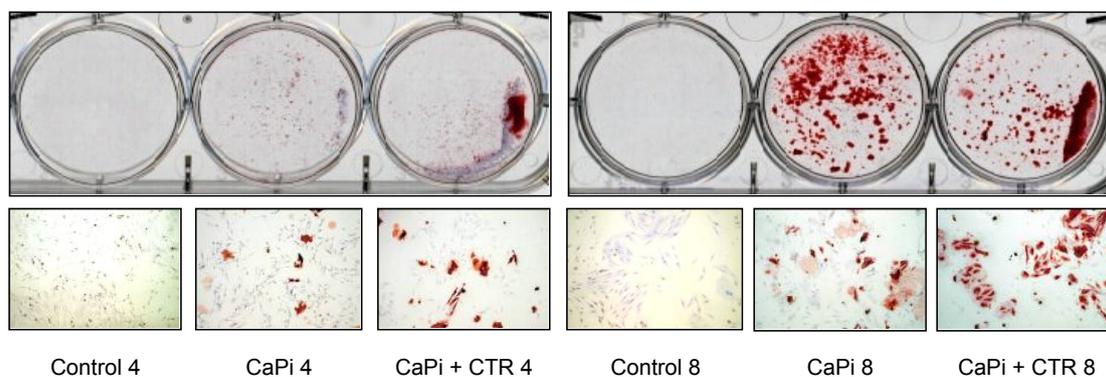


Figura 11: Macro y microfotografías (20X) de la tinción de rojo de alizarina de células vasculares (A7r5) cultivadas en medio control, en medio con 2 mM de calcio + 3 mM de fósforo (CaPi) y en medio CaPi + calcitriol 10^{-7} M (CaPi+CTR), a los 4 y 8 días de tratamiento.

Mediante la cuantificación de la deposición de calcio se pudo confirmar un aumento significativo en la concentración del mismo en los grupos CaPi y CaPi+CTR con respecto a su control, tanto a los 4 como a los 8 días (Figura 12). Además, a los 4 días, se observó un depósito de calcio significativamente mayor en el grupo CaPi+CTR comparado con el grupo CaPi, alcanzándose a los 8 días niveles similares de calcio en ambos grupos.

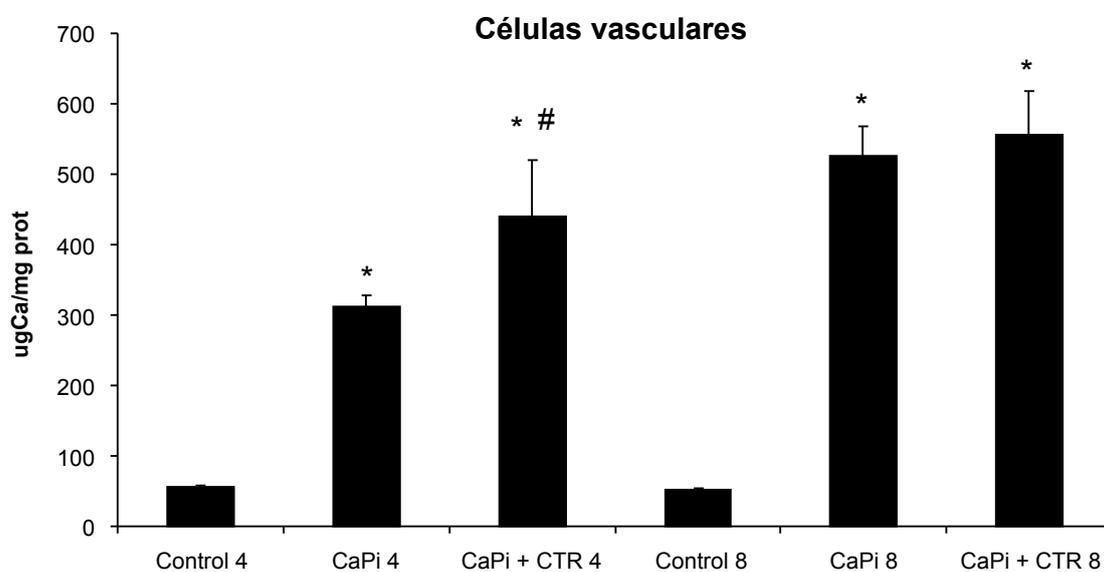


Figura 12: Determinación del depósito de calcio en células vasculares (A7r5) cultivadas en medio control, en medio con 2 mM de calcio + 3 mM de fósforo (CaPi) y en medio CaPi + calcitriol 10^{-7} M (CaPi+CTR), a los 4 y 8 días de tratamiento. * $p < 0,05$ frente a su respectivo control y # $p < 0,05$ frente a CaPi 4.

4.2.2 Efectos en la expresión génica.

Se seleccionaron ciertos genes que se expresan típicamente en células musculares y otros en células de tipo osteoblasto para caracterizar el posible cambio fenotípico causante de las diferencias observadas en el depósito de calcio en los cultivos. Así, mediante qRT-PCR se observó un

aumento al cuarto día de los niveles de ARNm de OPN, de fosfatasa alcalina (ALP) y de RUNX2 en las células del grupo CaPi+CTR4; aumento que no se pudo observar en las células CaPi4. También se pudo detectar cómo a partir del cuarto día descendió significativamente la expresión de genes típicos de músculo, como la transgelina (SM22) y la elastina, tanto en el grupo CaPi como CaPi+CTR 4 (Figura 13).

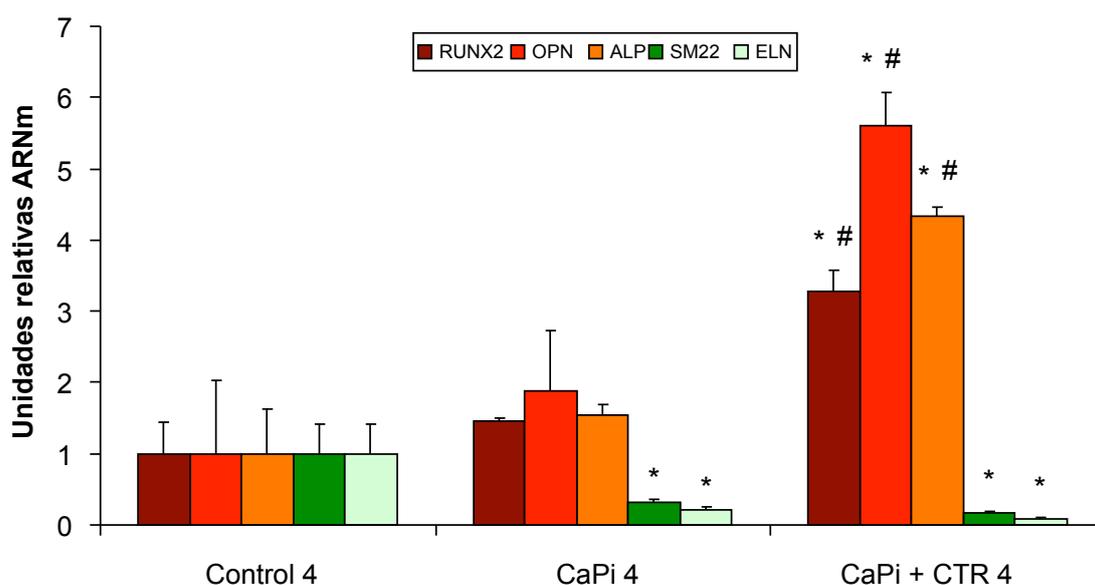


Figura 13: Niveles relativos de ARNm de RUNX2, osteopontina (OPN), fosfatasa alcalina (ALP), transgelina (SM22) y elastina (ELN) en células vasculares (A7r5) cultivadas en medio control, en medio con 2mM de calcio + 3mM de fósforo (CaPi) y en medio CaPi + calcitriol 10^{-7} M (CaPi+CTR) durante 4 días. * $p < 0,05$ frente a control; # $p < 0,05$ frente a CaPi4.

4.2.3 Aproximación proteómica al efecto del calcitriol sobre la calcificación vascular.

Con el fin de ampliar el espectro de proteínas diferencialmente expresadas por el tratamiento con calcitriol 10^{-7} M durante 10 días respecto a las células control, se llevó a cabo un análisis proteómico. Se obtuvieron 334 manchas en total (o *spots*) localizadas en cada uno de los 6 geles teñidos

con nitrato de plata (3 Control y 3 CTR 10^{-7} M), de entre las cuales 22 presentaron diferencias significativas de expresión ($p < 0,05$). Se identificaron por el *Mascot 10 spots* que se muestran en las Figuras 14 y 15.

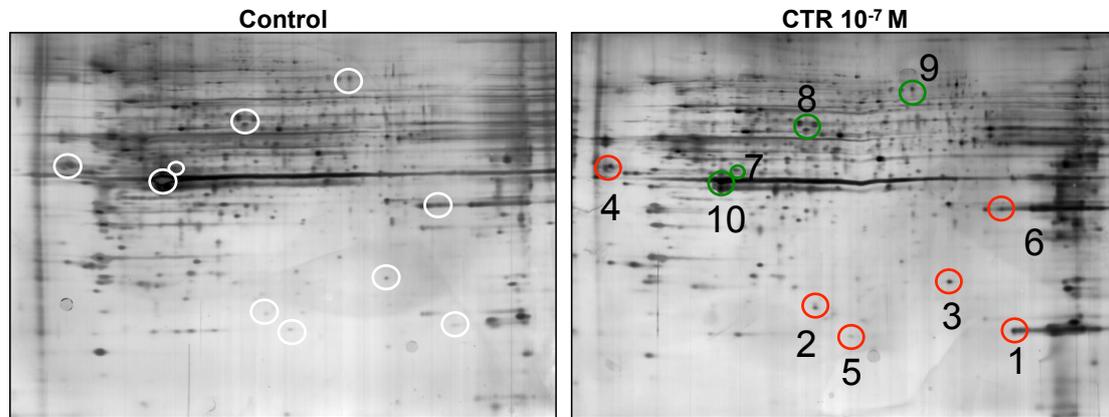


Figura 14: Geles bidimensionales de extractos proteicos de células vasculares (A7r5) cultivadas en medio control y tratadas diariamente con calcitriol 10^{-7} M (CTR) durante 10 días. Se señalan aquellas proteínas expresadas diferencialmente respecto a las células control.

De entre las 10 proteínas que presentaron diferencias significativas de expresión ($p < 0,05$) respecto a las células control (Figura 15), cabe destacar 3 de ellas: un marcador de estrés oxidativo con expresión aumentada, la superóxido dismutasa mitocondrial [Mn]; y dos marcadores musculares con expresión disminuida: la actina de músculo liso aórtico y la actina citoplasmática 2.

RESULTADOS

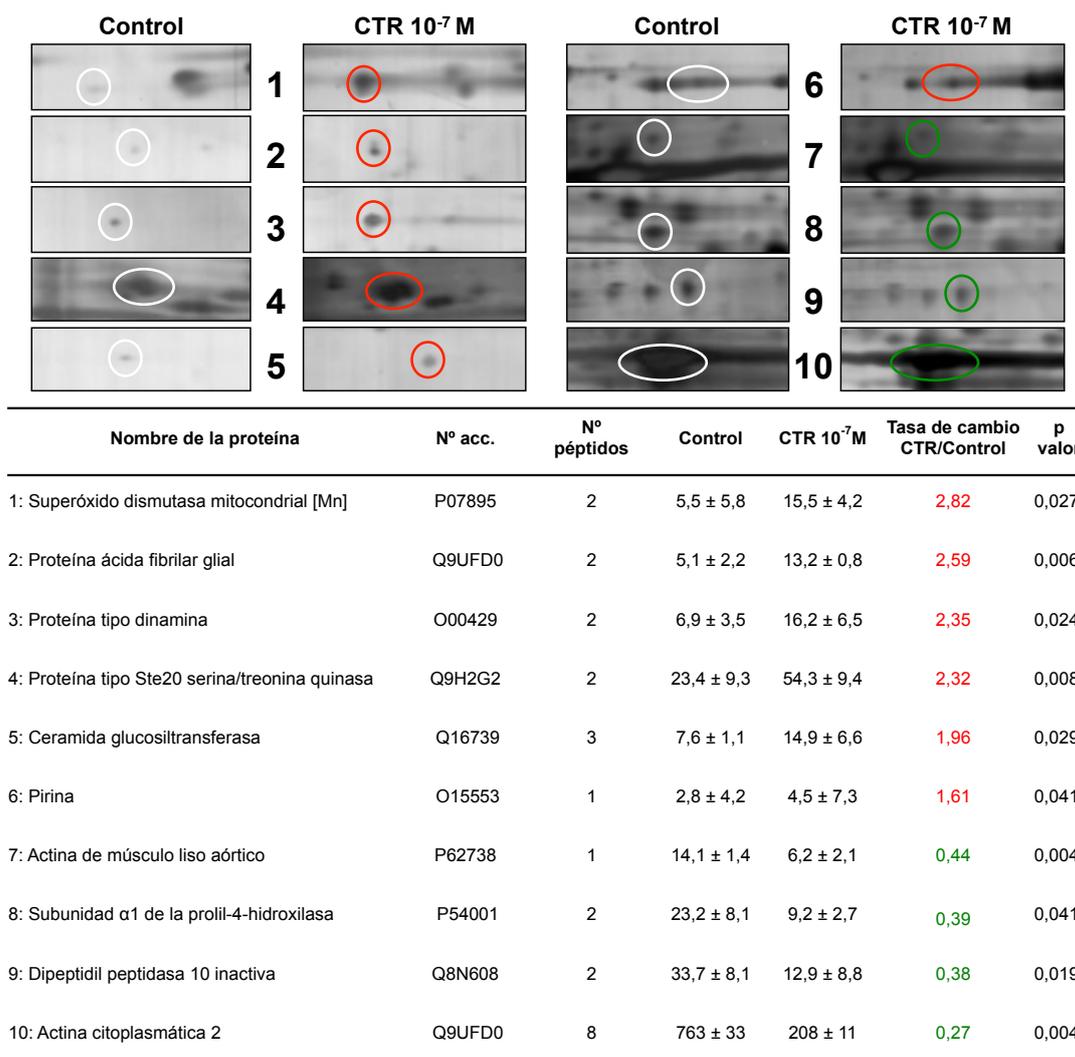


Figura 15: Listado de proteínas identificadas por el *Mascot* expresadas diferencialmente en células vasculares (A7r5) tratadas diariamente con calcitriol 10⁻⁷ M (CTR) durante 10 días, respecto a las células control. En la tabla aparecen los número de acceso de *Swissprot* (Nº acc) y el número de péptidos identificados mediante espectrometría de masas (Nº péptidos). Se representa la media de intensidad de los *spots* ± desviación estándar de los 3 geles control y de los 3 geles CTR 10⁻⁷M y la tasa de cambio entre ellas (CTR/Control). P calculada mediante t de Student para variables independientes.

4.2.4 Efecto del ácido fosfonofórmico en la calcificación vascular.

El análisis del efecto del ácido fosfonofórmico (PFA) sobre el perfil de expresión de proteínas en las células vasculares (A7r5) se realizó en condiciones calcificantes diferentes (10 mM β -glicerolfosfato [BGP] + 2,5 mM Ca) y a tiempos cortos (menos de 24 horas). En estas condiciones, en las células cultivadas en medio calcificante se observó un aumento en la expresión de RUNX2 a las 24 horas ($p < 0,05$) así como de SOD2 del 45 y del 64% a las 6 y 24 horas, respectivamente ($p < 0,05$). Cuando a las células se les adicionó PFA no se observaron estos aumentos, manteniéndose los niveles de ambas proteínas al nivel de las células control (Figura 16).

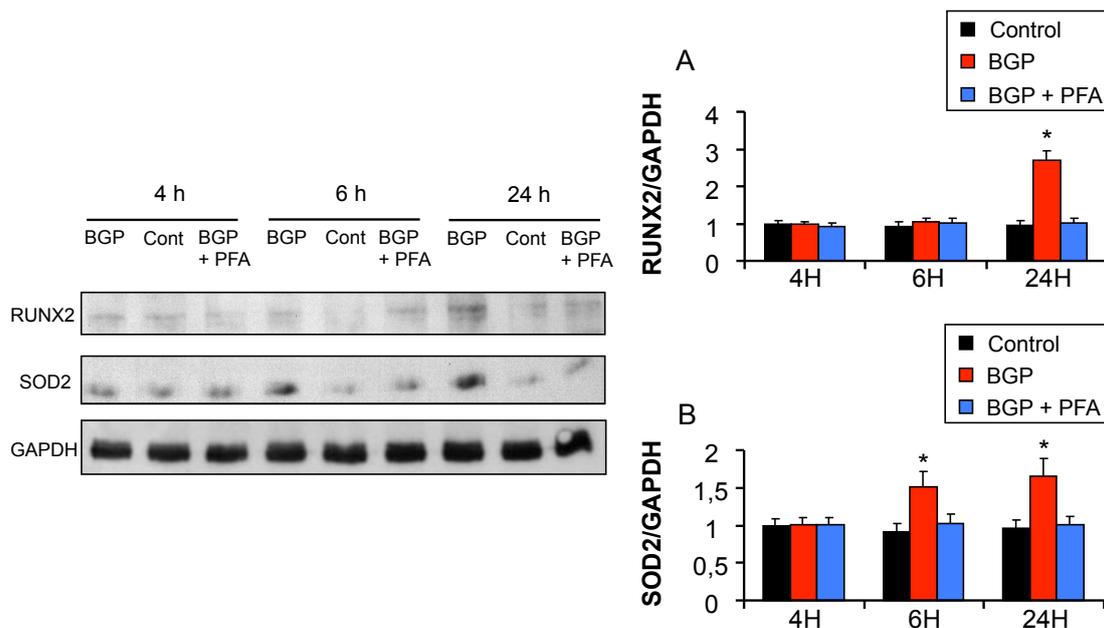


Figura 16: Expresión de las proteínas RUNX2, SOD2 y la constitutiva GAPDH en células vasculares (A7r5) cultivadas en medio control (Cont), en medio con 10 mM β -glicerofosfato + 2,5 mM de calcio (BGP) y en medio BGP + 100 μ M ácido fosfonofórmico (BGP+PFA) durante 4, 6 y 24 horas. A) *Western blots* representativos de RUNX2, SOD2 y GAPDH. B) Cuantificación de las bandas de los *Western blots* para RUNX2 y SOD2 de 3 experimentos normalizadas por los niveles de GAPDH.* $p < 0,05$ frente a su control.

5. DISCUSIÓN:

5.1 Influencia de las variantes génicas de proteínas de la matiz en la calcificación aórtica y en la DMO.

La pérdida de masa ósea y la calcificación vascular son trastornos altamente prevalentes, relacionados con la edad, que conducen a un aumento de la morbilidad y la mortalidad. Aunque tradicionalmente han sido vistos como trastornos independientes, cada vez hay más evidencias epidemiológicas y moleculares de que podrían estar relacionados^{98,99}. De hecho, varios estudios epidemiológicos han demostrado una asociación independiente entre la pérdida de masa ósea y la calcificación vascular^{44,98,100}. Por otra parte, varios estudios moleculares han sugerido que podrían compartir mecanismos patogénicos comunes^{4,101}.

Es sabido que las variaciones genéticas pueden influir en las alteraciones del metabolismo óseo y mineral¹⁰². Por lo tanto, es razonable postular que variantes en los genes implicados en estos procesos puedan ser utilizadas como un indicador tanto de pérdida de masa ósea como de la progresión de la calcificación vascular.

La población utilizada para este estudio presentó unas frecuencias genotípicas y alélicas para los genes estudiados similares a las de otras poblaciones caucásicas (<http://www.ensembl.org>). Así, a pesar de que se ha descrito, mediante análisis de haplotipos, una asociación entre la presencia de osteoporosis y la región 20p12, en la que se encuentra el gen *BMP2*⁶⁵, en nuestra cohorte, al igual que en el estudio de la población de Rotterdam⁶⁶, no se observó asociación entre los portadores del alelo Ala del polimorfismo Ser37Ala de *BMP2* y los valores de DMO. Debe considerarse que la escasa

frecuencia observada para este genotipo en la población caucásica, no permite concluir la presencia o ausencia de asociación.

Las mujeres heterocigotas para el polimorfismo Val667Met de *LRP5* presentaron una mayor tendencia de calcificación aórtica prevalente, lo que no pudo ser confirmado también para la progresión de la calcificación. Si bien en la literatura el genotipo Met-Met se asocia con menores niveles de DMO en mujeres ¹⁰³, en el presente estudio, pese a que la única mujer con ese genotipo presentó niveles menores de DMO en las dos regiones esqueléticas estudiadas, debido al reducido tamaño poblacional no se pudo replicar esa asociación ^{70,71}.

De los genotipos del polimorfismo -1607 1G>2G de *MMP1*, ninguno mostró asociación con la calcificación aórtica. Pese a que se ha descrito que la inhibición de la actividad metaloproteasa atenúa la calcificación aórtica ⁷⁶, se desconoce si dicho polimorfismo funcional puede afectar la aparición y/o la progresión de calcificación vascular. En relación con la masa ósea, el genotipo homocigoto 1G1G, de menor actividad transcripcional que el 2G2G ¹⁰⁴, mostró una tendencia no significativa a presentar mayores niveles de DMO en la cadera en mujeres. Sin embargo, no está claro que las variantes génicas de esta colagenasa alteren la estructura ósea ⁷³.

En cuanto a las variantes genéticas de *MGP*, aunque se ha descrito previamente que un polimorfismo microsatélite en el promotor del gen se asocia con una DMO baja en hueso radial ⁷⁸ y otros polimorfismos se asociaron con la calcificación vascular ^{79,105,106}, hasta este estudio no se había investigado simultáneamente la relación entre los polimorfismos de *MGP*, la pérdida de masa ósea y la progresión de la calcificación vascular.

El polimorfismo -138T>C de *MGP* no mostró ninguna asociación con calcificación aórtica. Estos resultados están en consonancia con lo descrito en otras poblaciones ¹⁰⁷, si bien otros autores han descrito un efecto funcional de este polimorfismo sobre los niveles de expresión de *MGP* ¹⁰⁸. Recientemente, el genotipo -138CC se ha asociado con una menor progresión de la calcificación vascular en población japonesa ¹⁰⁹; sin embargo, sus frecuencias genotípicas muestran diferencias con las de nuestra cohorte, lo que podría explicar esta discrepancia. Los valores de DMO en el cuello del fémur o en la cadera total, de acuerdo con lo descrito anteriormente ¹¹⁰, tampoco mostraron asociación alguna con los genotipos del polimorfismo -138T>C de *MGP*.

En los hombres, los alelos *MGP* -7A y 83Ala en homocigosis se asociaron significativamente con una mayor presencia y una progresión de la calcificación en la aorta. Además, estos mismos genotipos (*MGP*-7AA y 83Ala-ala) se relacionaron con una mayor pérdida de DMO a nivel del cuello del fémur. Si bien la calcificación aórtica también progresó más entre las mujeres homocigotas -7AA y 83Ala-Ala, esta tendencia no llegó a ser significativa. Mientras que una reciente investigación ha confirmado la asociación del genotipo *MGP* 83Ala-Ala con progresión de la calcificación en ambos sexos ¹⁰⁶, otros estudios transversales han observado una asociación de los polimorfismos -7G>A y Thr83Ala de *MGP* con calcificación vascular restringida solo a los hombres ^{79,105}.

Aunque se desconoce la explicación de estas diferencias por sexo, es un hecho bien sabido que las mujeres están protegidas de la calcificación vascular y de la osteoporosis por los estrógenos ¹¹¹. Además, la rápida

desmineralización que ocurre tras la menopausia podría haber enmascarado en parte el efecto genético. De hecho, en nuestra cohorte, el 94% de las mujeres eran posmenopáusicas al comienzo del estudio. Por otra parte, los estrógenos inducen la expresión del gen *MGP* en células con receptores de estrógenos¹¹², pudiendo también de algún modo explicar la menor presencia de calcificación aórtica observada en las mujeres de nuestra cohorte. Además, los hombres desarrollan calcificación vascular antes y con mayor frecuencia y severidad que las mujeres. Por tanto, es razonable justificar que debido a estos factores, sería plausible encontrar una influencia de los polimorfismos genéticos sobre la calcificación aórtica solo en los hombres. Además, en el estudio en el que observaron un efecto en ambos sexos, la población de partida era 14 años más joven y no se tuvo en cuenta la aparición de nuevas calcificaciones para definir la progresión de la calcificación coronaria¹⁰⁶.

El papel de los polimorfismos de *MGP* en la calcificación vascular aún permanece poco claro. Se han publicado resultados de asociación similares a los observados en la población europea, entre hombres homocigotos -7AA y una mayor presencia de calcificación femoral, en la población americana, en la cual se asociaron los homocigotos 83Ala-Ala en ambos sexos con una mayor progresión de la calcificación coronaria^{79,106}. No obstante, también se ha descrito la asociación entre dichos genotipos con menores niveles de calcificación coronaria en la población americana de ascendencia europea¹⁰⁵ y en la población china¹¹³. Cabe destacar que nuestro estudio es prospectivo, lo cual da una mayor validez a los estudios de asociación que los obtenidos mediante estudios transversales. Sin embargo, dichas

discrepancias también pueden ser debidas a diferencias en las frecuencias alélicas y ambientales entre las poblaciones estudiadas.

Hasta la fecha, los estudios de asociación de genoma completo (GWAS) han sido realizados fundamentalmente sobre calcificación coronaria. A pesar de eso, en el único estudio GWAS en el que se analizó de forma colateral la calcificación aórtica, no se observó asociación directa con la región cromosómica del gen *MGP* (12p13.1-p12.3) ¹¹⁴⁻¹¹⁶. Sin embargo, este tipo de estudios no son concluyentes sino solo una herramienta adicional para encontrar asociaciones genéticas que, en cualquier caso, deben ser confirmadas por estudios de replicación específicos en otras poblaciones y / o estudios funcionales.

El estudio reveló que el haplotipo TAG en los hombres se asoció con un mayor riesgo de presencia y progresión de la calcificación aórtica y con una pérdida de DMO en el cuello del fémur. No obstante, se desconoce si las variaciones polimórficas del gen *MGP* (12p13.1-p12.3), asociadas con la calcificación aórtica y la pérdida de DMO, puedan estar en desequilibrio de ligamiento con variantes en otros genes situados a corta distancia, involucrados en el metabolismo óseo como son el receptor del factor de necrosis tumoral tipo 1A (TNFRS1A, 12p13.2), PTHrP (12p12.1-p11.2) o el factor de transcripción osteoblástico Osterix (12q12) ¹¹⁷.

La principal limitación de este estudio de asociación es el reducido tamaño de la población. Sin embargo, y a pesar de ello, hay que destacar su homogeneidad puesto que pertenece a una pequeña región periférica de España, con dificultades de acceso durante siglos, con un rango de edad razonable y con un mismo origen étnico. Si a esto se añade la consistencia

de otros estudios del metabolismo óseo y mineral realizados en esta cohorte, la convierten en suficientemente válida^{98,118-120}.

5.2 Estudios funcionales de los polimorfismos -7G>A y Thr83Ala de MGP.

Debido a su posición en el gen y al hecho de que la base -7G esté conservada entre distintas especies de mamíferos, todo parece indicar que el polimorfismo -7G>A de *MGP* podría afectar a su transcripción. Por un lado, el alelo -7G forma parte de un dinucleótido CpG susceptible de metilación, que no está presente cuando el alelo es -7A, lo cual puede afectar a la regulación transcripcional del gen en las alteraciones del metabolismo óseo y mineral¹²¹.

Por otro lado, los factores de transcripción Ets regulan la transcripción de genes involucrados en la formación del cartílago y del hueso en vertebrados, entre ellos *MGP*¹²². Dado que es una regulación positiva, se deberían observar menores niveles de transcripción de *MGP* cuando está presente el alelo -7A, ya que en ese caso el factor c-Ets carece de sitio de unión en el promotor del gen. Esta hipótesis pudo ser confirmada dado que se observó una actividad promotora disminuida generada por el alelo -7A, al compararlo con el alelo mayoritario -7G, tanto en células vasculares como en células tipo osteoblasto. De acuerdo con la asociación descrita entre el genotipo -7AA y una mayor progresión de la calcificación vascular, se comprobó una menor actividad transcripcional de dicho alelo en las células de tipo óseo, lo cual podría significar una producción disminuida de dicho

inhibidor de la calcificación²³. Sin embargo, estudios funcionales previos en cultivo primario de CMLV de aorta torácica de rata embrionaria (A10) y en una línea celular de pulmón (MR5) no mostraron diferencias significativas entre los alelos⁷⁹; efecto probablemente atribuible a la distinta disponibilidad de factores de transcripción con respecto a la línea celular de aorta torácica de rata (A7r5) analizada.

La variación Thr83Ala de *MGP* es un SNP no sinónimo que conlleva un cambio de treonina (aminoácido de tamaño medio, polar, hidrófilo y sin carga) a alanina (aminoácido de tamaño pequeño, apolar, e hidrofóbico). Mientras que la MGP 83Ala está conservada entre especies de mamíferos, en poblaciones caucásicas, el alelo más frecuente es el que codifica para la MGP 83Thr^{79,106}. El estudio realizado para la estructura secundaria de las moléculas de ARNm en función del cambio Thr83Ala mostró un distinto plegamiento y diferencias en la energía libre de Gibbs (ΔG), lo que podría afectar a la eficiencia de la traducción. Sin embargo, esta posibilidad no pudo ser corroborada en nuestro estudio mediante la transfección de las construcciones pcDNA3-MGP83Thr y pcDNA3-MGP83Ala, debido a la alta tasa de expresión del vector pcDNA3¹²³. Además, el estudio realizado para la estructura secundaria de ambas variantes de la proteína reveló un distinto plegamiento de la región C-terminal, posición en la que se localiza el SNP Thr83Ala. Dado que se ha descrito que la proteína de 84 aminoácidos predicha por la secuencia del mensajero no se encuentra en extractos de la matriz extracelular del hueso, parece probable que se de un procesamiento proteolítico C-terminal de la proteína¹²⁴, que podría también verse afectado por el polimorfismo en esa región.

De acuerdo con estudios previos ¹³, en el presente estudio se ha observado que la sobreexpresión de MGP produjo un menor depósito de calcio en cultivo celular. Aunque no significativas, se pudieron ver diferencias cuando la proteína portaba los distintos alelos. Así, la sobreexpresión con el alelo 83Ala, asociado con pérdida de DMO y con mayor progresión de calcificaciones vasculares, produjo un mayor depósito de calcio. Dicho polimorfismo se ha asociado previamente con calcificación vascular ^{79,105}, insuficiencia renal crónica ¹²⁵ y con cálculos renales ^{126,127}. No obstante, se desconoce el efecto a nivel molecular del cambio Thr83Ala ^{105,125}.

La transcripción del gen *MGP* se regula al alza, entre otros factores, por Ca y Pi (Figura 17) ^{128,129}. Se ha podido observar como el calcio es capaz de producir un aumento en la transcripción de *MGP*, posiblemente de manera adaptativa para contrarrestar el proceso de calcificación vascular ^{60,128,130}. Sin embargo, se ha comprobado cómo la estimulación continuada con calcio conlleva un aumento del estrés en el retículo endoplásmico, orgánulo donde se llevan a cabo las modificaciones postraduccionales de la MGP, afectando a su posterior secreción ¹³¹. Análogamente, el fósforo extracelular también regula al alza la expresión de MGP ¹³²; pudiendo este mecanismo de detección de cationes desempeñar un papel clave en la prevención de la calcificación patológica.

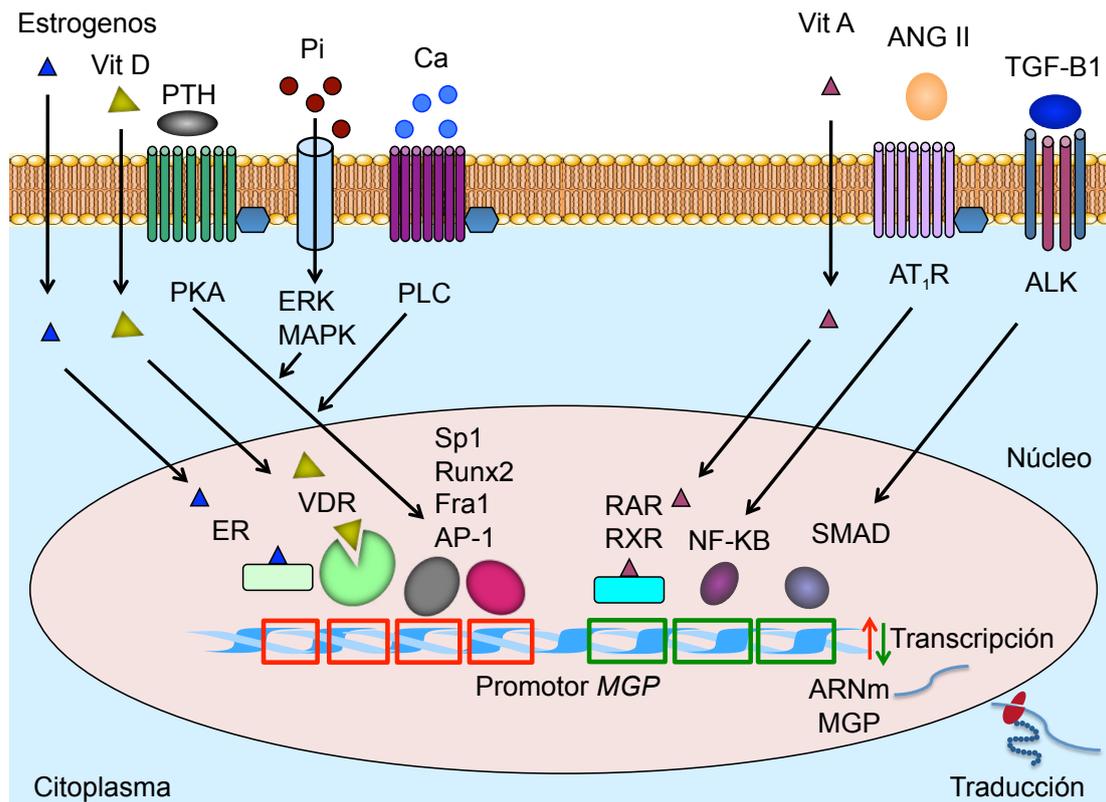


Figura 17: Esquema de la regulación de la transcripción en el promotor del gen *MGP*. Se muestran parte de los factores de transcripción y de las rutas implicadas en su regulación.

La MGP protege frente a factores implicados en calcificación (Figura 18). Se ha explicado la capacidad de inhibición de la calcificación de la MGP mediante la afinidad de los residuos Gla por los fosfatos cálcicos, impidiendo que cristalicen en forma de hidroxiapatita²⁶. También, los residuos Gla de la MGP presentan la capacidad de unión a BMP2¹³³, actuando como antagonista competitivo al impedir su unión al receptor ALK2 y desencadenar su efecto formador de hueso¹³⁴. Por otra parte, se ha descrito que la capacidad de unión de la MGP a BMP4 la convierte en un regulador de la formación del árbol vascular¹³⁵. Además, el hecho de que la MGP se una a

5.3 Calcificación vascular *in vitro*: factores implicados.

La investigación en el área de la calcificación vascular ha despertado un creciente interés debido a su asociación con morbilidad y mortalidad cardiovascular ¹⁴⁰. El efecto de la vitamina D como promotor de la calcificación vascular merece una particular atención, ya que dosis altas de calcitriol se han asociado experimentalmente con un incremento de la calcificación vascular ^{7,141}. Por ello, se ha analizado el perfil de expresión diferencial de las células vasculares *in vitro* sometidas a factores con una reconocida influencia sobre la calcificación vascular.

En el presente estudio y de acuerdo con trabajos previos ^{7,142}, se observó un depósito de calcio significativamente mayor en las células tratadas con calcitriol, frente a las que solo se les adicionó un exceso de calcio y fósforo a los cuatro días. Este efecto puede ser explicado por una parte por el aumento que el calcitriol produce sobre la carga de calcio en las CMLV en cultivo ^{16,143} y por otra parte por el aumento de la expresión del factor de transcripción osteoblástico RUNX2; el cual, ejerce un papel determinante en el cambio fenotípico asociado a la calcificación vascular ¹⁴⁴. También se ha observado un aumento en la transcripción de los genes óseos *ALP* y *OPN* en respuesta al calcitriol y dichas proteínas pueden incrementar el proceso de calcificación vascular *in vitro* ^{7,145}.

De hecho, la administración de dosis altas de calcitriol se ha asociado con calcificación vascular en ratas nefrectomizadas y en ratas con función renal normal, pese a mostrar un aumento similar al producido por sus análogos en los niveles de calcio, fósforo y del producto CaxP ^{17,146,147}. Por el contrario, dosis bajas de calcitriol y de sus análogos no inducen la

calcificación vascular e incluso pueden tener un efecto protector sobre su desarrollo ^{148,149}.

Paralelamente al aumento en la expresión de factores óseos, se ha observado una disminución en la expresión génica de los marcadores musculares transgelina y elastina, en los grupos con exceso de calcio y de fósforo. Dado que las CMLV presentan una elevada plasticidad ¹⁵⁰, los promotores de la calcificación vascular pueden inducir una disminución en la expresión de genes musculares y producir una diferenciación hacia fenotipo óseo, acompañado de un aumento de factores que promueven la calcificación ¹⁵¹.

En los últimos años, se han publicado estudios en el área de la proteómica que describen una asociación entre las alteraciones vasculares y una desregulación de las enzimas que controlan el daño oxidativo y el metabolismo energético ^{152,153}. En nuestro modelo de calcificación vascular *in vitro* inducido por calcitriol, se ha observado una expresión al alza del enzima antioxidante superóxido dismutasa mitocondrial [Mn]. Dicho aumento puede ser un mecanismo compensador que trate de frenar el daño inducido por el aumento de especies reactivas de oxígeno en el proceso de calcificación ^{20,21,154,155}. En esta misma línea, se ha descrito una expresión al alza de la enzima antioxidante superóxido dismutasa nuclear [Cu-Zn], junto con una expresión disminuida de la transgelina (SM22) en válvulas de pacientes con estenosis aórtica ¹⁵⁶. Contrariamente, se ha observado una disminución en la actividad de la superóxido dismutasa mitocondrial en el ventrículo izquierdo hipertrófico causado por dosis altas de vitamina D y nicotina ¹⁵².

Si bien las bases moleculares que regulan la calcificación vascular aún no han sido completamente identificadas, se ha descrito cómo los mecanismos que inducen un aumento del estrés oxidativo en la CMLV pueden modular el proceso de la calcificación vascular al incrementar el daño celular, provocando apoptosis⁶¹, la inducción de la formación de hueso mediante vesículas de matriz¹⁵⁷ y la pérdida de inhibidores de la calcificación^{158,159}.

La investigación sobre la calcificación vascular ha permitido identificar varios marcadores tempranos que podrían ayudar a desarrollar herramientas terapéuticas que ayuden a frenar su progresión¹⁶⁰. Por ejemplo, los bisfosfonatos han mostrado ser capaces de reducir la calcificación vascular en modelos experimentales^{161,162}. Por otra parte, se ha descrito una correlación entre la formación de hueso y la inhibición de la calcificación vascular, sugiriendo que los bisfosfonatos podrían ser capaces de prevenir la calcificación vascular al inhibir la formación de hueso en los vasos³⁸.

En nuestro caso, al igual que lo descrito por otros autores¹⁶³, el PFA parece ser capaz de prevenir la calcificación vascular. El efecto observado ha sido el de inhibir el aumento en la expresión de la superóxido dismutasa mitocondrial [Mn] y del RUNX2^{21,144}. El PFA es un inhibidor competitivo del transporte renal de fósforo¹⁶⁴, el cual es llevado a cabo principalmente por transportadores de fósforo tipo II¹⁶⁵. Inicialmente, se describió que la inhibición de la calcificación vascular por parte del PFA podría ser a través del bloqueo del transporte de fósforo al interior celular¹⁰, al inhibir los transportadores de Pi dependientes de sodio, como el de tipo III Pit-1. Más recientemente, al interferir la expresión del Pit-1 en las CMLV, se observó

DISCUSIÓN

una inhibición de la calcificación vascular *in vitro* inducida por un exceso de fósforo ⁹. Sin embargo, el bloqueo del transporte de fósforo mediante PFA es escaso en CMLV, dado que dichas células solo expresan los transportadores de Pi tipo III: el Pit-1 y el Pit-2 ⁸. Por otra parte, se ha descrito que el efecto del PFA es el de inhibir el depósito mineral en la calcificación vascular *in vitro* producida por exceso de fósforo ¹⁶³, posiblemente a través de un mecanismo de acción similar al del pirofosfato y al de los bisfosfonatos ^{166,167}, debido a que comparten semejanzas estructurales (Figura 19). De hecho, recientemente se ha observado que el tratamiento con pirofosfato es efectivo en la inhibición de la calcificación vascular en ratones con el síndrome de progeria Hutchinson-Gilford ¹⁵⁹.

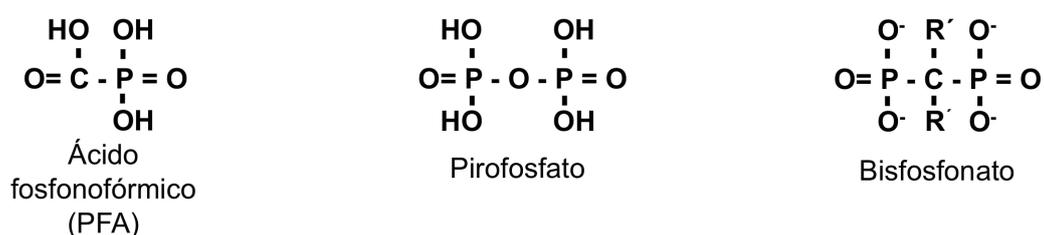


Figura 19: Estructuras químicas del ácido fosfonofórmico, del pirofosfato y de los bisfosfonatos.

En base a los resultados mencionados, parecen necesarios nuevos estudios, tanto epidemiológicos como experimentales, que permitan evaluar el efecto de los nuevos tratamientos disponibles en las alteraciones de los sistemas vascular y óseo ¹⁶⁸.

En resumen, algunos genotipos de *MGP* pueden ser en parte responsables de un mayor riesgo de presencia y progresión de calcificación aórtica y de pérdidas de DMO en el cuello del fémur. Estos resultados se

obtienen, no solo del estudio de asociación genética sino que fueron confirmados con estudios funcionales, tanto a nivel de regulación del promotor como del efecto en el depósito de calcio *in vitro*. Además, dicho proceso está modulado por calcio, fósforo y vitamina D y se asocia con la expresión al alza de genes involucrados en el metabolismo óseo y mineral. Esto se acompaña de un desequilibrio del estado oxidativo en la célula y un descenso de marcadores musculares, pudiendo prevenir dicho efecto la administración de ácido fosfonofórmico.

6. CONCLUSIONES:

1. No se encontraron asociaciones entre los polimorfismos Ser37Ala de *BMP2*, Val667Met de *LRP5*, -1607 1G>2G de *MMP1* y -138T>C de *MGP*, ni con calcificación aórtica ni con cambios en masa ósea.
2. Los genotipos -7AA y 83Ala-Ala de *MGP* se asociaron en hombres con un aumento en la prevalencia y la progresión de la calcificación aórtica y con una pérdida de densidad mineral ósea en el cuello del fémur.
3. La construcción con el alelo -7A de *MGP* presentó menor actividad luciferasa que la del alelo -7G, tanto en células vasculares como en células de tipo osteoblasto.
4. Las dos variantes polimórficas de la proteína MGP, con los aminoácidos Ala o Thr en la posición 83, fueron capaces de inhibir el depósito mineral en células vasculares sometidas a un exceso de calcio y fósforo, sin observarse diferencias significativas entre ellas.
5. Las dosis altas de calcitriol presentaron un efecto aditivo al del calcio y el fósforo en el depósito de calcio en el cultivo celular, que podría ser explicado por el aumento en la expresión de genes inductores de formación ósea.
6. Las dosis altas de calcitriol por sí solas produjeron un aumento en la expresión del enzima antioxidante superóxido dismutasa mitocondrial y pérdida del fenotipo muscular.
7. La adición de ácido fosfonofórmico al cultivo celular previno el aumento tanto de la superóxido dismutasa mitocondrial como del RUNX2 bajo un estímulo calcificante.

7. BIBLIOGRAFÍA:

1. Contiguglia, S.R., Alfrey, A.C., Miller, N.L., Runnells, D.E. & Le Geros, R.Z. Nature of soft tissue calcification in uremia. *Kidney Int* **4**, 229-235 (1973).
2. Schinke, T. & Karsenty, G. Vascular calcification--a passive process in need of inhibitors. *Nephrol Dial Transplant* **15**, 1272-1274 (2000).
3. Moe, S.M. & Chen, N.X. Mechanisms of vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **19**, 213-216 (2008).
4. Cannata-Andia, J.B., Roman-Garcia, P. & Hruska, K. The connections between vascular calcification and bone health. *Nephrol Dial Transplant* **26**, 3429-3436 (2011).
5. Ganesh, S.K., Stack, A.G., Levin, N.W., Hulbert-Shearon, T. & Port, F.K. Association of elevated serum PO(4), Ca x PO(4) product, and parathyroid hormone with cardiac mortality risk in chronic hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* **12**, 2131-2138 (2001).
6. Shroff, R., Knott, C. & Rees, L. The virtues of vitamin D--but how much is too much? *Pediatr Nephrol* **25**, 1607-1620 (2010).
7. Jono, S., Nishizawa, Y., Shioi, A. & Morii, H. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide. *Circulation* **98**, 1302-1306 (1998).
8. Villa-Bellosta, R., Bogaert, Y.E., Levi, M. & Sorribas, V. Characterization of phosphate transport in rat vascular smooth muscle cells: implications for vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 1030-1036 (2007).
9. Li, X., Yang, H.Y. & Giachelli, C.M. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* **98**, 905-912 (2006).
10. Jono, S., *et al.* Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* **87**, E10-17 (2000).
11. Steitz, S.A., *et al.* Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res* **89**, 1147-1154 (2001).
12. Mizobuchi, M., *et al.* Up-regulation of Cbfa1 and Pit-1 in calcified artery of uraemic rats with severe hyperphosphataemia and secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant* **21**, 911-916 (2006).
13. Yao, Y., *et al.* Inhibition of bone morphogenetic proteins protects against atherosclerosis and vascular calcification. *Circ Res* **107**, 485-494 (2010).
14. Hruska, K.A., Mathew, S. & Saab, G. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circ Res* **97**, 105-114 (2005).
15. Cannata-Andia, J.B. & Gomez Alonso, C. Vitamin D deficiency: a neglected aspect of disturbed calcium metabolism in renal failure. *Nephrol Dial Transplant* **17**, 1875-1878 (2002).
16. Inoue, T. & Kawashima, H. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -uptake by cultured vascular smooth muscle cells derived from rat aorta. *Biochem Biophys Res Commun* **152**, 1388-1394 (1988).
17. Bas, A., Lopez, I., Perez, J., Rodriguez, M. & Aguilera-Tejero, E. Reversibility of calcitriol-induced medial artery calcification in rats with intact renal function. *J Bone Miner Res* **21**, 484-490 (2006).
18. Mizobuchi, M., Finch, J.L., Martin, D.R. & Slatopolsky, E. Differential effects of vitamin D receptor activators on vascular calcification in uremic rats. *Kidney Int* **72**, 709-715 (2007).

19. Panizo, S., *et al.* RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. *Circ Res* **104**, 1041-1048 (2009).
20. Al-Aly, Z. Phosphate, oxidative stress, and nuclear factor-kappaB activation in vascular calcification. *Kidney Int* **79**, 1044-1047 (2011).
21. Byon, C.H., *et al.* Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *J Biol Chem* **283**, 15319-15327 (2008).
22. Berkner, K.L. & Runge, K.W. The physiology of vitamin K nutriture and vitamin K-dependent protein function in atherosclerosis. *J Thromb Haemost* **2**, 2118-2132 (2004).
23. Luo, G., *et al.* Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* **386**, 78-81 (1997).
24. Murshed, M., Schinke, T., McKee, M.D. & Karsenty, G. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J Cell Biol* **165**, 625-630 (2004).
25. Shanahan, C.M., Proudfoot, D., Farzaneh-Far, A. & Weissberg, P.L. The role of Gla proteins in vascular calcification. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **8**, 357-375 (1998).
26. Price, P.A., Faus, S.A. & Williamson, M.K. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 1400-1407 (1998).
27. Shanahan, C.M., *et al.* Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation* **100**, 2168-2176 (1999).
28. Munroe, P.B., *et al.* Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome. *Nat Genet* **21**, 142-144 (1999).
29. Proudfoot, D. & Shanahan, C.M. Molecular mechanisms mediating vascular calcification: role of matrix Gla protein. *Nephrology (Carlton)* **11**, 455-461 (2006).
30. Zebboudj, A.F., Shin, V. & Bostrom, K. Matrix GLA protein and BMP-2 regulate osteoinduction in calcifying vascular cells. *J Cell Biochem* **90**, 756-765 (2003).
31. Yao, Y., Nowak, S., Yochelis, A., Garfinkel, A. & Bostrom, K.I. Matrix GLA protein, an inhibitory morphogen in pulmonary vascular development. *J Biol Chem* **282**, 30131-30142 (2007).
32. Son, B.K., Akishita, M., Iijima, K., Eto, M. & Ouchi, Y. Mechanism of pi-induced vascular calcification. *J Atheroscler Thromb* **15**, 63-68 (2008).
33. Cancela, M.L., Conceicao, N. & Laize, V. Gla-rich protein, a new player in tissue calcification? *Adv Nutr* **3**, 174-181 (2012).
34. Cranenburg, E.C., Schurgers, L.J. & Vermeer, C. Vitamin K: the coagulation vitamin that became omnipotent. *Thromb Haemost* **98**, 120-125 (2007).
35. Villa-Bellosta, R. & Sorribas, V. Calcium phosphate deposition with normal phosphate concentration. -Role of pyrophosphate. *Circ J* **75**, 2705-2710 (2011).
36. Okawa, A., *et al.* Mutation in Npps in a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Nat Genet* **19**, 271-273 (1998).
37. Rutsch, F., *et al.* Mutations in ENPP1 are associated with 'idiopathic' infantile arterial calcification. *Nat Genet* **34**, 379-381 (2003).

38. Lomashvili, K.A., Cobbs, S., Hennigar, R.A., Hardcastle, K.I. & O'Neill, W.C. Phosphate-induced vascular calcification: role of pyrophosphate and osteopontin. *J Am Soc Nephrol* **15**, 1392-1401 (2004).
39. Persy, V.P. & McKee, M.D. Prevention of vascular calcification: is pyrophosphate therapy a solution? *Kidney Int* **79**, 490-493 (2011).
40. Sugitani, H., *et al.* Characterization of an in vitro model of calcification in retinal pigmented epithelial cells. *J Atheroscler Thromb* **10**, 48-56 (2003).
41. Grases, F., *et al.* Effect of crystallization inhibitors on vascular calcifications induced by vitamin D: a pilot study in Sprague-Dawley rats. *Circ J* **71**, 1152-1156 (2007).
42. Anderson, J.B., Barnett, E. & Nordin, B.E. The Relation between Osteoporosis and Aortic Calcification. *Br J Radiol* **37**, 910-912 (1964).
43. Kiel, D.P., *et al.* Bone loss and the progression of abdominal aortic calcification over a 25 year period: the Framingham Heart Study. *Calcif Tissue Int* **68**, 271-276 (2001).
44. Schulz, E., Arfai, K., Liu, X., Sayre, J. & Gilsanz, V. Aortic calcification and the risk of osteoporosis and fractures. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 4246-4253 (2004).
45. Bagger, Y.Z., Tanko, L.B., Alexandersen, P., Qin, G. & Christiansen, C. Radiographic measure of aorta calcification is a site-specific predictor of bone loss and fracture risk at the hip. *J Intern Med* **259**, 598-605 (2006).
46. Hofbauer, L.C., Brueck, C.C., Shanahan, C.M., Schoppet, M. & Dobnig, H. Vascular calcification and osteoporosis--from clinical observation towards molecular understanding. *Osteoporos Int* **18**, 251-259 (2007).
47. Uyama, O., Yoshimoto, Y., Yamamoto, Y. & Kawai, A. Bone changes and carotid atherosclerosis in postmenopausal women. *Stroke* **28**, 1730-1732 (1997).
48. Neven, E., De Schutter, T.M., De Broe, M.E. & D'Haese, P.C. Cell biological and physicochemical aspects of arterial calcification. *Kidney Int* **79**, 1166-1177 (2011).
49. Hak, A.E., Pols, H.A., van Hemert, A.M., Hofman, A. & Witteman, J.C. Progression of aortic calcification is associated with metacarpal bone loss during menopause: a population-based longitudinal study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 1926-1931 (2000).
50. Tanko, L.B., *et al.* Relationship between osteoporosis and cardiovascular disease in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* **20**, 1912-1920 (2005).
51. Carr, J.J., *et al.* Calcified atherosclerotic plaque and bone mineral density in type 2 diabetes: the diabetes heart study. *Bone* **42**, 43-52 (2008).
52. Parhami, F., *et al.* Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 680-687 (1997).
53. Gerdhem, P. & Obrant, K.J. Effects of cigarette-smoking on bone mass as assessed by dual-energy X-ray absorptiometry and ultrasound. *Osteoporos Int* **13**, 932-936 (2002).
54. Braam, L.A., *et al.* Beneficial effects of vitamins D and K on the elastic properties of the vessel wall in postmenopausal women: a follow-up study. *Thromb Haemost* **91**, 373-380 (2004).
55. Koh, J.M., *et al.* Higher circulating hsCRP levels are associated with lower bone mineral density in healthy pre- and postmenopausal women: evidence for

- a link between systemic inflammation and osteoporosis. *Osteoporos Int* **16**, 1263-1271 (2005).
56. Sage, A.P., Tintut, Y. & Demer, L.L. Regulatory mechanisms in vascular calcification. *Nat Rev Cardiol* **7**, 528-536 (2010).
 57. Demer, L. & Tintut, Y. The roles of lipid oxidation products and receptor activator of nuclear factor-kappaB signaling in atherosclerotic calcification. *Circ Res* **108**, 1482-1493 (2011).
 58. Davies, M.R. & Hruska, K.A. Pathophysiological mechanisms of vascular calcification in end-stage renal disease. *Kidney Int* **60**, 472-479 (2001).
 59. Demer, L.L. & Tintut, Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation* **117**, 2938-2948 (2008).
 60. Shanahan, C.M., Cary, N.R., Metcalfe, J.C. & Weissberg, P.L. High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* **93**, 2393-2402 (1994).
 61. Proudfoot, D., *et al.* Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res* **87**, 1055-1062 (2000).
 62. Rutsch, F., Nitschke, Y. & Terkeltaub, R. Genetics in arterial calcification: pieces of a puzzle and cogs in a wheel. *Circ Res* **109**, 578-592 (2011).
 63. Peyser, P.A., *et al.* Heritability of coronary artery calcium quantity measured by electron beam computed tomography in asymptomatic adults. *Circulation* **106**, 304-308 (2002).
 64. Chen, D., Zhao, M. & Mundy, G.R. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* **22**, 233-241 (2004).
 65. Stykarsdottir, U., *et al.* Linkage of osteoporosis to chromosome 20p12 and association to BMP2. *PLoS Biol* **1**, E69 (2003).
 66. Medici, M., *et al.* BMP-2 gene polymorphisms and osteoporosis: the Rotterdam Study. *J Bone Miner Res* **21**, 845-854 (2006).
 67. Freedman, B.I., *et al.* Bone morphogenetic protein 7 (BMP7) gene polymorphisms are associated with inverse relationships between vascular calcification and BMD: the Diabetes Heart Study. *J Bone Miner Res* **24**, 1719-1727 (2009).
 68. Boyden, L.M., *et al.* High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* **346**, 1513-1521 (2002).
 69. Gong, Y., *et al.* LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* **107**, 513-523 (2001).
 70. Giroux, S., Elfassihi, L., Cole, D.E. & Rousseau, F. Replication of associations between LRP5 and ESRRA variants and bone density in premenopausal women. *Osteoporos Int* **19**, 1769-1775 (2008).
 71. van Meurs, J.B., *et al.* Large-scale analysis of association between LRP5 and LRP6 variants and osteoporosis. *Jama* **299**, 1277-1290 (2008).
 72. Arakaki, P.A., Marques, M.R. & Santos, M.C. MMP-1 polymorphism and its relationship to pathological processes. *J Biosci* **34**, 313-320 (2009).
 73. Krane, S.M. Is collagenase (matrix metalloproteinase-1) necessary for bone and other connective tissue remodeling? *Clin Orthop Relat Res*, 47-53 (1995).
 74. Hayami, T., Kapila, Y.L. & Kapila, S. MMP-1 (collagenase-1) and MMP-13 (collagenase-3) differentially regulate markers of osteoblastic differentiation in osteogenic cells. *Matrix Biol* **27**, 682-692 (2008).
 75. Hayami, T., Kapila, Y.L. & Kapila, S. Divergent upstream osteogenic events contribute to the differential modulation of MG63 cell osteoblast

- differentiation by MMP-1 (collagenase-1) and MMP-13 (collagenase-3). *Matrix Biol* **30**, 281-289 (2011).
76. Qin, X., Corriere, M.A., Matrisian, L.M. & Guzman, R.J. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates aortic calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 1510-1516 (2006).
 77. Cancela, L., Hsieh, C.L., Francke, U. & Price, P.A. Molecular structure, chromosome assignment, and promoter organization of the human matrix Gla protein gene. *J Biol Chem* **265**, 15040-15048 (1990).
 78. Tsukamoto, K., *et al.* Association of bone mineral density with polymorphism of the human matrix Gla protein locus in elderly women. *J Bone Miner Metab* **18**, 27-30 (2000).
 79. Herrmann, S.M., *et al.* Polymorphisms of the human matrix gla protein (MGP) gene, vascular calcification, and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 2386-2393 (2000).
 80. Brancaccio, D., *et al.* Matrix GLA protein gene polymorphisms: clinical correlates and cardiovascular mortality in chronic kidney disease patients. *Am J Nephrol* **25**, 548-552 (2005).
 81. O'Neill, T.W., Marsden, D., Matthis, C., Raspe, H. & Silman, A.J. Survey response rates: national and regional differences in a European multicentre study of vertebral osteoporosis. *J Epidemiol Community Health* **49**, 87-93 (1995).
 82. Diaz Lopez, J.B., *et al.* [Prevalence of vertebral fracture in population older than 50 years in Asturias (Spain) defined following different radiological criteria]. *Med Clin (Barc)* **115**, 326-331 (2000).
 83. Naves Díaz, M., *et al.* Índices de participación y aspectos metodológicos de interés en un estudio de prevalencia de fractura vertebral en Asturias. *REEMO 1993* **2** (5), 145-148 (1993).
 84. Gómez Alonso C., *et al.* Assessing in a long-term basis the precision error of dual-energy radiography absorptiometry. *Osteoporosis 90* **Vol. 2**, p. 883-884. (1990).
 85. Miller, S.A., Dykes, D.D. & Polesky, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**, 1215 (1988).
 86. Saiki, R.K., *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354 (1985).
 87. Shi, Y.Y. & He, L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci. *Cell Res* **15**, 97-98 (2005).
 88. Tregouet, D.A. & Tiret, L. Cox proportional hazards survival regression in haplotype-based association analysis using the Stochastic-EM algorithm. *Eur J Hum Genet* **12**, 971-974 (2004).
 89. Larkin, M.A., *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948 (2007).
 90. Cartharius, K., *et al.* MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* **21**, 2933-2942 (2005).
 91. Heinemeyer, T., *et al.* Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res* **26**, 362-367 (1998).
 92. Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**, 3406-3415 (2003).

93. Roy, A., Kucukural, A. & Zhang, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* **5**, 725-738 (2010).
94. Connerty, H.V. & Briggs, A.R. Determination of serum calcium by means of orthocresolphthalein complexone. *Am J Clin Pathol* **45**, 290-296 (1966).
95. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408 (2001).
96. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254 (1976).
97. Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. Molecular Cloning. A manual laboratory. *New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989).
98. Naves, M., Rodriguez-Garcia, M., Diaz-Lopez, J.B., Gomez-Alonso, C. & Cannata-Andia, J.B. Progression of vascular calcifications is associated with greater bone loss and increased bone fractures. *Osteoporos Int* **19**, 1161-1166 (2008).
99. McFarlane, S.I., Muniyappa, R., Shin, J.J., Bahtiyar, G. & Sowers, J.R. Osteoporosis and cardiovascular disease: brittle bones and boned arteries, is there a link? *Endocrine* **23**, 1-10 (2004).
100. Frye, M.A., *et al.* Osteoporosis and calcification of the aorta. *Bone Miner* **19**, 185-194 (1992).
101. London, G.M. Bone-vascular cross-talk. *J Nephrol* **25**, 619-625 (2012).
102. Richards, J.B., *et al.* Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet* **371**, 1505-1512 (2008).
103. Giroux, S., Elfassihi, L., Cardinal, G., Laflamme, N. & Rousseau, F. LRP5 coding polymorphisms influence the variation of peak bone mass in a normal population of French-Canadian women. *Bone* **40**, 1299-1307 (2007).
104. Ye, S., Gale, C.R. & Martyn, C.N. Variation in the matrix metalloproteinase-1 gene and risk of coronary heart disease. *Eur Heart J* **24**, 1668-1671 (2003).
105. Crosier, M.D., *et al.* Matrix Gla protein polymorphisms are associated with coronary artery calcification in men. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **55**, 59-65 (2009).
106. Cassidy-Bushrow, A.E., *et al.* Matrix gla protein gene polymorphism is associated with increased coronary artery calcification progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**, 645-651 (2013).
107. Kobayashi, N., Kitazawa, R., Maeda, S., Schurgers, L. & Kitazawa, S. T-138C polymorphism of matrix gla protein promoter alters its expression but is not directly associated with atherosclerotic vascular calcification. *Kobe J Med Sci* **50**, 69-81 (2004).
108. Farzaneh-Far, A., *et al.* A polymorphism of the human matrix gamma-carboxyglutamic acid protein promoter alters binding of an activating protein-1 complex and is associated with altered transcription and serum levels. *J Biol Chem* **276**, 32466-32473 (2001).
109. Yoshikawa, K., *et al.* Polymorphism in the human matrix Gla protein gene is associated with the progression of vascular calcification in maintenance hemodialysis patients. *Clin Exp Nephrol* (2013).
110. Taylor, B.C., *et al.* Matrix Gla protein and osteopontin genetic associations with coronary artery calcification and bone density: the CARDIA study. *Hum Genet* **116**, 525-528 (2005).

111. Osako, M.K., *et al.* Estrogen inhibits vascular calcification via vascular RANKL system: common mechanism of osteoporosis and vascular calcification. *Circ Res* **107**, 466-475 (2010).
112. Sheikh, M.S., Shao, Z.M., Chen, J.C. & Fontana, J.A. Differential regulation of matrix Gla protein (MGP) gene expression by retinoic acid and estrogen in human breast carcinoma cells. *Mol Cell Endocrinol* **92**, 153-160 (1993).
113. Wang, Y., *et al.* Common genetic variants of MGP are associated with calcification on the arterial wall but not with calcification present in the atherosclerotic plaques. *Circ Cardiovasc Genet* **6**, 271-278 (2013).
114. van Setten, J., *et al.* Genome-wide association study of coronary and aortic calcification implicates risk loci for coronary artery disease and myocardial infarction. *Atherosclerosis* **228**, 400-405 (2013).
115. O'Donnell, C.J., *et al.* Genome-wide association study for coronary artery calcification with follow-up in myocardial infarction. *Circulation* **124**, 2855-2864 (2011).
116. Ferguson, J.F., *et al.* Candidate gene association study of coronary artery calcification in chronic kidney disease: findings from the CRIC study (Chronic Renal Insufficiency Cohort). *J Am Coll Cardiol* **62**, 789-798 (2013).
117. Doherty, T.M., *et al.* Calcification in atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11201-11206 (2003).
118. Gomez, C., *et al.* Vitamin D receptor gene polymorphisms, bone mass, bone loss and prevalence of vertebral fracture: differences in postmenopausal women and men. *Osteoporos Int* **10**, 175-182 (1999).
119. Naves, M., Diaz-Lopez, J.B., Gomez, C., Rodriguez-Rebollar, A. & Cannata-Andia, J.B. Determinants of incidence of osteoporotic fractures in the female Spanish population older than 50. *Osteoporos Int* **16**, 2013-2017 (2005).
120. Naves, M., *et al.* The effect of vertebral fracture as a risk factor for osteoporotic fracture and mortality in a Spanish population. *Osteoporos Int* **14**, 520-524 (2003).
121. Laenoi, W., *et al.* Molecular characterization and methylation study of matrix gla protein in articular cartilage from pig with osteochondrosis. *Gene* **459**, 24-31 (2010).
122. Raouf, A. & Seth, A. Ets transcription factors and targets in osteogenesis. *Oncogene* **19**, 6455-6463 (2000).
123. Zhu, M., Yu, P., Jiang, B. & Gu, Y. Investigation of the influence of Arg555Trp and Thr538Pro TGFBI mutations on C-terminal cleavage and cell endoplasmic reticulum stress. *Mol Vis* **18**, 1156-1164 (2012).
124. Hale, J.E., Williamson, M.K. & Price, P.A. Carboxyl-terminal proteolytic processing of matrix Gla protein. *J Biol Chem* **266**, 21145-21149 (1991).
125. Karsli Ceppioglu, S., Yurdun, T. & Canbakan, M. Assessment of matrix Gla protein, Klotho gene polymorphisms, and oxidative stress in chronic kidney disease. *Ren Fail* **33**, 866-874 (2011).
126. Gao, B., *et al.* A polymorphism of matrix Gla protein gene is associated with kidney stones. *J Urol* **177**, 2361-2365 (2007).
127. Lu, X., *et al.* A polymorphism of matrix Gla protein gene is associated with kidney stone in the Chinese Han population. *Gene* **511**, 127-130 (2012).
128. Farzaneh-Far, A., Weissberg, P.L., Proudfoot, D. & Shanahan, C.M. Transcriptional regulation of matrix gla protein. *Z Kardiol* **90 Suppl 3**, 38-42 (2001).

129. Jia, G., Stormont, R.M., Gangahar, D.M. & Agrawal, D.K. Role of matrix Gla protein in angiotensin II-induced exacerbation of vascular calcification. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **303**, H523-532 (2012).
130. Farzaneh-Far, A., Proudfoot, D., Weissberg, P.L. & Shanahan, C.M. Matrix gla protein is regulated by a mechanism functionally related to the calcium-sensing receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **277**, 736-740 (2000).
131. Kapustin, A.N., *et al.* Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization. *Circ Res* **109**, e1-12 (2011).
132. Julien, M., *et al.* Phosphate-dependent regulation of MGP in osteoblasts: role of ERK1/2 and Fra-1. *J Bone Miner Res* **24**, 1856-1868 (2009).
133. Bostrom, K., Tsao, D., Shen, S., Wang, Y. & Demer, L.L. Matrix GLA protein modulates differentiation induced by bone morphogenetic protein-2 in C3H10T1/2 cells. *J Biol Chem* **276**, 14044-14052 (2001).
134. Kaplan, F.S., *et al.* Fibrodysplasia ossificans progressiva. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **22**, 191-205 (2008).
135. Yao, Y., Jumabay, M., Wang, A. & Bostrom, K.I. Matrix Gla protein deficiency causes arteriovenous malformations in mice. *J Clin Invest* **121**, 2993-3004 (2011).
136. Nishimoto, S.K. & Nishimoto, M. Matrix Gla protein C-terminal region binds to vitronectin. Co-localization suggests binding occurs during tissue development. *Matrix Biol* **24**, 353-361 (2005).
137. Kaipatur, N.R., Murshed, M. & McKee, M.D. Matrix Gla protein inhibition of tooth mineralization. *J Dent Res* **87**, 839-844 (2008).
138. Yagami, K., *et al.* Matrix GLA protein is a developmental regulator of chondrocyte mineralization and, when constitutively expressed, blocks endochondral and intramembranous ossification in the limb. *J Cell Biol* **147**, 1097-1108 (1999).
139. Barone, L.M., *et al.* Developmental expression and hormonal regulation of the rat matrix Gla protein (MGP) gene in chondrogenesis and osteogenesis. *J Cell Biochem* **46**, 351-365 (1991).
140. Blacher, J., Guerin, A.P., Pannier, B., Marchais, S.J. & London, G.M. Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension* **38**, 938-942 (2001).
141. Rebsamen, M.C., Sun, J., Norman, A.W. & Liao, J.K. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 induces vascular smooth muscle cell migration via activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Circ Res* **91**, 17-24 (2002).
142. Shalhoub, V., *et al.* Chondro/osteoblastic and cardiovascular gene modulation in human artery smooth muscle cells that calcify in the presence of phosphate and calcitriol or paricalcitol. *J Cell Biochem* **111**, 911-921 (2010).
143. Rajasree, S., Umashankar, P.R., Lal, A.V., Sarma, P.S. & Kartha, C.C. 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor is upregulated in aortic smooth muscle cells during hypervitaminosis D. *Life Sci* **70**, 1777-1788 (2002).
144. Sun, Y., *et al.* Smooth muscle cell-specific runx2 deficiency inhibits vascular calcification. *Circ Res* **111**, 543-552 (2012).
145. Giachelli, C.M., Liaw, L., Murry, C.E., Schwartz, S.M. & Almeida, M. Osteopontin expression in cardiovascular diseases. *Ann N Y Acad Sci* **760**, 109-126 (1995).
146. Hirata, M., *et al.* In subtotaly nephrectomized rats 22-oxacalcitriol suppresses parathyroid hormone with less risk of cardiovascular calcification or

- deterioration of residual renal function than 1,25(OH)₂ vitamin D₃. *Nephrol Dial Transplant* **18**, 1770-1776 (2003).
147. Wu-Wong, J.R., *et al.* Role of phosphorus and vitamin D analogs in the pathogenesis of vascular calcification. *J Pharmacol Exp Ther* **318**, 90-98 (2006).
 148. Li, X., Speer, M.Y., Yang, H., Bergen, J. & Giachelli, C.M. Vitamin D receptor activators induce an anticalcific paracrine program in macrophages: requirement of osteopontin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 321-326 (2010).
 149. Aoshima, Y., *et al.* Vitamin D receptor activators inhibit vascular smooth muscle cell mineralization induced by phosphate and TNF-alpha. *Nephrol Dial Transplant* **27**, 1800-1806 (2012).
 150. Katoh, Y. & Periasamy, M. Growth and differentiation of smooth muscle cells during vascular development. *Trends Cardiovasc Med* **6**, 100-106 (1996).
 151. Tukaj, C., Kubasik-Juraniec, J. & Kraszpuski, M. Morphological changes of aortal smooth muscle cells exposed to calcitriol in culture. *Med Sci Monit* **6**, 668-674 (2000).
 152. Wang, Q.Q., Zhao, X. & Pu, X.P. Proteome analysis of the left ventricle in the vitamin D(3) and nicotine-induced rat vascular calcification model. *J Proteomics* **74**, 480-489 (2011).
 153. Ramos-Mozo, P., *et al.* Proteomic analysis of polymorphonuclear neutrophils identifies catalase as a novel biomarker of abdominal aortic aneurysm: potential implication of oxidative stress in abdominal aortic aneurysm progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**, 3011-3019 (2011).
 154. Sutra, T., *et al.* Superoxide production: a procalcifying cell signalling event in osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells exposed to calcification media. *Free Radic Res* **42**, 789-797 (2008).
 155. Roman-Garcia, P., Barrio-Vazquez, S., Fernandez-Martin, J.L., Ruiz-Torres, M.P. & Cannata-Andia, J.B. Natural antioxidants and vascular calcification: a possible benefit. *J Nephrol* **24**, 669-672 (2011).
 156. Martin-Rojas, T., *et al.* Proteomic profile of human aortic stenosis: insights into the degenerative process. *J Proteome Res* **11**, 1537-1550 (2012).
 157. Giachelli, C.M. Vascular calcification mechanisms. *J Am Soc Nephrol* **15**, 2959-2964 (2004).
 158. Johnson, R.C., Leopold, J.A. & Loscalzo, J. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res* **99**, 1044-1059 (2006).
 159. Villa-Bellosta, R., *et al.* Defective extracellular pyrophosphate metabolism promotes vascular calcification in a mouse model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome that is ameliorated on pyrophosphate treatment. *Circulation* **127**, 2442-2451 (2013).
 160. Cannata-Andia, J.B., Rodriguez-Garcia, M., Carrillo-Lopez, N., Naves-Diaz, M. & Diaz-Lopez, B. Vascular calcifications: pathogenesis, management, and impact on clinical outcomes. *J Am Soc Nephrol* **17**, S267-273 (2006).
 161. Price, P.A., Faus, S.A. & Williamson, M.K. Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**, 817-824 (2001).
 162. Price, P.A., Buckley, J.R. & Williamson, M.K. The amino bisphosphonate ibandronate prevents vitamin D toxicity and inhibits vitamin D-induced

- calcification of arteries, cartilage, lungs and kidneys in rats. *J Nutr* **131**, 2910-2915 (2001).
163. Villa-Bellosta, R. & Sorribas, V. Phosphonoformic acid prevents vascular smooth muscle cell calcification by inhibiting calcium-phosphate deposition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 761-766 (2009).
164. Szczepanska-Konkel, M., Yusufi, A.N., VanScoy, M., Webster, S.K. & Dousa, T.P. Phosphonocarboxylic acids as specific inhibitors of Na⁺-dependent transport of phosphate across renal brush border membrane. *J Biol Chem* **261**, 6375-6383 (1986).
165. Virkki, L.V., Biber, J., Murer, H. & Forster, I.C. Phosphate transporters: a tale of two solute carrier families. *Am J Physiol Renal Physiol* **293**, F643-654 (2007).
166. Fleisch, H., Maerki, J. & Russell, R.G. Effect of pyrophosphate on dissolution of hydroxyapatite and its possible importance in calcium homeostasis. *Proc Soc Exp Biol Med* **122**, 317-320 (1966).
167. Evans, J.R., Robertson, W.G., Morgan, D.B. & Fleisch, H. Effects of pyrophosphate and diphosphonates on the dissolution of hydroxyapatites using a flow system. *Calcif Tissue Int* **31**, 153-159 (1980).
168. Cannata-Andia, J.B., *et al.* New therapies: calcimimetics, phosphate binders and vitamin D receptor activators. *Pediatr Nephrol* **25**, 609-616 (2010).

