

Carrillo López N¹, Tuñón LePoultel D^{1,2}, Quirós Caso C^{1,3}, Rodríguez I¹, Cannata Andía JB¹, Naves Díaz M¹

¹ Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral - Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica - Red de Investigación Renal del Instituto de Salud Carlos III (REDinREN del ISCIII) - Universidad de Oviedo - Oviedo (España)

² Laboratorio de Bioquímica - Hospital 12 de Octubre - Madrid (España)

³ Laboratorio de Medicina - Hospital Universitario Central de Asturias - Oviedo (España)

Efecto de dosis suprafisiológicas de calcitriol sobre la expresión proteica de células de músculo liso vascular

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2017000400005>

Correspondencia: Jorge Cannata Andía - Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral - Hospital Universitario Central de Asturias - Avenida de Roma, s/n - 33011 Oviedo (España)

Correo electrónico: cannata@hca.es

Fecha de recepción: 31/03/2017

Fecha de aceptación: 16/05/2017

Trabajo premiado con una beca FEIOMM de Investigación Básica 2010.

Resumen

Introducción: El calcitriol, fundamental para mantener la homeostasis del calcio y el fósforo en el organismo, puede perjudicar al sistema vascular a dosis elevadas, aumentando el riesgo de calcificación.

Objetivo: Evaluar la expresión diferencial de proteínas en células de músculo liso vascular sometidas a una dosis suprafisiológica de calcitriol.

Material y métodos: Se cultivaron células de músculo liso vascular de rata (SMAC-R) en presencia de 10^{-7} M de calcitriol durante 10 días. Se valoró el cambio de fenotipo muscular a óseo mediante actividad fosfatasa alcalina, inmunocitoquímica, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qPCR) y Western blot. Mediante electroforesis bidimensional y espectrometría de masas se evaluó el patrón diferencial de proteínas en presencia y ausencia de 10^{-7} M de calcitriol.

Resultados: La exposición a una dosis alta de calcitriol disminuyó significativamente la expresión génica de elastina y la expresión génica y proteica de α -actina, aumentado la expresión génica de osteocalcina y Runx2 y la proteica de osteoprotegerina.

A nivel proteómico se identificaron 10 proteínas diferencialmente expresadas, destacando el aumento en superóxido dismutasa mitocondrial, proteínas del citoesqueleto, de formación de vesículas y del inflammasoma. Por el contrario, hubo 4 proteínas que disminuyeron su expresión, destacando alguna de tipo muscular.

Conclusiones: En un modelo de células de músculo liso vascular sometidas a una dosis suprafisiológica de calcitriol se observó un aumento de expresión de proteínas del citoesqueleto, que forman vesículas de matriz y que participan en depurar radicales libres y en la respuesta inflamatoria. La pérdida de fenotipo muscular se vio representada por descensos en la expresión de proteínas típicamente musculares.

Palabras clave: *calcificación vascular, calcitriol, proteómica.*

Effect of supra-physiological calcitriol doses on protein expression of vascular smooth muscle cells

Summary

Introduction: Calcitriol, essential for maintaining calcium and phosphorus homeostasis in the body, may damage the vascular system in high doses, increasing the risk of calcification.

Objective: To assess the differential expression of proteins in vascular smooth muscle cells subjected to a supra-physiological dose of calcitriol.

Material and methods: Rat vascular smooth muscle cells (VSMC-R) were cultured in the presence of 10^{-7} M calcitriol for 10 days. The change of muscle to bone phenotype was assessed by alkaline phosphatase activity, immunocytochemistry, quantitative polymerase chain reaction in time (QPCR) and Western blot analysis. By means of two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry was evaluated for the differential protein pattern in presence and absence of 10^{-7} M calcitriol.

Results: Exposure to a high dose of calcitriol decreased elastin gene expression and the protein and gene expression of α -actin protein, increased gene expression of osteocalcin and Runx2 and expression of osteoprotegerin protein. At the proteomic level, 10 differentially expressed proteins were identified, highlighting the increase in mitochondrial superoxide dismutase, cytoskeleton proteins, vesicle formation and inflammasome. On the contrary, there were 4 proteins that diminished expression, highlighting some of muscular type.

Conclusions: In a model of vascular smooth muscle cells submitted to a supra-physiological dose of calcitriol an increased expression of cytoskeleton proteins was observed. These proteins form matrix vesicles and participate in clearance of free radicals and in the inflammatory response. The loss of muscle phenotype was represented by decreased expression of typically muscle proteins.

Key words: vascular calcification, calcitriol, proteomics.

Introducción

La calcificación vascular (CV) es una alteración prevalente en el envejecimiento, que se correlaciona con un aumento en la rigidez de los vasos e incremento del riesgo de muerte cardiovascular¹. En la población general, la progresión y la tasa de CV se han asociado con un aumento de riesgo de fracturas y osteoporosis², precediendo las alteraciones vasculares a las alteraciones propias del hueso que se observan más tarde³. Distintos estudios epidemiológicos han mostrado la relación existente entre las alteraciones del metabolismo óseo, la CV y el aumento de la mortalidad⁴.

El mecanismo por el cual se produce la CV resulta complejo. Inicialmente, se pensaba que era un proceso pasivo consistente en una simple precipitación de calcio y fósforo en un microambiente apropiado⁵. Sin embargo, en la actualidad se sabe que, además de este proceso pasivo, hay mecanismos activos que discurren a la par que los primeros. Durante estos procesos activos, las células de músculo liso vascular (CMLV), debido a ciertos promotores de la calcificación, sufren un grado mayor de apoptosis, forman vesículas y finalmente cambian su fenotipo de células musculares lisas a células de tipo osteoblasto, induciendo formación de matriz y también atrayendo factores locales determinantes del proceso de mineralización¹.

La vitamina D, que ejerce su principal efecto fisiológico sobre la homeostasis del calcio y del fósforo, ha sido tradicionalmente usada para el tratamiento y prevención del raquitismo y de la osteomalacia⁶. Se hidroxila en el riñón por acción de la 25-hidroxivitamina D-1 α hidroxilasa dando

lugar al calcitriol, que es el metabolito fisiológico más activo de esta hormona⁷. Desde hace años se conoce que *in vitro* el calcitriol a dosis elevadas induce un incremento de la calcificación en CMLV⁸, de la actividad de la fosfatasa alcalina y una regulación a la baja del péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP)⁹. Estudios posteriores han confirmado el efecto promotor de la calcificación del calcitriol al aumentar el depósito de calcio en la aorta de ratas con función renal normal¹⁰ y al incrementar los niveles de ARN mensajero (ARNm) de las proteínas óseas: Factor de transcripción 2 relacionado con Runt (Runx2), osteocalcina, osteoprotegerina (OPG), receptor activador para el factor nuclear $\kappa\beta$ (RANKL) y proteína morfogenética ósea 4 (BMP4) en la aorta de ratas nefrectomizadas^{11,12}.

Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la expresión diferencial de proteínas que se produce con el efecto calcificante de dosis supra-fisiológicas de calcitriol en un modelo *in vitro* de CMLV.

Material y métodos

Inducción de calcificación vascular por calcitriol

La línea celular de músculo liso vascular de aorta de rata, SMAC-R (*primary culture* DPK-SMAC-R; Pharmakine), fue cultivada 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, estreptomina 100 μ g/mL y glutamina 2 mM (Biochrom AG).

Alcanzada la confluencia necesaria (60%, aproximadamente), las células se cultivaron con medio

de cultivo DMEM F-12 suplementado con 0,1% de albúmina sérica bovina (BSA) en ausencia o presencia de calcitriol (10^{-7} M, Sigma-Aldrich) durante diez días, cambiando el medio de cultivo por medio fresco cada 48 horas. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y cada condición en cada experimento se hizo por triplicado.

Determinación de la actividad fosfatasa alcalina

Las CMLV cultivadas en placas de 24 pocillos con o sin calcitriol 10^{-7} M durante 10 días fueron recogidas, y se cuantificó la actividad de la fosfatasa alcalina midiendo la cantidad de para-nitrofenol fosfato hidrolizado siguiendo las instrucciones del kit utilizado para su determinación (BioAssay Systems).

Inmunocitoquímica

Para evaluar la pérdida del fenotipo vascular, se realizó la inmunocitoquímica de α -actina. Para ello, las CMLV crecieron en un soporte plástico específico para ello (Thermanox) y se expusieron posteriormente a calcitriol 10^{-7} M durante 10 días. Para ello, se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón frente α -actina (CP-47, Calbiochem) y el kit Dako Real™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (Dako).

Análisis de la expresión génica

Para el análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) se extrajo previamente el ARN de las células utilizando Tri Reagent (Ambion) siguiendo un protocolo estándar. A partir de 2 μ g de ARN total, se obtuvo el ADNc utilizando el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cuantificar la expresión relativa de los genes, se utilizó un termociclador modelo Stratagene Mx3005P QPCR System (Agilent Technologies) y reactivos Taqman® (Taqman® Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems). Se utilizaron los ensayos de Applied Biosystems correspondientes a los siguientes genes: α -actina (Rn01759928_g1), elastina (Rn01499782_m1), osteocalcina (Rn01455285_g1) y Runx2 (Rn01512296_m1). Los resultados se normalizaron frente al control endógeno 18S (Eukaryotic 18S rRNA endogenous control reagent, Applied Biosystems). La interpretación de los datos se realizó mediante el método de la comparación del ciclo umbral ($\Delta\Delta Ct$)¹³.

Estudio proteico

Electroforesis bidimensional de proteínas:

Para el estudio de la expresión diferencial de proteínas por electroforesis bidimensional se cultivaron CMLV durante 10 días en ausencia o presencia de calcitriol 10^{-7} M. La extracción de las proteínas totales se realizó homogeneizando las células en un tampón de lisis 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 Bradford¹⁴.

El isoelectroenfoque (separación de las proteínas según su punto isoeléctrico) o primera dimensión, se realizó por triplicado con 150 μ g de proteínas de cada condición en tiras de poliacrilamida deshidratada de 24 cm con un rango de pH 3-10 no lineal (IPG-Strips, GE Healthcare). 24 horas antes del isoelectroenfoque, las tiras se rehidrataron con *DeStreak Rehydration Solution* y anfolitos al 0,5% (ambos de GE Healthcare). El isoelectroenfoque fue realizado en un Ettan IPGphor3 (GE Healthcare), y posteriormente las tiras se lavaron con 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-alquilación de las proteínas.

La segunda dimensión se realizó mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% en una cubeta múltiple (GE Healthcare). Una vez terminada la electroforesis, los geles fueron teñidos con nitrato de plata 0,1% y digitalizados con un densitómetro calibrado GS-800, analizando la diferente intensidad de los *spots* mediante el programa informático PDQuest, ambos de Bio-Rad.

Análisis de la expresión diferencial de proteínas mediante espectrometría de masas:

Los *spots* expresados de manera diferencial en las dos condiciones de cultivo (ausencia o presencia de calcitriol) fueron recortados del gel, troceados y desteñidos en incubación durante 10 minutos con ferrocianuro potásico 30 mM y tiosulfato sódico 100 mM, y deshidratados en acetonitrilo. Finalmente, fueron digeridos con tripsina 13 ng/ μ L 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, Applied Biosystems) y espectrometría de masas por trampa iónica (Q-TRAP, 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.

Análisis proteico mediante Western blot:

Para la confirmación de los resultados obtenidos en la electroforesis bidimensional se utilizó el análisis Western blot. Para ello se extrajeron las proteínas totales de los cultivos en tampón de lisis RIPA y se cuantificaron mediante el método estándar de Bradford (Bio-Rad).

Los diferentes extractos proteicos (30 μ g) se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)¹⁵. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Difluoruro de polivinilideno) (Hybond™ P, GE Healthcare) que se incubó con el anticuerpo primario correspondiente en la dilución adecuada: frente a OPG (sc-8468, Santa Cruz Biotechnology, dilución 1:1.000); frente a α -actina (CP-47, Calbiochem, dilución 1:1.000) y frente a GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) (sc25778, Santa Cruz Biotechnology, 1:5.000). Los

anticuerpos secundarios ligados a peroxidasa fueron los específicos para cada anticuerpo primario (sc-2023, Santa Cruz Biotechnology; y 401215, Calbiochem). Por último, se llevó a cabo la detección mediante el kit *ECL Western Blotting Detection* (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).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software SPSS para Windows 17.0 (SPSS Inc) y se consideraron diferencias significativas aquellas con un p valor menor de 0,05. Los resultados se expresaron como media ± desviación estándar. Las diferencias en la actividad de la fosfatasa alcalina y expresión génica y proteica entre las distintas condiciones de cultivo se evaluaron mediante la t de Student después de comprobar la normalidad de las variables. En el caso de la identificación de proteínas con el programa de búsqueda Mascot, la asunción por el mismo de normalidad de las variables ha impedido evaluar la normalidad o no de las proteínas identificadas.

Resultados

Se analizaron en las CMLV los cambios a nivel fenotípico hacia célula tipo osteoblasto tras mantenerlas en cultivo en presencia o ausencia de calcitriol 10⁻⁷ M durante 10 días. Se observó un incremento significativo de la actividad de la fosfatasa alcalina de dos veces en las células expuestas a calcitriol (Figura 1A). A su vez, se observó mediante inmunocitoquímica un descenso en α-actina en las células expuestas a calci-

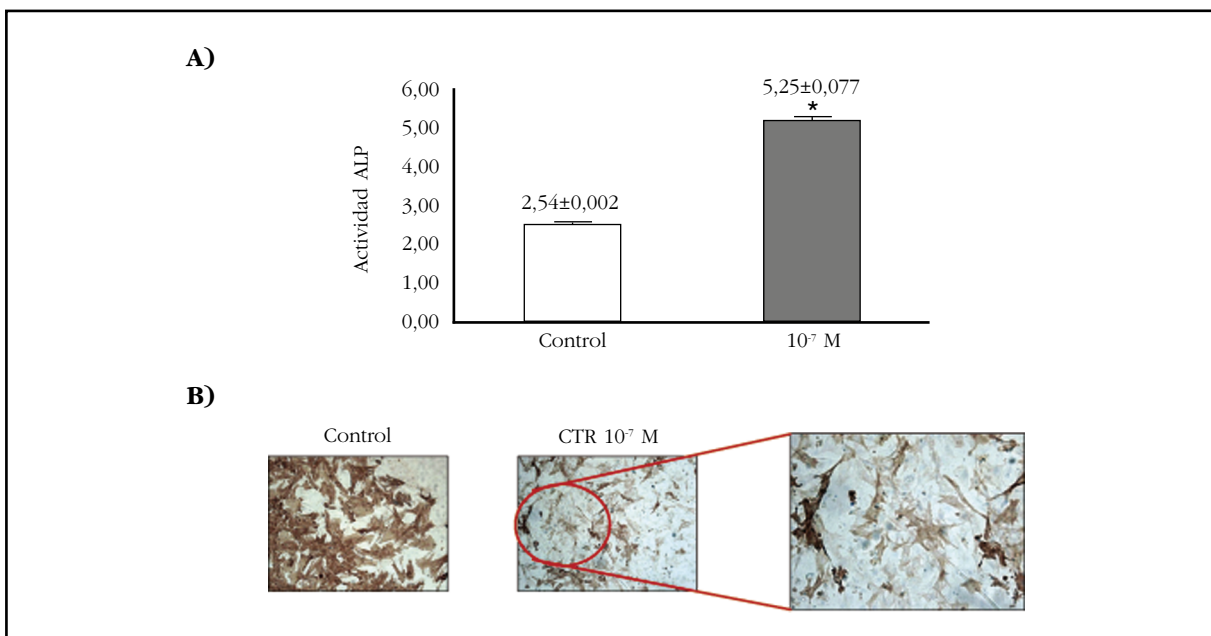
triol, lo que confirma la pérdida del fenotipo muscular con el calcitriol a dosis elevadas (Figura 1B).

El estudio por qPCR de genes musculares y óseos mostró que la exposición a una dosis alta de calcitriol disminuyó significativamente un 35% la expresión génica de α-actina, mientras que para la elastina la supresión fue casi total (99%) (Figuras 2A y 2B). En el caso de los genes típicamente óseos, se observó que la exposición a calcitriol incrementó de manera significativa (13 veces) la expresión génica de osteocalcina, siendo este aumento menor, aunque también significativo, en el caso del Runx2 (2,5 veces) (Figuras 2C y 2D).

Con el fin de comparar el espectro de proteínas expresadas diferencialmente por la exposición de CMLV a calcitriol 10⁻⁷ M durante 10 días (grupo CTR 10⁻⁷ M) con respecto a CMLV en ausencia de calcitriol (grupo Control), se llevó a cabo un análisis proteómico. Se obtuvieron 334 *spots* localizados en cada uno de los 6 geles teñidos con nitrato de plata (3 Control y 3 CTR 10⁻⁷ M), de entre los cuales 22 presentaron diferencias significativas de expresión (p<0,05). De estos, se identificaron por el buscador Mascot 10 *spots* que se muestran en la figura 3.

De las 10 proteínas que fueron identificadas (Figura 3 y Tabla 1), cabe destacar el aumento de expresión en 6 de ellas, entre las que destaca la superóxido dismutasa mitocondrial, marcador de estrés oxidativo, que experimentó un mayor incremento. El resto de proteínas que aumentó su expresión fueron proteínas del citoesqueleto o relacionadas con él (proteína ácida fibrilar glicar y treonina/serina quinasa tipo Ste20), proteínas que participan en la formación de vesículas (dinaminas), proteínas de membrana (ceramida glucosiltransferasa) y proteínas del inflammasoma (pirinas). Por el contrario, se iden-

Figura 1. A) Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP), medida como nmoles de p-nitrofenol fosfato/μg proteína hidrolizados por minuto, en CMLV expuestas a calcitriol durante 10 días. B) Inmunocitoquímica de α-actina en CMLV en ausencia (control) o presencia de calcitriol 10⁻⁷ M (CTR 10⁻⁷ M) durante 10 días. El círculo rojo se representa a mayor aumento a la derecha para ver la diferencia de tinción. *p<0,05 respecto al control



tificaron 4 proteínas que tras la exposición a calcitriol disminuyeron su expresión, destacando por su mayor descenso la actina citoplasmática 2. El otro marcador muscular cuya expresión se vio también disminuida fue la α -actina de músculo liso aórtico. Las otras dos proteínas cuyas expresiones se vieron disminuidas fueron la prolil-4-hidroxilasa, que participa en la maduración de las fibras de colágeno, y la

dipeptidil peptidasa 10 inactiva (DPP10), que forma parte de canales de potasio.

Para confirmar los resultados obtenidos por proteómica se analizó por Western blot la expresión proteica de α -actina, proteína muscular, y de OPG de estirpe ósea. El Western blot mostró que la exposición al calcitriol indujo un descenso en la expresión proteica de α -actina y un incremento de OPG (Figura 4).

Figura 2. Niveles relativos de ARNm de A) α -actina, B) elastina, C) osteocalcina y D) Runx2 en CMLV en ausencia (control) o presencia de calcitriol 10^{-7} M (CTR 10^{-7} M) durante 10 días. * $p < 0,05$ frente a control

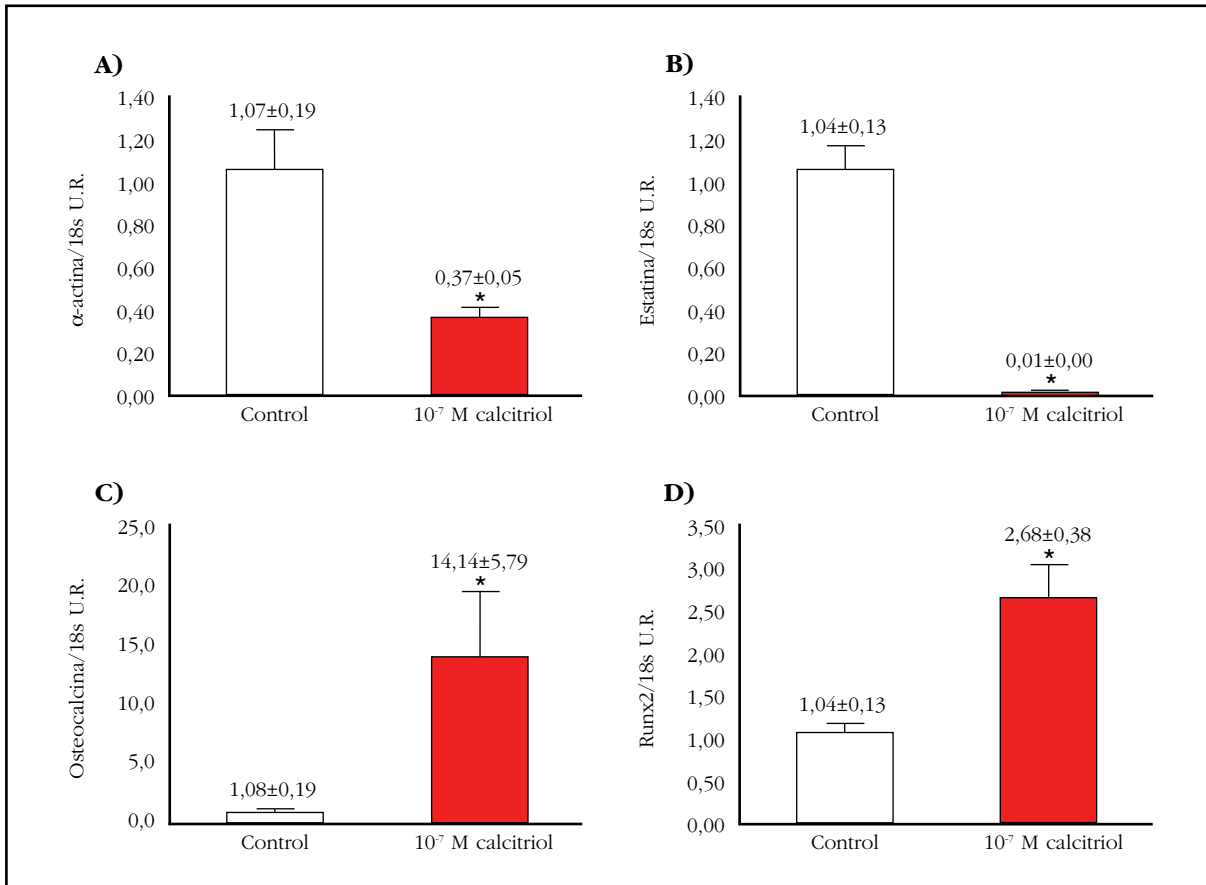


Figura 3. Geles bidimensionales de extractos proteicos de CMLV cultivadas en ausencia (control) o presencia de calcitriol 10^{-7} M (CTR 10^{-7} M) durante 10 días. Se señalan aquellas proteínas expresadas diferencialmente respecto a las células control: en rojo las que muestran aumento y en verde las que disminuyen

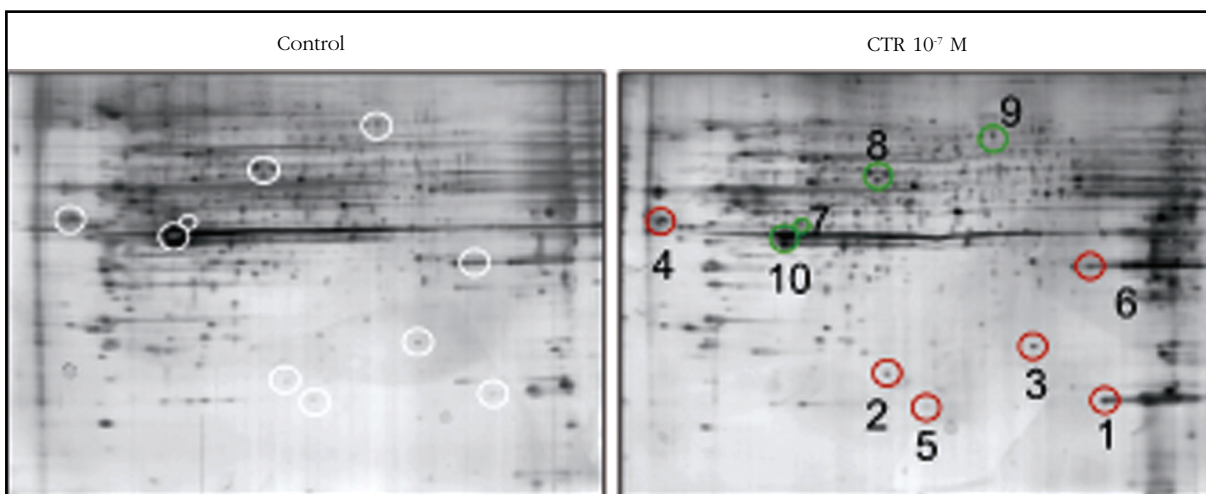


Tabla 1. Listado de proteínas identificadas por el buscador Mascot expresadas diferencialmente en CMLV cultivadas en ausencia (control) o presencia de calcitriol 10⁻⁷ M (CTR 10⁻⁷ M) durante 10 días

Nombre de la proteína	Nº acc.	Nº péptidos	Control	CTR 10 ⁻⁷ M	Tasa de cambio CTR/Control	Valor p
1: Superóxido dismutasa mitocondrial [Mn]	P07895	2	5,5±5,8	15,5±4,2	2,82	0,027
2: Proteína ácida fibrilar glial	Q9UFD0	2	5,1±2,2	13,2±0,8	2,59	0,006
3: Proteína tipo dinamina	O00429	2	6,9±3,5	16,2±6,5	2,35	0,024
4: Serina/treonina quinasa tipo Ste20	Q9H2G2	2	23,4±9,3	54,3±9,4	2,32	0,008
5: Ceramida glucosiltransferasa	Q16739	3	7,6±1,1	14,9±6,6	1,96	0,029
6: Pirina	O15553	1	2,8±4,2	4,5±7,3	1,61	0,041
7: α-actina de músculo liso aórtico	P62738	1	14,1±1,4	6,2±2,1	0,44	0,004
8: Subunidad α1 de la prolil-4-hidroxilasa	P54001	2	23,2±8,1	9,2±2,7	0,39	0,041
9: Dipeptidil peptidasa 10 inactiva	Q8N608	2	33,7±8,1	12,9±8,8	0,38	0,019
10: Actina citoplasmática 2	P63259	8	763±33	208±11	0,27	0,004

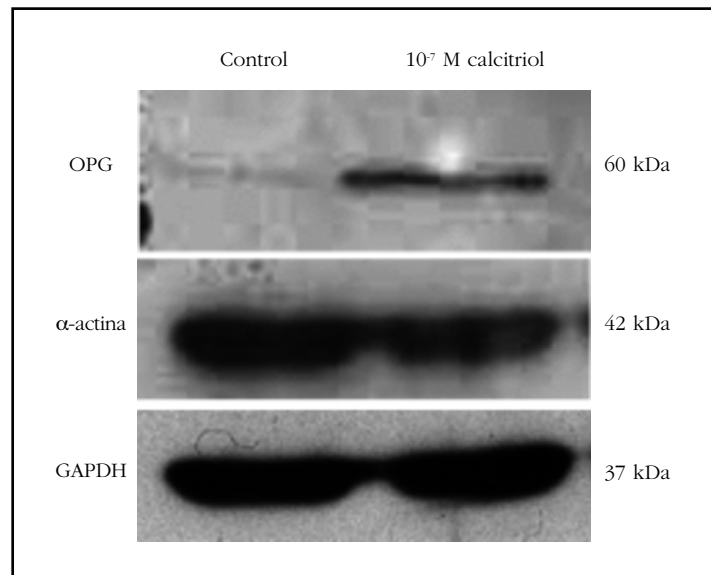
Se muestran los números de acceso de Swissprot (Nº acc.) y el número de péptidos identificados mediante espectrometría de masas (Nº péptidos). Se representa la media de intensidad de los spots ± desviación estándar de los 3 geles control y de los 3 geles CTR 10⁻⁷ M y la tasa de cambio entre ellas (CTR/Control). P calculada mediante t de Student para variables independientes.

Discusión

La investigación en el área de la CV ha despertado un interés creciente debido a su asociación con morbilidad y mortalidad cardiovascular¹⁶. El efecto de la vitamina D como promotor de la CV merece una particular atención, ya que dosis altas de calcitriol se han asociado experimentalmente con un incremento de la CV^{9,17}. Por ello, se ha analizado *in vitro* el perfil de expresión diferencial de proteínas de CMLV sometidas a una dosis suprafisiológica de calcitriol, encontrando por vez primera proteínas que no se habían identificado en este proceso de calcificación mediado por calcitriol.

En el presente estudio y de acuerdo con trabajos previos^{9,18}, se observó un incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina y un descenso de la proteína α-actina en las células expuestas a calcitriol. Este efecto puede ser explicado por el aumento de la expresión del factor de transcripción Runx2, el cual ejerce un papel determinante en el cambio fenotípico asociado a la CV¹⁹. También se ha observado un aumento en la transcripción del gen óseo osteocalcina en respuesta al calcitriol y un aumento en la expresión proteica de OPG²⁰, ambas típicamente óseas. De hecho, la administración de dosis elevadas de calcitriol, similares a las utilizadas en nuestro

Figura 4. Sobreexpresión de osteoprotegerina (OPG) y descenso de α-actina por Western blot en CMLV expuestas a calcitriol 10⁻⁷ M durante 10 días



estudio^{9,21}, se ha asociado con CV tanto en ratas nefrectomizadas como en ratas con función renal normal^{10,21}. Por el contrario, dosis bajas de calcitriol y de sus análogos no inducen CV, e incluso pueden tener un efecto protector sobre su desarrollo^{22,23}.

Paralelamente al aumento en la expresión de factores óseos, se ha observado no solo el descenso en

los niveles de proteína α -actina, sino además una disminución en la expresión génica tanto de α -actina como de elastina, ambos marcadores musculares. Dado que las CMLV presentan una elevada plasticidad²⁴, los promotores de la CV 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 calcificación²⁵.

Tras el análisis por espectrometría de masas de los extractos proteicos obtenidos, se identificaron 10 proteínas. Según donde ejercen su función, las proteínas identificadas se clasificaron en: proteínas del citoesqueleto, que participan en la formación de vesículas, proteínas de membrana, proteínas de matriz extracelular, proteínas del inflammasoma y proteínas relacionadas con el estrés oxidativo. Las proteínas identificadas se distribuyeron mayoritariamente en el citoplasma, pero también en otros orgánulos intracelulares como el retículo endoplasmático (RE), aparato de Golgi y mitocondria.

De las proteínas expresadas diferencialmente e identificadas por LC-MS/MS, seis vieron aumentada su expresión tras el tratamiento con calcitriol respecto al control. La que presentó mayor sobreexpresión fue la superóxido dismutasa o SOD mitocondrial, que es una óxido-reductasa y una de las enzimas antioxidantes más importantes. Dicho aumento podría representar un mecanismo compensador para contrarrestar el daño inducido por el aumento de especies reactivas de oxígeno en el proceso de calcificación²⁶⁻²⁸.

Otra proteína que se observa aumentada en las CMLV expuestas a calcitriol es la proteína ácida fibrilar gliar, una de las proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular²⁹. Esta proteína se encuentra en ciertas células estrechamente relacionada con filamentos de vimentina, desmina y periferina, los cuales están implicados en la estructura y función del citoesqueleto. No hay datos que relacionen a la proteína ácida fibrilar gliar con la CV, pero su aumento podría también representar un mecanismo compensador para evitar la desorganización del citoesqueleto que ocurre en el proceso de CV.

En el presente estudio también se observó un aumento en dinamina, que es una GTPasa responsable de la endocitosis en las células eucariotas. Las dinaminas están involucradas principalmente en la escisión de las vesículas recién formadas de la membrana de un compartimento celular. Este hecho las podría implicar en un fenómeno común e inductor de la CV como es la aparición de vesículas matriz, que se forman a partir de células donde se origina mineralización o son el resultado del proceso de apoptosis celular (cuerpos apoptóticos)³⁰. De hecho, Kashiwakura y cols. han observado que la dinamina es capaz de regular al menos parcialmente la apoptosis inducida por las lipoproteínas de baja densidad oxidadas regulando su endocitosis³¹. Un reciente artículo las ha implicado como un mediador del estrés oxidativo en cardiomiocitos, ayudando a frenar la producción de especies reactivas de oxígeno y de apoptosis³².

Otro grupo de proteínas que aumentó su expresión en CMLV por su exposición a calcitriol fue la treonina/serina quinasa tipo Ste20. Se trata de enzimas implicadas en la orientación y organización de los microtúbulos del huso durante la mitosis³³. Se conoce que esta proteína es un regulador transcripcional de la quinasa poloide Plk1 en el músculo liso³⁴. Un reciente estudio ha observado un incremento de la expresión de esta proteína en aortas de individuos de edad avanzada, sugiriendo que promueve la inestabilidad de los microtúbulos y filamentos de actina³⁵.

La glucosilceramida transferasa (GlcT-1) también aumentó su expresión proteica. Esta proteína se integra en el metabolismo de los esfingolípidos, interviniendo dentro de este en la transferencia de una molécula de glucosa para la glicosilación de la ceramida (acilesfingosina), dando lugar a los compuestos glicolipídicos denominados cerebrósidos y que son importantes componentes de la membrana celular del tejido muscular. Si bien no hay datos en la literatura que relacionen estas enzimas con el proceso de calcificación vascular, existe un trabajo clásico que encuentra la acumulación de glicoesfingolípidos en pacientes fallecidos con placa aterosclerótica, lo que podría sugerir un mecanismo patogénico de alteración del tejido vascular³⁶.

Cabe destacar el aumento de una proteína denominada pirina que forma parte del inflammasoma. El inflammasoma es un conjunto de multiproteínas citosólicas que permite la activación de las caspasas proinflamatorias, las cuales transforman el precursor de la interleukina-1 β (pro-IL-1 β) a la forma activa (IL-1 β), lo que conduce a una poderosa respuesta inflamatoria³⁷. Recientemente, Wen y cols. han descrito que, para que se produzca la calcificación de las CMLV, se requiere que el inflammasoma se active³⁸.

Asimismo, en concordancia con trabajos previos publicados llevados a cabo en modelos *in vitro* de disfunción endotelial y proteómica³⁹, nuestros resultados mostraron un descenso en la expresión de proteínas estructurales y una desregulación de las proteínas del citoesqueleto en las CMLV expuestas a calcitriol a dosis suprafisiológicas. La actina del músculo liso aórtico y la actina citoplasmática 2 son proteínas que juegan un papel fundamental en la arquitectura y motilidad celular. Este hecho podría interpretarse como una pérdida del fenotipo muscular de las CMLV como consecuencia de la exposición a altas concentraciones de calcitriol.

La CV es un proceso patológico regulado que se asemeja a la osteogénesis. Cuando las CMLV de la media se exponen a un estímulo calcificante mantienen su capacidad para diferenciarse en células tipo osteoblasto o condrocito, expresando distintas proteínas óseas, produciendo vesículas de matriz y componentes de la matriz extracelular con propensión a la mineralización⁴⁰.

En nuestros experimentos, además de componentes de la matriz extracelular, se detectó un descenso en proteínas del retículo endoplasmático

rugoso (RER) implicadas en la maduración del colágeno. La prolil-4-hidroxilasa es una enzima que participa en la hidroxilación post-traslacional de la prolina del procolágeno y cuyo descenso inhibe la formación de la triple hélice. Si bien no hay datos de esta enzima sobre la CV, la ausencia de prolil-3-hidroxilasa con la que comparte el mecanismo de hidroxilación de la prolina en el colágeno da lugar a una hipermineralización de la matriz ósea⁴¹.

Por último, una proteína que ha mostrado un descenso es la dipeptidil peptidasa 10 inactiva (DPP10). Esta proteína, que es un importante componente neuronal de los canales de potasio, puede actuar como una chaperona interactuando con otras importantes moléculas de señalización, como hsp90 y proteínas asociadas, pudiendo modular la apoptosis⁴². Por lo tanto, el descenso observado en nuestro estudio en las células expuestas a calcitriol podría ser una consecuencia del cambio en el fenotipo celular observado.

Los resultados de este estudio experimental *in vitro* tienen la limitación de no ser aplicables directamente a humanos, pero sí que deberían alertar del efecto que dosis elevadas de calcitriol, empleadas como tratamiento del hiperparatiroidismo secundario en la enfermedad renal crónica, podrían tener sobre el proceso de calcificación vascular. Aunque en la población normal el riñón tendría capacidad para eliminar los excesos de calcitriol, en su mayoría derivados del tratamiento con 25-hidroxivitamina D y de su conversión renal y extra-renal a calcitriol, cuando el deterioro de la función renal se agrava por el envejecimiento se debería alertar a los clínicos de seguir un control muy estricto, para evitar efectos nocivos que podría tener un calcitriol elevado, aumentando la hipercalcemia e hiperfosforemia y su posterior depósito en el tejido vascular.

La identificación de los *spots* de proteínas está limitada por la cantidad y la calidad (poca concentración de sales, ácidos nucleicos, lípidos, etc.) del extracto proteínico obtenido, lo cual depende directamente de la eficacia del método de extracción⁴³. En nuestro trabajo, además de las proteínas descritas anteriormente identificadas con una alta fiabilidad, según la puntuación obtenida en las diferentes bases de datos de identificación de proteínas, se identificaron también otras proteínas con una baja puntuación que podría ser explicada atendiendo a diferentes razones⁴⁴. Por un lado, la concentración de algunas moléculas puede ser muy inferior respecto a otras mayoritarias en los *spots* cortados. Por otro lado, algunas proteínas pueden haber experimentado modificaciones post-traduccionales o proteólisis, pudiendo alterar la disponibilidad de los péptidos para su identificación. Por último, hay que tener en cuenta que la caracterización del perfil proteico de las células se ha llevado a cabo en un modelo de calcificación que se prolongó hasta los 10 días. Es posible que, en modelos donde la calcificación se establezca en periodos de hasta 3 semanas, los niveles de algunas proteínas pudieran ser más altos y observarse mayores diferencias.

Por tanto, y a modo de resumen, podemos afirmar que hemos objetivado una disminución del fenotipo vascular y un aumento del óseo en CMLV sometidas a una dosis suprafisiológica de calcitriol. Estos cambios fenotípicos dan lugar a un perfil diferencial de proteínas, con aumento de la expresión de proteínas que participan en la depuración de radicales libres y que forman parte del citoesqueleto como un posible mecanismo compensador al proceso de calcificación. También se observó un aumento de proteínas que participan en la formación de vesículas de matriz, así como en un aumento en la respuesta inflamatoria, ambos procesos inherentes a la calcificación vascular. La pérdida de fenotipo muscular se vio representada por descensos en la expresión de proteínas típicamente musculares. Estos resultados deberían ser ratificados en modelos animales con vistas a su utilidad clínica en la prevención de calcificaciones vasculares en población general.

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación obtenida por la beca FEIOMM de investigación básica 2010. Este trabajo ha sido también parcialmente financiado con ayuda del Plan Nacional de I+D+I 2008-2011, Plan Estatal de I+D+I 2013-2016, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) – Fondo Europeo de Desarrollo Regional (PI13/00014), Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación 2013-2017 del Principado de Asturias (GRUPIN14-028), Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (FICYT), Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica, Fundación Renal Íñigo Álvarez de Toledo, RETIC RedInRen del ISCIII – Fondo Europeo de Desarrollo Regional (RD06/0016/1013, RD12/0021/1023 y RD16/0009/0017), por la Sociedad Asturiana Fomento Investigaciones Metabólicas.

Bibliografía

1. Giachelli CM. Vascular calcification mechanisms. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:2959-64.
2. Naves M, Rodríguez-García M, Díaz-Lopez JB, Gomez-Alonso C, Cannata-Andía JB. Progression of vascular calcifications is associated with greater bone loss and increased bone fractures. *Osteoporos Int.* 2008; 19:1161-6.
3. Szulc P, Kiel DP, Delmas PD. Calcifications in the abdominal aorta predict fractures in men: MINOS study. *J Bone Miner Res.* 2008;23:95-102.
4. Rodríguez García M, Naves Díaz M, Cannata Andía JB. Bone metabolism, vascular calcifications and mortality: associations beyond mere coincidence. *J Nephrol.* 2005;4:458-63.
5. Schinke T, Karsenty G. Vascular calcification—a passive process in need of inhibitors. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15:1272-4.
6. Hollick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest.* 2006;116:2062-72.
7. Cannata-Andía JB, Gomez Alonso C. Vitamin D deficiency: a neglected aspect of disturbed calcium meta-

- bolism in renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17:1875-8.
8. 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.* 1988;152:1388-94.
 9. 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.* 1998;98:1302-6.
 10. 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.* 2006;21:484-90.
 11. Mizobuchi M, Finch JL, Martin DR, Slatopolsky E. Differential effects of vitamin D receptor activators on vascular calcification in uremic rats. *Kidney Int.* 2007;72:709-15.
 12. Panizo S, Cardus A, Encinas M, Parisi E, Valcheva P, López-Ongil S, et al. RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. *Circ Res.* 2009;104:1041-8.
 13. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta\text{C(T)}}$ Method. *Methods.* 2001;25:402-8.
 14. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
 15. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1990;227:680-5.
 16. Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, London GM. Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension.* 2001;38:938-42.
 17. Rebsamen MC, Sun J, Norman AW, Liao JK. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 induces vascular smooth muscle cell migration via activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Circ Res.* 2000;91:17-24.
 18. Shalhoub V, Shatzen EM, Ward SC, Young JI, Bedigheimer M, Twehues L, 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.* 2010;111:911-21.
 19. Sun Y, Byon CH, Yuan K, Chen J, Mao X, Heath JM, et al. Smooth muscle cell-specific runx2 deficiency inhibits vascular calcification. *Circ Res.* 2012;111:543-52.
 20. Gori F, Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S, Riggs BL. The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology.* 2000;141:4768-76.
 21. Wu-Wong JR, Noonan W, Ma J, Dixon D, Nakane M, Bolin AL, et al. Role of phosphorus and vitamin D analogs in the pathogenesis of vascular calcification. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;318:90-8.
 22. Li X, Speer MY, Yang H, Bergen J, Giachelli CM. Vitamin D receptor activators induce an anticalcific paracrine program in macrophages: requirement of osteopontin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:321-6.
 23. Aoshima Y, Mizobuchi M, Ogata H, Kumata C, Nakazawa A, Kondo F, et al. Vitamin D receptor activators inhibit vascular smooth muscle cell mineralization induced by phosphate and TNF- α . *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27:1800-6.
 24. Katoh Y, Periasamy M. Growth and differentiation of smooth muscle cells during vascular development. *Trends Cardiovasc Med.* 1996;6:100-6.
 25. Tukaj C, Kubasik-Juraniec J, Kraszpulski M. Morphological changes of aortal smooth muscle cells exposed to calcitriol in culture. *Med Sci Monit.* 2000;6:668-74.
 26. Byon CH, Javed A, Dai Q, Kappes JC, Clemens TL, Darley-Usmar VM, et al. Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *J Biol Chem.* 2008;283:15319-27.
 27. Sutra T, Morena M, Bargnoux AS, Caporiccio B, Canaud B, Cristol JP. Superoxide production: a procalcifying cell signalling event in osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells exposed to calcification media. *Free Radic Res.* 2008;42:789-97.
 28. Roman-Garcia P, Barrio-Vazquez S, Fernandez-Martin JL, Ruiz-Torres MP, Cannata-Andia, JB. Natural antioxidants and vascular calcification: a possible benefit. *J Nephrol.* 2011;24:669-72.
 29. Lewis GP, Matsumoto B, Fisher SK. Changes in the organization and expression of cytoskeletal proteins during retinal degeneration induced by retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36:2404-16.
 30. Kapustin AN, Chatrou MLL, Drozdov I, Zheng Y, Davidson SM, Soong D, et al. Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circ Res.* 2015;116:1312-23.
 31. Kashiwakura Y, Watanabe M, Kusumi N, Sumiyoshi K, Nasu Y, Yamada H, et al. Dynamin-2 regulates oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis of vascular smooth muscle cell. *Circulation.* 2004;110:3329-34.
 32. Gao D, Yang J, Wu Y, Wang Q, Wang Q, Lai EY, et al. Targeting dynamin 2 as a novel pathway to inhibit cardiomyocyte apoptosis following oxidative stress. *Cell Physiol Biochem.* 2016;39:2121-34.
 33. Zhapparova ON, Fokin AI, Vorobyeva NE, Bryantseva SA, Nadezhdina ES. Ste20-like protein kinase SLK (LOSK) regulates microtubule organization by targeting dynactin to the centrosome. *Mol Biol Cell.* 2013;24:3205-14.
 34. Li J, Wang R, Gannon OJ, Rezey AC, Jiang S, Gerlach BD, et al. Polo-like kinase 1 regulates vimentin phosphorylation at Ser-56 and contraction in smooth muscle. *J Biol Chem.* 2016;291:23693-703.
 35. Fu Z, Wang M, Everett A, Lakatta E, Van Eyk J. Can proteomics yield insight into aging aorta? *Proteomics Clin Appl.* 2013;7:477-89.
 36. Chatterjee SB, Dey S, Shi WY, Thomas K, Hutchins GM. Accumulation of glycosphingolipids in human atherosclerotic plaque and unaffected aorta tissues. *Glycobiology.* 1997;7:57-65.
 37. Drenth JPH, van der Meer JWM. The Inflammasome - a linebacker of innate defense. *N Engl J Med.* 2006;355:730-2.
 38. Wen C, Yang X, Yan Z, Zhao M, Yue X, Cheng X, et al. Nalp3 inflammasome is activated and required for vascular smooth muscle cell calcification. *Int J Cardiol.* 2013;168:2242-7.
 39. Carbó C, Arderiu G, Escolar G, Fusté B, Cases A, Carrascal M, et al. Differential expression of proteins from cultured endothelial cells exposed to uremic versus normal serum. *Am J Kidney Dis.* 2008;51:603-12.
 40. Neven E, Persy V, Dauwe S, De Schutter T, De Broe ME, D'Haese PC. Chondrocyte rather than osteoblast conversion of vascular cells underlies medial calcification in uremic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:1741-50.
 41. Fratzl-Zelman N, Bächinger HP, Vranka JA, Roschger P, Klaushofer K, Rauch F. Bone matrix hypermineralization in prolyl-3 hydroxylase 1 deficient mice. *Bone.* 2016;85:15-22.
 42. Tsaprouni L, Ito K, Cookson WO, Moffatt MF, Barnes PJ, Adcock IM. Functional genomics of DPP10. Protein characterization and its association with asthma and COPD. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175:A387.
 43. Gil-Dones F, Martín-Rojas T, López-Almodóvar LF, Juárez-Tosina R, de la Cuesta F, Álvarez-Llamas G, et al. Obtención de un protocolo óptimo para el análisis proteómico de válvulas aórticas humanas sanas y estenóticas. *Rev Esp Cardiol.* 2010;63:46-53.
 44. Bagnato C, Thumar J, Mayya V, Hwang SI, Zebroski H, Claffey KP, et al. Proteomics analysis of human coronary atherosclerotic plaque: a feasibility study of direct tissue proteomics by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 2007;6:1088-102.