

Ana Martín Pardillos

# Estudios sobre la calcificación vascular medial: efecto del envejecimiento, arsénico y fluor

Departamento  
Anatomía Patológica, Medicina Legal y  
Forense y Toxicología

Director/es  
Sorribas Alejaldre, Víctor

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



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

ESTUDIOS SOBRE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR  
MEDIAL: EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO,  
ARSÉNICO Y FLUOR

Autor

Ana Martín Pardillos

Director/es

Sorribas Alejaldre, Víctor

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

Anatomía Patológica, Medicina Legal y Forense y Toxicología

2013

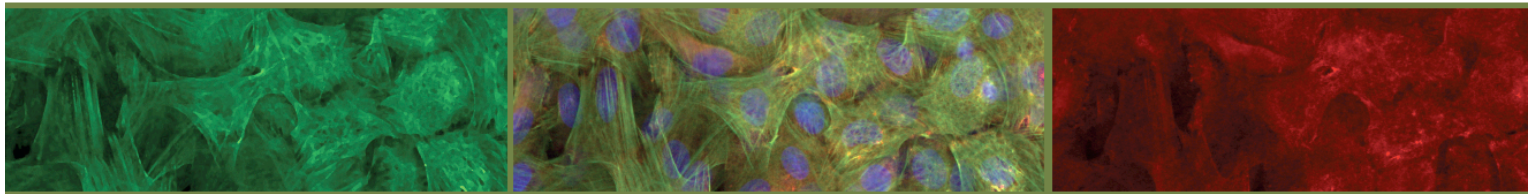




Universidad  
Zaragoza

**Tesis doctoral**

**ESTUDIOS SOBRE LA  
CALCIFICACIÓN VASCULAR  
MEDIAL: EFECTOS DEL  
ENVEJECIMIENTO,  
ARSÉNICO Y FLÚOR**



**Ana Martín Pardillos**







**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA, MEDICINA  
LEGAL Y FORENSE Y TOXICOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIOS SOBRE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR  
MEDIAL: EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO,  
ARSÉNICO Y FLÚOR**

Memoria presentada por Ana Martín Pardillos, Licenciada  
en Veterinaria, para optar al Grado de Doctora por la  
Universidad de Zaragoza, bajo la dirección de Víctor  
Sorribas Alejaldre, Catedrático de Toxicología de la  
Universidad de Zaragoza.

Zaragoza, Febrero de 2013





**Universidad**  
Zaragoza

VÍCTOR SORRIBAS ALEJALDRE, con DNI nº 25136445K, y Catedrático de Toxicología de la Universidad de Zaragoza,

HACE CONSTAR:

Que la memoria de Tesis Doctoral presentada por Doña Ana Martín Pardillos, con el título "**Estudios sobre la calcificación vascular medial: Efectos del envejecimiento, arsénico y flúor**", para optar al grado de Doctora por la Universidad de Zaragoza, ha sido realizada bajo mi dirección, cumple los requisitos necesarios por la legislación vigente, se enmarca dentro de las líneas de investigación seguidas por el candidato durante sus estudios de Tercer Ciclo, coincide con el proyecto de Tesis presentado originalmente, y posee la calidad científica necesaria para la obtención de dicho título.

Y para que así conste, firmo el presente en Zaragoza a 18 de Febrero de 2013

Fdo. Víctor Sorribas Alejaldre



Este trabajo ha sido realizado con la subvención del Ministerio de Educación y Ciencia nº BFU2009-12763 bajo el proyecto “Estudios sobre los transportadores de fosfato inorgánico: fisiología, patología y toxicología” y con un beca predoctoral de investigación del Gobierno de Aragón (referencia B008/09).



Parte del contenido de la presente Tesis doctoral ha sido presentada en los siguientes congresos:

- Arsenic induces premature senescence and vascular calcification, *in vivo* and *in vitro* (Poster). Martín-Pardillos A - Sosa C - Sorribas Víctor. SOT Annual Meeting, 10-14 de Marzo de 2012, San Antonio (TX), EE.UU.
- Fluoride prevents ectopic calcification of vascular cells *in vitro* by modification of pattern of calcification (Poster). Martín-Pardillos A - Millan A - Sorribas Víctor. SOT Annual Meeting, 10-14 de Marzo de 2012, San Antonio (TX), EE.UU.
- Arsenic-induced senescence of vascular smooth muscle cells: Another vasculotoxic mechanism (Poster). Martín-Pardillos A - Sorribas Víctor - Sosa C. EUROTOX 2012, Junio de 2012, Estocolmo, Suecia.
- Fluoride prevents ectopic calcification of vascular cells *in vitro* (Poster). Martín-Pardillos A - Sorribas Víctor - Millan A. EUROTOX 2012, Junio de 2012, Estocolmo, Suecia.

Ha sido publicada en los siguientes artículos:

- Martín-Pardillos A, Sosa C, Sorribas V. Arsenic increases Pi-mediated vascular calcification and induces premature senescence in vascular smooth muscle cells. *Toxicological Sciences*, 2013 Feb; 131 (2): 641-53.

Y será publicada en los siguientes artículos:

- En fase de escritura: Effect of senescence on VSMCs.
- En fase de escritura: Effect of fluoride on ectopic calcification of vascular cells.





## **AGRADECIMIENTOS:**

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a Víctor Sorribas, “mi jefe”, por darme la oportunidad de introducirme en el mundo de la investigación y haberme guiado durante todo este tiempo. Gracias por apoyarme y haber confiado en mí.

También me gustaría dar las gracias a Anabel Alcalde, del departamento de Farmacología y Fisiología, ya que gracias a ella y a Víctor pude disfrutar de la beca de colaboración que me hizo comenzar mi carrera investigadora. Así como por estar dispuesta a ayudar siempre que lo hemos necesitado.

Me gustaría dar las gracias al Gobierno de Aragón por la beca de Formación de Personal Investigador (FPI) que me otorgó para la realización de esta tesis.

También querría dar las gracias a los compañeros de laboratorio: a Eduardo por compartir tanto tiempo de laboratorio, a Lamiaa por acercarme otra cultura y compartir las largas horas de trabajo y las más largas de autobús con una sonrisa, a Luis por estar siempre dispuesto a echar una mano, y especialmente a Yupanqui, ya que fuiste un gran apoyo mi primer verano en el laboratorio y lo has sido durante todo este tiempo, gracias por tu ayuda, tus consejos, tus conocimientos y por tu estupenda compañía.

Me gustaría dar las gracias al resto de compañeras del departamento: Rosa y Carmen, por sus consejos, Cecilia y Natalia por su ayuda y compañía y a María Jesús, gracias por tu inestimable ayuda.

También me gustaría dar las gracias, a mis vecinos de pasillo, los chicos y chicas del departamento de Bioquímica, Juan, Edith, Noe, Marta, Yanick y especialmente a Carol, por hacerme una más de vuestro laboratorio, gracias por todas las risas y los buenos momentos.

A todas mis amigas, por estar ahí. Y a Nacho, por escuchar siempre con una sonrisa e interés mis “cosas de las células”.

Finalmente el otro agradecimiento más importante, a mis padres y mi hermana por todo el apoyo que me habéis dado siempre, sin vosotros esto hubiera sido imposible, un gracias inmenso.



## **ÍNDICE GENERAL**



# ÍNDICE GENERAL

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1. CÉLULAS DEL MÚSCULO LISO VASCULAR DE LA AORTA (VSMCs).....	3
1. 1. Anatomía y fisiología de la aorta.....	3
1. 2. Origen de las células del músculo liso vascular (VSMCs).....	4
1. 3. Patrón de expresión génica de VSMCs.....	5
2. INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA Y SU RELACIÓN CON LA CALCIFICACIÓN VASCULAR .....	7
2. 1. Anatomía y fisiología renal.....	7
2. 2. Insuficiencia renal crónica (IRC) .....	12
2. 2. 1. Epidemiología.....	12
2. 2. 2. Definición.....	12
2. 2. 3. Estadios evolutivos de la enfermedad.....	12
2. 2. 4. Causas de insuficiencia renal crónica (IRC).....	14
2. 2. 5. Fisiopatogenia de la insuficiencia renal crónica.....	14
2. 2. 6. Relación entre insuficiencia renal crónica (IRC) y calcificación vascular.....	15
3. ENVEJECIMIENTO Y SENESCENCIA .....	19
3. 1. Definición de envejecimiento y senescencia.....	19
3. 2. Senescencia celular.....	21
3. 2. 1. Antecedentes históricos.....	21
3. 2. 2. Comportamiento de las células en cultivo.....	22
3. 2. 3. Mecanismos de inducción del proceso de senescencia.....	24
3. 2. 4. Bioindicadores de senescencia.....	28
3. 3. Relación entre envejecimiento, senescencia celular y patologías.....	31
3. 4. Envejecimiento y senescencia celular de la aorta.....	32

3. 4. 1. Envejecimiento y senescencia de las células del musculo liso de la aorta .....	32
3. 4. 2. Relación entre envejecimiento <i>in vivo</i> y calcificación vascular .....	35
3. 4. 3. Relación entre senescencia celular y calcificación vascular .....	37
4. CALCIFICACIÓN DE LA TÚNICA MEDIA DE LA AORTA (ESCLEROSIS DE MÖNCKEBERG).....	39
4. 1. Introducción.....	39
4. 2. Caracterización de las calcificaciones.....	40
4. 2. 1. Fase inorgánica .....	40
4. 2. 2. Matriz calcificante.....	42
4. 3. Implicación de la <i>transdiferenciación</i> de VSMCs en la calcificación medial.....	43
4. 4. Consecuencias patológicas de la calcificación medial.....	51
5. ARSÉNICO.....	51
5. 1. Definición.....	51
5. 2. Fuentes de exposición.....	51
5. 3. Toxicocinética.....	53
5. 4. Toxicidad.....	54
6. FLÚOR.....	55
6. 1. Definición.....	55
6. 2. Toxicocinética.....	55
6. 3. Toxicidad.....	56
6. 4. Relación con la calcificación.....	57
6. 4. 1. Calcificaciones fisiológicas.....	57
6. 4. 2. Calcificaciones vasculares.....	57
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>59</b>
PARTE I. Envejecimiento de las VSMCs.....	61

PARTE II. Influencia del arsénico en la calcificación vascular y senescencia de VSMCs	62
PARTE III. Efecto del flúor sobre la calcificación vascular	64
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>65</b>
1. REACTIVOS	67
2. APARATOS	67
3. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	71
3. 1. Generalidades	71
3. 2. Tratamientos	71
3. 2. 1. Estudios de senescencia inducida por arsénico	71
3. 2. 2. Estudios sobre calcificación	72
4. OBTENCIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS DE MUSCULATURA LISA VASCULAR DE AORTA	76
4. 1. Materiales, reactivos y aparatos	77
4. 2. Procedimiento	77
4. 2. 1. Preparación de la colagenasa	77
4. 2. 2. Procedimiento quirúrgico	77
4. 2. 3. Limpieza de la aorta y extracción de células	78
5. TÉCNICAS BÁSICAS DE CULTIVO CÉLULAR	79
5. 1. Materiales, reactivos y aparatos	79
5. 2. Procedimientos	80
5. 2. 1. Mantenimiento en cultivo	80
5. 2. 2. Tripsinización: pasaje y conservación	80
5. 2. 3. Cálculo de la densidad celular	81
5. 2. 4. Selección del tipo de suero fetal bovino (SFB) usado para el mantenimiento de cultivos celulares	82



6. DISEÑO EXPERIMENTAL: TRATAMIENTOS “ <i>IN VITRO</i> ”	82
6. 1. Determinación de la citotoxicidad	83
6. 1. 1. Citotoxicidad asociada a las diferentes especies de arsénico	83
6. 1. 2. Citotoxicidad asociada a las diferentes concentraciones de flúor	83
6. 2. Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa	83
6. 3. Inmunofluorescencia	84
6. 4. Tratamientos para extracción de proteína y RNA	84
6. 5. Tratamientos empleados en técnicas de ELISA	85
6. 6. Estudios sobre calcificación	85
7. DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD	86
7. 1. Materiales, reactivos y aparatos	87
7. 2. Procedimiento	87
8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA	88
8. 1. Materiales, reactivos y aparatos	89
8. 2. Procedimiento	89
9. INMUNOFLUORESCENCIA	90
9. 1. Materiales, reactivos y aparatos	90
9. 2. Inmunocitología	91
9. 3. Inmunohistología	92
9. 4. Detección de apoptosis – Técnica de TUNEL	93
9. 5. Determinación de la viabilidad celular con bromuro de etidio y naranja de acridina	94
9. 6. Determinación del estrés oxidativo	95
10. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	95
10. 1. Método de BCA	95
10. 1. 1. Materiales, reactivos y aparatos	96
10. 1. 2. Procedimiento	96

10. 2. Método de Bradford .....	97
10. 2. 1. Materiales, reactivos y aparatos .....	97
10. 2. 2. Procedimiento .....	98
11. <i>WESTERN-BLOT</i> : ANÁLISIS INMUNOADSORBENTE .....	98
11. 1. Materiales, reactivos y aparatos .....	98
11. 2. Procedimientos .....	100
11. 2. 1. Extracción de muestras de proteína .....	100
11. 2. 2. Electroforesis .....	100
11. 2. 3. Transferencia .....	100
11. 2. 4. Bloqueo de la membrana .....	100
11. 2. 5. Inmunodetección .....	100
11. 2. 6. Tinciones asociadas a la técnica de <i>Western-blot</i> .....	102
12. ELISA (ANÁLISIS INMUNOADSORBENTE UNIDO A ENZIMA) .....	102
12. 1. Materiales, reactivos y aparatos .....	103
12. 2. ELISA sándwich: cuantificación de interleukina 1 $\beta$ .....	103
12. 3. ELISA directo: cuantificación de proteínas oxidadas (estrés oxidativo) .....	104
13. PURIFICACIÓN DE RNA .....	104
13. 1. Método de filtrado con columnas .....	105
13. 1. 1. Materiales, reactivos y aparatos .....	105
13. 1. 2. Procedimiento .....	105
13. 2. Método de bolas magnéticas .....	106
13. 2. 1. Materiales, reactivos y aparatos .....	106
13. 2. 2. Procedimiento .....	106
14. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN Y CALIDAD DEL RNA EXTRAÍDO .....	107
14. 1. Cuantificación de RNA .....	107
14. 2. Determinación de la calidad del RNA .....	107
15. RETROTRANSCRIPCIÓN DEL RNA EXTRAÍDO .....	107

15. 1. Procedimiento.....	108
16. CUANTIFICACIÓN DEL cDNA MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL.....	108
16. 1. Procedimiento.....	109
17. CUANTIFICACIÓN DE LA CALCIFICACIÓN.....	110
18. TINCIONES ASOCIADAS A CALCIFICACIÓN.....	111
18. 1. Tinción de von Kossa.....	111
18. 1. 1. Materiales, reactivos y aparatos.....	111
18. 1. 2. Procedimiento.....	112
18. 2. Tinción de rojo de alizarina.....	112
18. 2. 1. Materiales, reactivos y aparatos.....	112
18. 2. 2. Procedimiento.....	112
19. ANÁLISIS CRISTALOGRAFICO.....	113
20. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	113
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>115</b>
PARTE I. Envejecimiento de las VSMCs.....	117
I. A. Envejecimiento celular y desdiferenciación de VSMCs.....	117
1. Evolución de los cultivos primarios.....	117
2. Indicadores de envejecimiento de las células en cultivo.....	118
3. Cambios en la expresión de indicadores de células de musculatura lisa vascular.....	123
4. Expresión de indicadores de envejecimiento en función de la edad del animal.....	127
5. Expresión de indicadores de musculatura lisa vascular en función de la edad del animal.....	131
I. B. Factores implicados en la senescencia de VSMCs.....	135

I. C. Relación entre senescencia y calcificación vascular.....	136
1. Expresión de indicadores de calcificación.....	136
2. Efecto de la senescencia sobre la calcificación vascular.....	138
PARTE II. Influencia del arsénico en la calcificación vascular y senescencia de VSMCs.....	140
II. A. Citotoxicidad de las especies de arsénico.....	140
II. B. Efecto del arsénico en la calcificación “ <i>in vitro</i> ”.....	141
II. C. Efecto del arsénico en la calcificación “ <i>in vivo</i> ”.....	144
II. D. Exclusión de mecanismos de toxicidad “ <i>in vitro</i> ” por arsénico.....	148
1. Apoptosis.....	148
2. Estrés oxidativo.....	148
3. Activación de inflammasoma.....	150
II. E. Senescencia prematura inducida por estrés (SIPS) “ <i>in vitro</i> ” e “ <i>in vivo</i> ” por arsénico.....	150
II. F. Arsénico induce desdiferenciación de VSMCs.....	156
PARTE III. Efecto del flúor sobre la calcificación vascular.....	159
III. A. Elección de las dosis de tratamiento con flúor.....	159
III. B. Determinación de la citotoxicidad en el tratamiento “ <i>in vitro</i> ” con flúor.....	159
III. C. Efecto del flúor en la calcificación “ <i>in vitro</i> ”.....	160
III. D. Determinación del mecanismo implicado en la inhibición de la calcificación “ <i>in vitro</i> ” por flúor.....	163
III. E. Expresión “ <i>in vitro</i> ” de genes osteoblásticos en VSMCs tratadas con flúor en presencia de medio calcificante.....	165
III. F. Análisis de los depósitos cálcicos “ <i>in vitro</i> ” por microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM).....	166
1. Estudio comparativo de los depósitos entre VSMCs vivas y muertas.....	166
2. Estudio comparativo de los depósitos en VSMCs muertas en función del tiempo (días) de incubación con medio calcificante (Pi 2 mM) / calcificación.....	173
III. G. Efecto del flúor en la calcificación “ <i>in vivo</i> ”.....	178

<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	<b>183</b>
PARTE I. Envejecimiento de las VSMCs.....	185
I. A. Envejecimiento celular y desdiferenciación de VSMCs.....	185
1. Evolución de los cultivos primarios.....	185
2. Indicadores de envejecimiento de las células en cultivo.....	188
3. Cambios en la expresión de indicadores de células de musculatura lisa vascular.....	190
4. Expresión de indicadores de envejecimiento en función de la edad del animal.....	191
5. Expresión de indicadores de musculatura lisa vascular en función de la edad del animal.....	192
I. B. Factores implicados en la senescencia de VSMCs.....	194
I. C. Relación entre senescencia y calcificación vascular.....	195
1. Expresión de indicadores de calcificación.....	195
2. Efecto de la senescencia sobre la calcificación vascular.....	197
PARTE II. Influencia del arsénico en la calcificación vascular y senescencia de VSMCs.....	198
II. A. Citotoxicidad de las especies de arsénico.....	198
II. B. Efecto del arsénico en la calcificación.....	199
II. C. Exclusión de mecanismos de toxicidad “ <i>in vitro</i> ” por arsénico.....	202
II. D. Senescencia prematura inducida por estrés (SIPS) “ <i>in vitro</i> ” e “ <i>in vivo</i> ” por arsénico.....	202
II. E. Arsénico induce desdiferenciación de VSMCs.....	203
PARTE III. Efecto del flúor sobre la calcificación vascular.....	206
III. A. Elección de las dosis de tratamiento con flúor.....	206
III. B. Determinación de la citotoxicidad en el tratamiento “ <i>in vitro</i> ” con flúor.....	206
III. C. Efecto del flúor en la calcificación “ <i>in vitro</i> ”.....	207
III. D. Determinación del mecanismo implicado en la inhibición de la calcificación “ <i>in vitro</i> ” por flúor.....	208
III. E. Expresión “ <i>in vitro</i> ” de genes osteoblásticos en VSMCs tratadas con flúor.....	

en presencia de medio calcificante.....	209
III. F. Análisis de los depósitos cálcicos “ <i>in vitro</i> ” por microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM).....	210
1. Estudio comparativo de los depósitos entre VSMCs vivas y muertas.....	210
2. Estudio comparativo de los depósitos en VSMCs muertas en función del tiempo (días) de incubación con medio calcificante (Pi 2 mM) / calcificación .....	213
III. G. Efecto del flúor en la calcificación “ <i>in vivo</i> ” .....	215
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>219</b>
<b>VII. REFERENCIAS .....</b>	<b>223</b>



## **I. INTRODUCCIÓN**





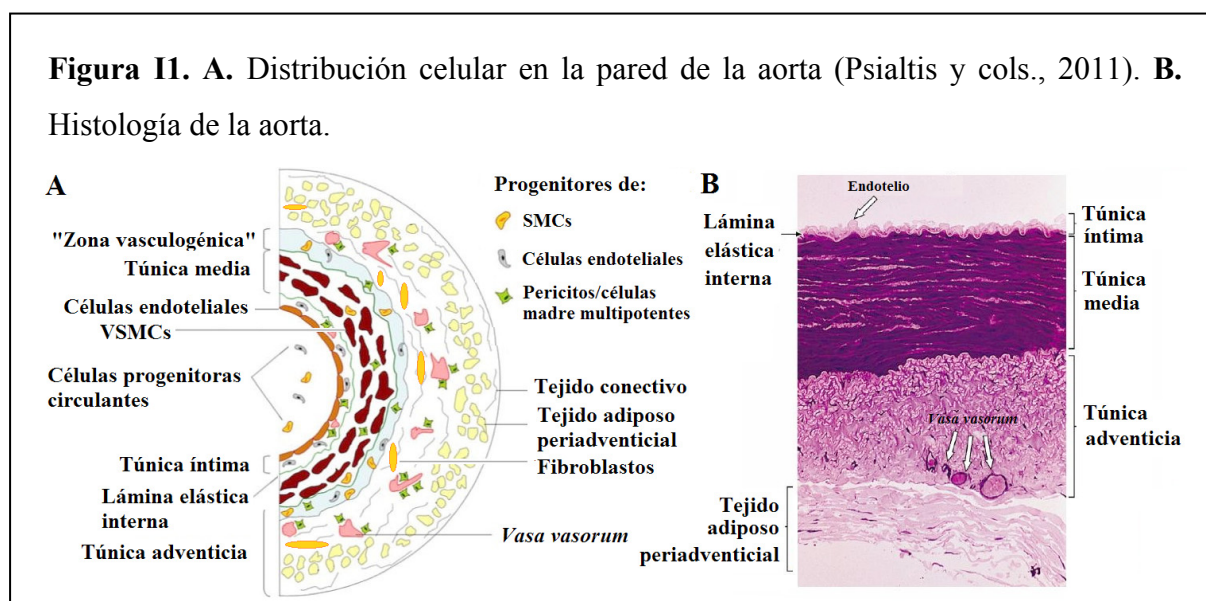
El siguiente trabajo forma parte de la línea de investigación que nuestro grupo ha venido desarrollando durante los últimos años sobre el estudio de la calcificación vascular. Esta tesis doctoral se centra en el estudio de la calcificación vascular en la aorta, principalmente torácica.

## 1. CÉLULAS DEL MÚSCULO LISO VASCULAR DE LA AORTA (VSMCs)

### 1. 1. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DE LA AORTA

La aorta consta de tres capas, túnica íntima, media y adventicia (Figura II). Las células que forman la túnica íntima son las células endoteliales, y en menor medida las del músculo liso vascular, VSMCs (acrónimo internacional, de *Vascular Smooth Muscle Cells*). En la parte más externa de la aorta se encuentra la adventicia, constituida por fibroblastos.

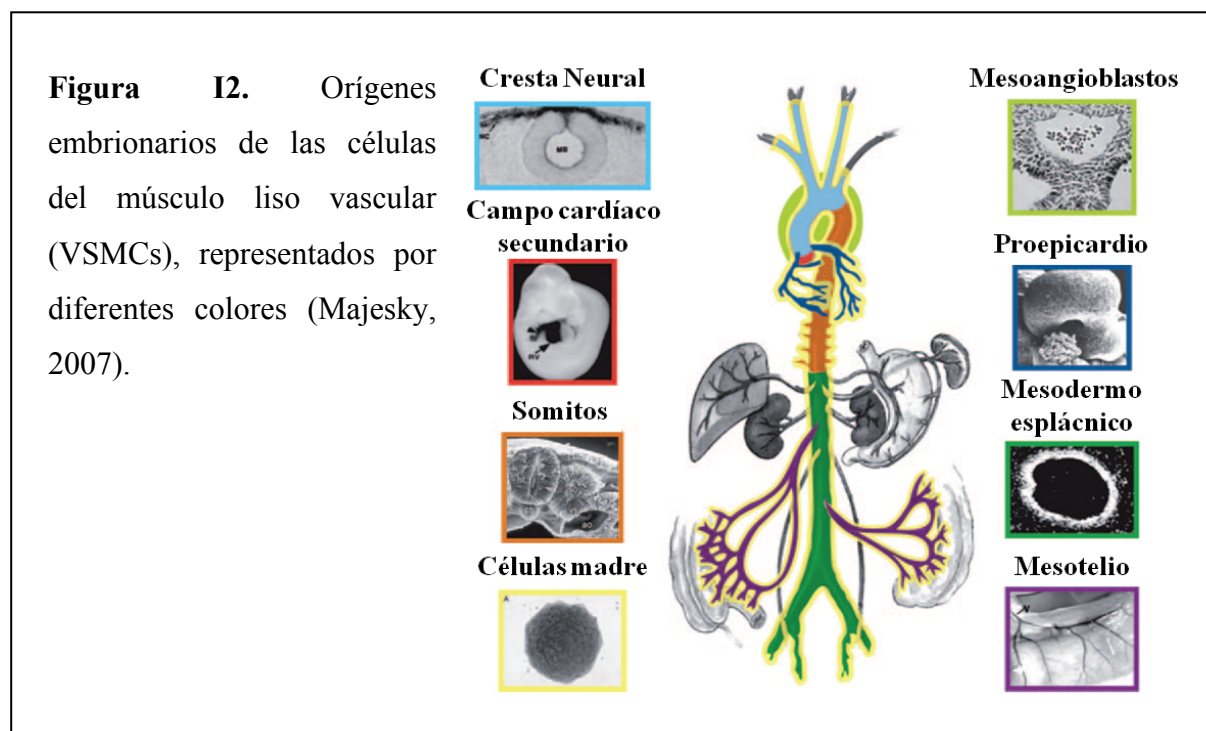
La túnica media de la aorta contiene un único tipo celular, las VSMCs, responsables de muchas funciones en este tejido (Wissler, 1968), como son la biosíntesis de miosina, actina y diferentes tipos de colágeno (Trelstad, 1974), elastina, proteínas microfibrilares (Ross y cols., 1971) y proteoglicanos (Wight y cols., 1975), además de otras funciones específicas y no específicas, como actividad endocítica (Coltoff-Schiller y cols., 1976) o respuestas contráctiles (Chamley y cols., 1977). Varias alteraciones en estas funciones son consecuencia de diversas enfermedades y del envejecimiento de los vasos (Blumenfeld y cols., 1979).



## 1. 2. ORIGEN DE LAS CÉLULAS DEL MÚSCULO LISO VASCULAR (VSMCs)

Uno de los retos a la hora de estudiar los mecanismos de desarrollo y diferenciación de las células del músculo liso (SMCs) es el origen de las VSMC, ya que a diferencia de las células cardíacas y las del músculo esquelético (las cuales son derivadas exclusivamente de precursores específicos del mesodermo), las VSMCs son derivadas de múltiples tipos celulares, y en algunos casos son incluso desconocidos (Kumar y cols., 2003).

Dentro del sistema circulatorio existe una gran variedad de orígenes, no sólo restringidos a diferencias entre los distintos vasos, sino que diferentes fragmentos dentro de un mismo vaso pueden tener diferentes orígenes. Éste es el caso de la aorta, en la que las VSMCs tienen hasta tres orígenes diferentes (Figura I2). En la aorta torácica las células del arco aórtico provienen de la cresta neural (origen ectodérmico). En la aorta dorsal, la cual forma parte de la aorta torácica y se extiende desde el arco aórtico hasta la unión con la aorta abdominal, el origen de las VSMCs son los somitos (origen mesodérmico). En el desarrollo del arco aórtico y el primer fragmento de la aorta dorsal también se ha observado la implicación de los mesoangioblastos. En el caso de la aorta abdominal el origen de sus células es el mesodermo esplácnico (origen mesodérmico). A largo de toda la aorta, además de células provenientes de los orígenes nombrados, aparecen también células madre, identificadas incluso en adultos (Climent y cols., 2005; Majesky, 2007).



Los precursores mesenquimales además de dar lugar a SMC, tanto vasculares (VSMCs) como viscerales, se diferencian en adipocitos, mioblastos, condrocitos y osteoblastos (Iyemere y cols., 2006). Esto es de gran importancia, ya que este origen celular tiene consecuencias patológicas porque, como se ha demostrado, las VSMCs son capaces de sufrir cambios fenotípicos y adquirir un diverso rango de características de otras líneas mesenquimales (Shanahan y cols., 1999; Tintut y cols., 2003; Tyson y cols., 2003; Davies y cols., 2005). Diversos factores locales presentes en ambientes patológicos pueden conducir a una inadecuada diferenciación o incluso *transdiferenciación* (King y cols., 2003), pudiendo estos fenotipos contribuir al desarrollo de patologías como la calcificación (*transdiferenciación osteogénica*), alteración de la producción de la matriz (*transdiferenciación condrogénica*) y acumulación de lípidos en aterosclerosis (*transdiferenciación adipogénica*) (Shanahan y cols., 1999; Iyemere y cols., 2006).

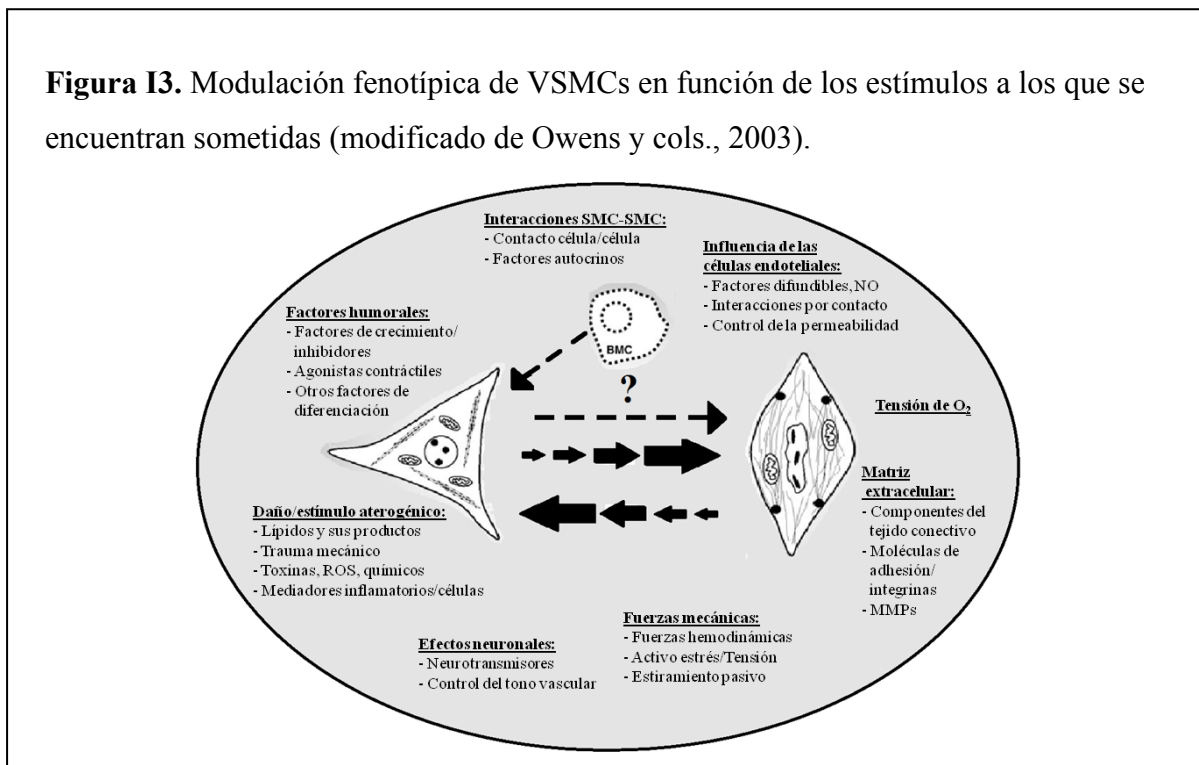
### 1. 3. PATRÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA DE VSMCs

La expresión de bioindicadores génicos de músculo liso está sobreexpresada en VSMCs quiescentes y diferenciadas (fenotipo contráctil), mientras es sub-regulada en VSMCs en proliferación (fenotipo sintético). Esta variabilidad fenotípica se conoce como fenotipo cambiante (Owens y cols., 2004).

Existen evidencias sobre la heterogeneidad de fenotipos de las VSMCs en roedores y humanos, aunque los fenotipos contráctil y sintético inicialmente descritos en cultivo probablemente representen los extremos de un espectro continuo de fenotipos de VSMCs que pueden existir *in vivo* (Shanahan y cols., 1998). Estos fenotipos deben ser determinados por sus diferentes programas de expresión génica. Las VSMCs localizadas en la íntima están asociadas con enfermedades vasculares, y son fenotípicamente distintas a las de la túnica media (Campbell y cols., 1985; Mosse y cols., 1985). Las células intimaes permanecen indiferenciadas, con baja expresión de proteínas contráctiles, pocos miofilamentos y un elevado número de proteínas que contribuyen al desarrollo de la lesión o su estabilidad (Schwartz y cols., 1986, 1995). Hay dos teorías diferentes sobre el origen de los fenotipos inmaduro y diferenciado. Una primera teoría propone que estos fenotipos son reflejo de los dos orígenes embriológicos, mesenquimal y cresta neural (Topouzis y cols., 1996), lo cual está demostrado por la monoclonalidad de las VSMCs intimaes en aterosclerosis (Benditt y cols., 1973; Murry y cols., 1997) y la identificación de clones estables fenotípicamente *in vitro* (Bochaton-Piallat y cols., 1993). La segunda teoría, que no excluye a la primera,

propone que las VSMCs intimaes (fenotipo sintético) derivan de VSMCs maduras mediales (fenotipo contráctil), las cuales sufren modulación fenotípica y migran a la capa íntima con el fin de reparar lesiones en la misma (Weissberg y cols., 1996). Esta teoría se ve apoyada por estudios en los cuales se ha visto que en cultivo las VSMCs pueden sufrir cambios fenotípicos. Pueden exhibirse distintos fenotipos en cultivo según los estímulos a los que estén expuestas (Figura I3), o por ejemplo en función del origen o edad del donante (Bochaton-Piallet y cols., 1996; Chamley-Campbell y cols., 1979; Neuville y cols., 1997). Otro de los cambios fenotípicos, como ya se ha comentado anteriormente, es la *transdiferenciación* hacia fenotipos relacionados con patologías y que son consecuencia de un mismo origen mesenquimal.

**Figura I3.** Modulación fenotípica de VSMCs en función de los estímulos a los que se encuentran sometidas (modificado de Owens y cols., 2003).



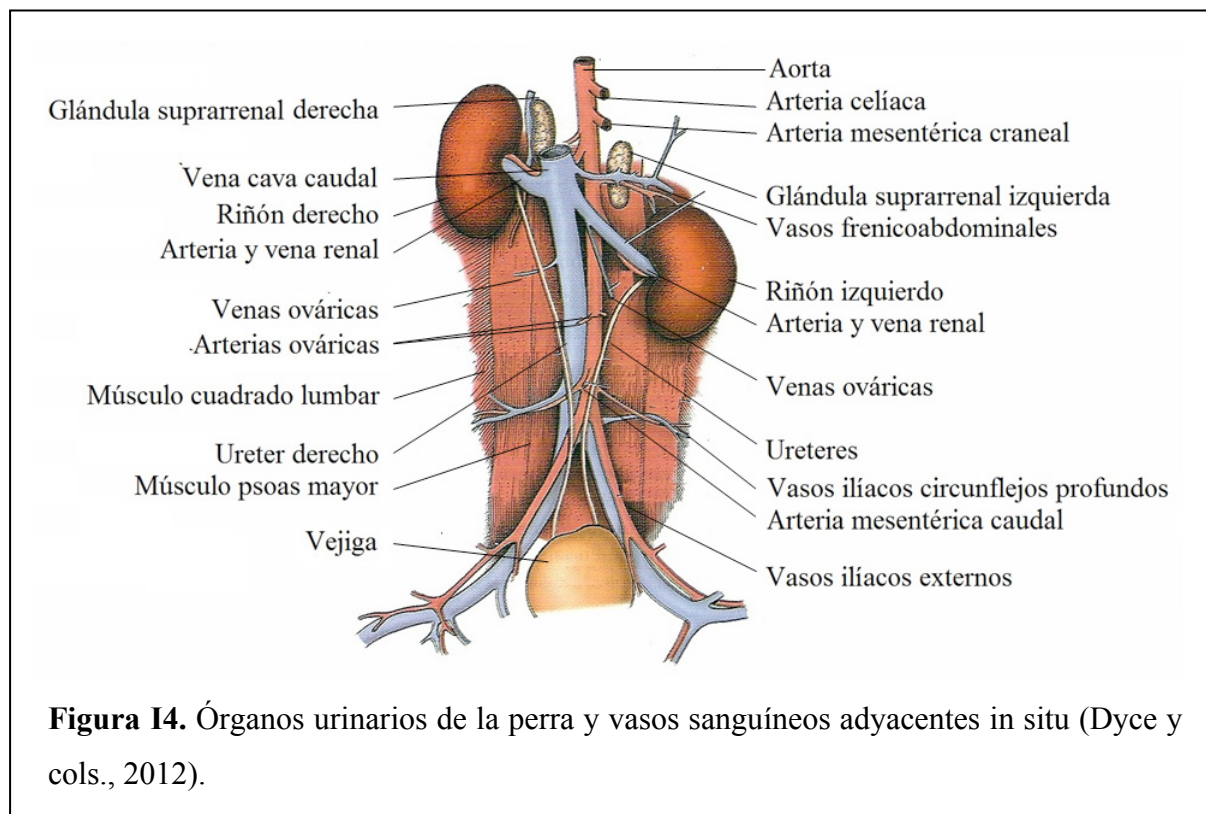
Algunos de los indicadores mejor caracterizados para SMC con fenotipo contráctil incluyen  $\alpha$ -actina,  $\gamma$ -actina, SM-MHC (cadenas pesadas de miosina), calponina, h-caldesmonina,  $\alpha$ -tropomiosina,  $\beta$ -tropomiosina, SM22 $\alpha$ , smoothelina, metavinculina,  $\alpha_1$ -integrina, acuaporina-1, ubiquitina, osteoglicina y MGP. En el fenotipo sintético estos indicadores se encuentran sub-regulados o ausentes. En el caso de la caldesmonina, en el fenotipo contráctil aparece la forma h-caldesmonina y en el desdiferenciado la forma l-caldesmonina. (Shanahan y cols., 1998; Sobue y cols., 1999; Halayko y cols., 2001; Kumar y cols., 2003; Owens y cols., 2003; Yoshida y cols., 2005).

Existe una relación directa entre calcificación vascular e insuficiencia renal crónica y envejecimiento, por lo que es importante realizar una breve introducción sobre la fisiología y patología renal, envejecimiento y posteriormente sobre el tema principal de esta tesis, la calcificación vascular, así como el resto de aspectos tratados, arsénico y flúor.

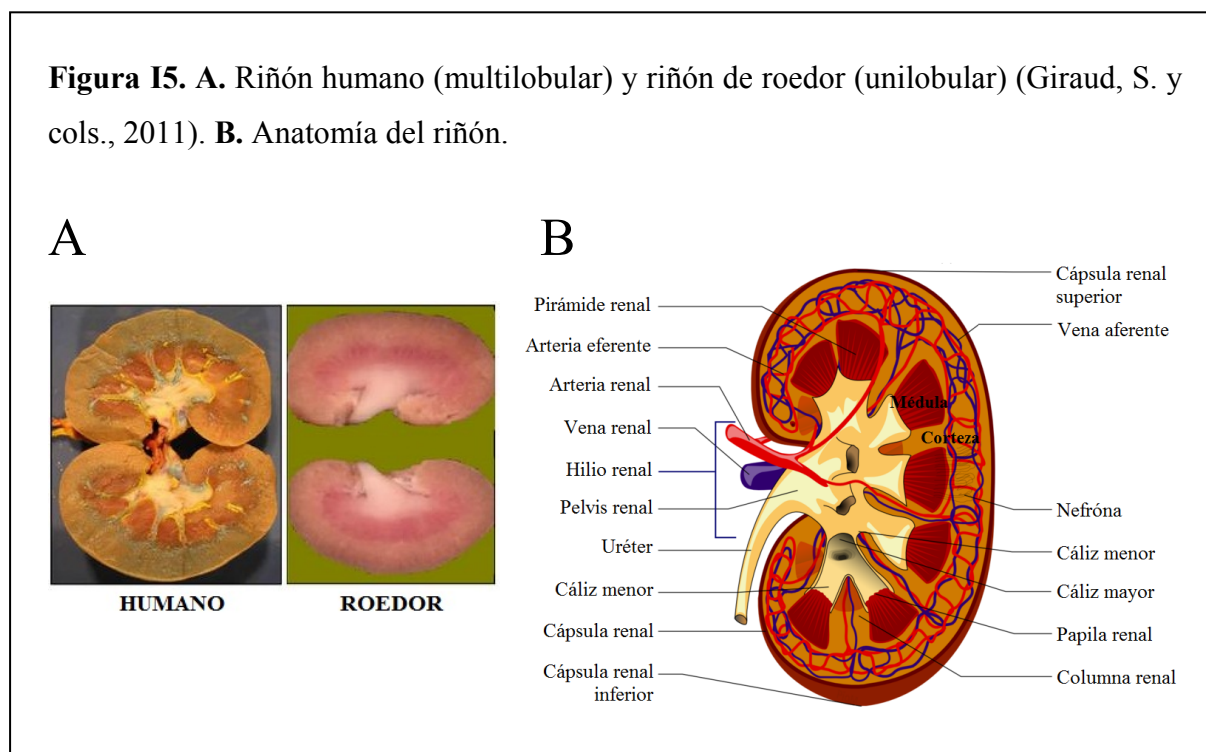
## 2. INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA Y SU RELACIÓN CON LA CALCIFICACIÓN VASCULAR

### 2. 1. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA RENAL

Los riñones son órganos pares, situados en posición retroperitoneal en la parte posterior de la cavidad abdominal, a cada lado de la columna vertebral contra el musculo psoas mayor, en todas las especies de animales domésticos y en el hombre (Figura I4). Cada riñón se sitúa dentro de un repliegue de fascia sublumbar, el cual también contiene una cantidad considerable de grasa, que en ocasiones lo cubre completamente (cápsula adiposa) (Schrier, R. W. y Gottschalk, C. W., 1997; Dyce y cols., 2012).



El margen lateral del riñón es convexo y el margen medial es cóncavo, éste último tiene una escotadura denominada hilio renal. A través del hilio pasan los elementos que constituyen el pedículo renal, los cuales son las ramas de la arteria y vena renal, nervios, vasos linfáticos y la pelvis renal, parte dilatada proximal del uréter. El hilio renal conduce a un espacio aplanado en el interior del riñón, llamado seno renal. En este espacio las ramas de la pelvis renal convergen en los cálices mayor y menor. El corte longitudinal del riñón revela dos regiones claramente diferenciadas, el córtex y la médula. Las pirámides medulares se encuentran rodeadas por el córtex. El riñón humano es multilobular, cada lóbulo está formado por una pirámide medular y el parénquima cortical asociado; mientras que en la rata es unilobular (Figura I5 A). El córtex contiene el 75 % de los glomérulos, los túbulos proximales y distales. El vértice de cada pirámide medular (llamada también papila) se extiende en el seno renal hasta desembocar en el cáliz menor. Las pirámides presentan un aspecto estriado ya que están formadas por segmentos paralelos rectos de túbulos renales (Figura I5 B). El cáliz menor recibe la orina que es liberada desde el sistema colector (Schrier, R. W. y Gottschalk, C. W., 1997).



Los riñones desempeñan diversas tareas por medio de una gran variedad de tipos celulares, dotados cada uno de ellos de diferentes funciones. Estas células se disponen



formando la unidad funcional del riñón, la nefrona, la cual está formada por el corpúsculo renal, constituido por el glomérulo y el aparato yuxtaglomerular (lugar donde se filtra la sangre), y por una porción tubular compleja, donde se produce la reabsorción de sustancias filtradas y el drenaje hasta un sistema tubular unificado. En la corteza renal, las nefronas conectan con el sistema colector, que recorre el riñón y finaliza en el túbulo colector medular interno, donde tienen lugar las últimas modificaciones del líquido para formar la orina (Cunningham, 2005; Schrier, R. W. y Gottschalk, C. W., 1997).

Los túbulos renales se dividen en varias regiones. Presentan dos porciones de trayecto tortuoso (túbulos renales contorneados proximal y distal) y una porción rectilínea denominada asa de Henle (túbulos renales rectos). El aparato yuxtaglomerular, situado en el polo vascular de cada glomérulo consta de células yuxtaglomerulares, células del mesangio, y la mácula densa (Climent y cols., 2005).

El riñón es un órgano de gran importancia en el mantenimiento de la homeostasis. En los mamíferos los riñones reciben aproximadamente el 25 % del gasto cardíaco y esta sangre es filtrada con el fin de eliminar los desechos metabólicos y recuperar las sustancias esenciales para el organismo, entre las que se encuentran el agua, proteínas de bajo peso molecular y diferentes electrolitos. Este órgano es capaz de detectar situaciones de déficit, exceso de agua y/o electrolitos, y modificar sus índices de reabsorción o excreción para mantener la homeostasis. Otra de las funciones de los riñones es el mantenimiento del equilibrio ácido-base, así como la producción de hormonas implicadas en el control de la presión arterial sistémica (renina), en la producción de glóbulos rojos (eritropoyetina), y la metabolización de la vitamina D<sub>3</sub> a su forma activa (Cunningham, 2005).

En la eliminación de desechos, el mantenimiento del equilibrio hidroeléctrico y acidobásico y la producción de hormonas intervienen varios mecanismos (Climent y cols., 2005; Eaton y cols., 2006):

a) Filtración glomerular, pasiva y dependiente de la integridad de los elementos del glomérulo. Permite el paso de agua y sustancias disueltas, como la glucosa, urea, creatinina e iones (de los que los más importantes son sodio, potasio, cloro e hidrogeno), ácido úrico y uratos, así como proteínas de peso molecular inferior a 68 kDa (sobre todo las de carga positiva o neutra, puesto que las de carga negativa son repelidas por las glicoproteínas con carga negativa que forman parte de la membrana basal del glomérulo).

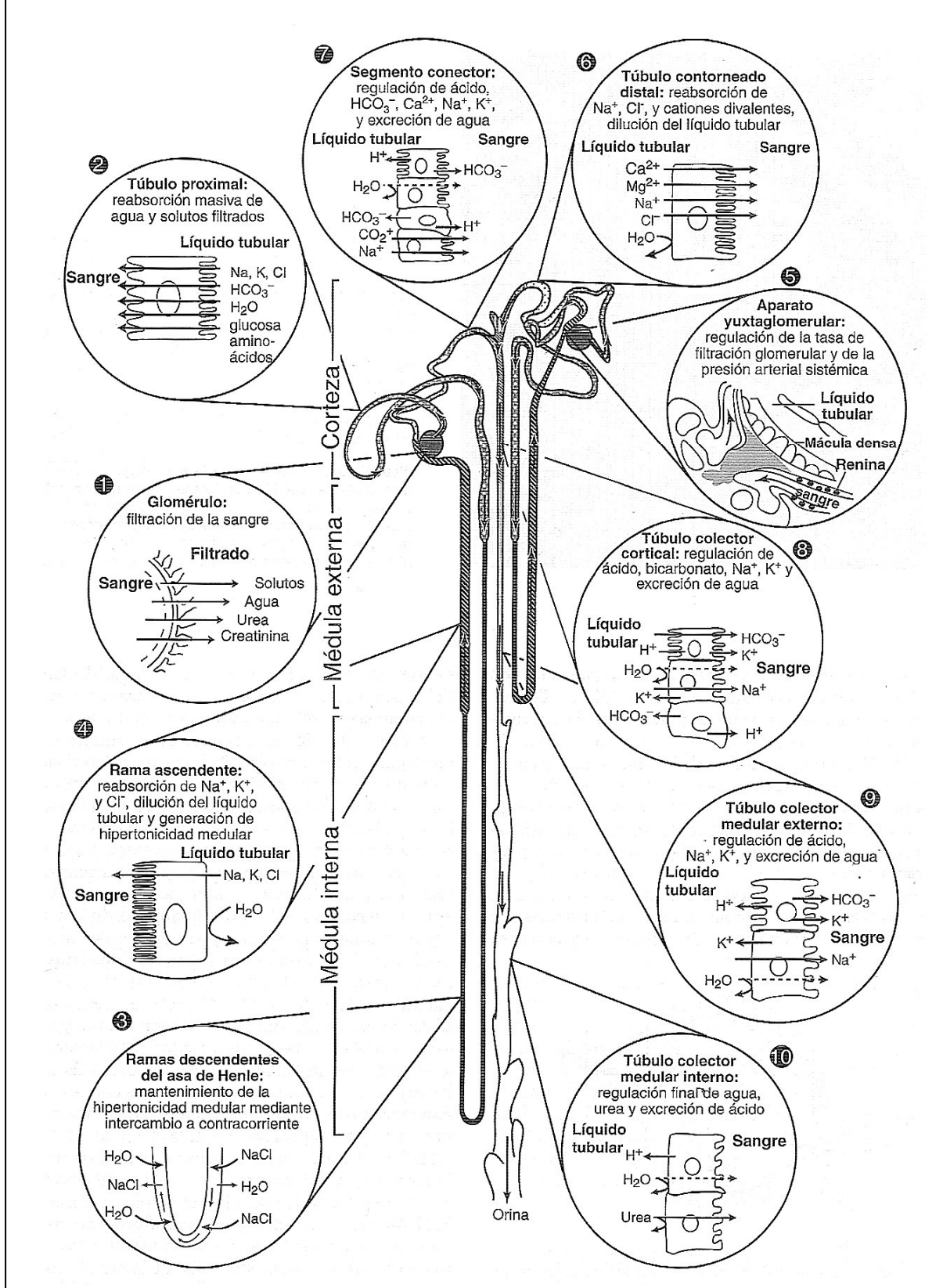


La filtración alcanza el 10 % del volumen de sangre que pasa por el riñón. En el caso del fosfato, aproximadamente un 5-10 % del fosfato plasmático está unido a proteínas, siendo la cantidad restante, 90-95 %, filtrada por el corpúsculo renal.

- b) Reabsorción tubular, por la que el organismo recupera sustancias. Puede ser pasiva (agua en el túbulo proximal, obligada por la reabsorción activa de sustancias disueltas) o activa, ligada a la actividad celular y que comprende, sodio, potasio, calcio, fosfato, glucosa, proteínas, y parte de la urea y del ácido úrico, así como el agua controlada por la hipófisis. En el túbulo proximal se reabsorbe el 65 % del filtrado glomerular, en el asa de Henle se reabsorbe un 15 % y en el túbulo distal un 10 %. Del 1 % restante, un 9 % se reabsorbe en el tubo colector, que sólo es permeable al agua en presencia de vasopresina. En condiciones normales cerca del 75 % del fosfato filtrado se reabsorbe de manera activa, casi por completo en el túbulo proximal, en simporte con sodio, por los transportadores de tipo II, especialmente el NaPiIIa (Forster y cols., 2012), la fracción no reabsorbida se elimina por orina. El tubo distal y el tubo colector cortical son impermeables a la urea, de forma que toda la que llega a ellos se elimina. Además son los principales reguladores de potasio extracelular, pues reabsorben sodio y eliminan potasio bajo el control de la aldosterona de la corteza suprarrenal. Por el contrario los tubos colectores medulares segregan activamente iones hidrógeno y son los principales responsables de la acidificación de la orina.
- c) Secreción tubular activa de ciertas sustancias sintetizadas por las células tubulares o tomadas de la sangre. El aparato yuxtaglomerular regula la filtración glomerular y la mantiene dentro de estrechos límites aun con amplias variaciones de la presión arterial. En el aparato yuxtaglomerular las células yuxtaglomerulares segregan renina bajo diferentes estímulos. Las células del mesangio se encargan de la secreción de eritropoyetina cuando disminuye el oxígeno arterial, y la mácula densa estimula la producción de renina en las células yuxtaglomerulares cuando disminuye la concentración de sodio, la cual mediante la activación de la angiotensina II estimula la producción de aldosterona y, en consecuencia, la retención de sodio y eliminación de potasio, lo que finalmente da lugar a la retención de agua.

En la figura I6 se observan, de forma esquematizada, las funciones de los segmentos de la nefrona y de los túbulos.

**Figura I6.** Resumen de las funciones de los segmentos de la nefrona y los túbulos. Los segmentos se numeran en orden secuencial de modificación de la orina, comenzando en el glomérulo (Cunningham, 2005).



## 2. 2. INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA (IRC)

### 2. 2. 1. Epidemiología

La insuficiencia renal crónica (IRC) constituye un importante problema de salud pública. Con el progreso de la IRC, cuando se alcanza el grado terminal, se hace necesario un tratamiento sustitutivo de la función renal mediante diálisis o trasplante renal, sólo posible en la especie humana. La IRC presenta una incidencia y prevalencia crecientes en el hombre en las últimas décadas (Hernando Avendaño, 2008).

### 2. 2. 2. Definición

En el año 2002 la *National Kidney Foundation* estadounidense publicó una serie de guías de práctica clínica (K/DOQI) sobre evaluación, clasificación y estratificación de la IRC. Independientemente de la patología específica que ocasione la lesión, en estas guías la insuficiencia renal crónica en el adulto se define como la presencia de una alteración estructural o funcional (en el sedimento, en pruebas de imagen, o mediante histología) que persiste más de 3 meses, con o sin deterioro de la función renal, o un filtrado glomerular menor de  $60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$  sin otros signos de lesión renal (por ejemplo, National Kidney Foundation, 2002). En este contexto, la hipertensión arterial y la proteinuria destacan como los predictores más potentes de progresión de la enfermedad y, a su vez, factores de riesgo modificables (Lorenzo, 2011).

### 2. 2. 3. Estadios evolutivos de la enfermedad

En las guías K/DOQI, así como en las de la Sociedad Española de Nefrología, se fijan cinco estados evolutivos de la IRC (Tabla I1). En el estadio 1 la lesión renal da lugar a un filtrado glomerular normal o aumentado ( $90 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ). La enfermedad renal queda establecida por la presencia de alteraciones histológicas en la biopsia renal o mediante bioindicadores indirectos (proteinuria, alteraciones en el sedimento urinario o en imagen). En el estadio 2 la alteración renal se acompaña de una reducción ligera del filtrado glomerular ( $60\text{-}89 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ ). En el estadio 3 hay una disminución moderada de la filtración glomerular ( $30\text{-}59 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ ), presentándose un mayor riesgo de progresión de la enfermedad y de complicaciones cardiovasculares, así como la aparición de complicaciones clásicas de la insuficiencia renal, como la anemia y las alteraciones del metabolismo calcio-

fósforo. En el estadio 4 hay una gran disminución de la filtración glomerular (15-29 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>), debiéndose valorar la preparación de tratamiento renal sustitutivo. En el estadio 5 la filtración glomerular es menor de 15 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> y es el momento de iniciar el tratamiento renal sustitutivo (National Kidney Foundation, 2002; Alcazar y cols., 2008). El cálculo del filtrado glomerular se puede realizar mediante diferentes fórmulas (Tabla I2).

**Tabla I1.** Estadios de gravedad de la insuficiencia renal crónica (Andrés, 2004; Alcazar y cols., 2008).

Fase	Descripción	Filtrado glomerular (FG) (ml/min/1,73 m <sup>2</sup> )	Actuación
1	Daño renal con FG normal o aumentado	≥ 90	Diagnóstico y tratamiento. Tratamiento de la comorbilidad. Ralentizar la progresión. Reducir el riesgo cardiovascular.
2	Daño renal, ligero descenso de FG	60-89	Estimar la progresión
3	Descenso moderado de FG	30-59	Evaluar y tratar complicaciones
4	Descenso grave de FG	15-29	Preparación para el tratamiento sustitutivo
5	Insuficiencia o fallo renal	<15	Tratamiento sustitutivo (si uremia)

**Tabla I2.** Fórmulas más comunes para calcular el filtrado glomerular\* (Andrés, 2004).

<b>1. Aclaramiento de creatinina endógena (con recolección de orina de 24 horas):</b>
FG = Volumen orina (ml/min) x (Creatinina orina / Creatinina sérica)
El resultado se debe estandarizar a la superficie corporal (SC), multiplicando por 1,73/SC
<b>2. Fórmula de Cockcroft-Gault:</b>
FG = (140-edad) x peso (Kg) / 72 x Creatinina sérica (mg/dl)
o bien (si el resultado de la creatinina se expresa en UI):
FG = (140-edad) x peso (Kg) / 0,81 x Creatinina sérica (mmol/l)
En las mujeres multiplicar el resultado por 0,85
<b>3. Fórmula MDRD (<i>Modification of Diet in Renal Disease study</i>):</b>
FG = 170 x (Creatinina s x 0,0113) <sup>-0,999</sup> x (edad) <sup>-0,176</sup> x 0,762 (si mujer) x 1,18
(si raza negra) X (Urea s x 2,8) <sup>-0,17</sup> x (Albúminas) <sup>0,318</sup>

\*Cuando el filtrado glomerular es bajo (<30 ml/min), el aclaramiento de creatinina o la fórmula de Cockcroft-Gault lo sobrestiman. Se aconseja entonces utilizar la fórmula MDRD, o bien la media aritmética del aclaramiento de creatinina y el de urea con recogida de orina de 24 horas; aplicando la misma fórmula

#### 2. 2. 4. Causas de insuficiencia renal crónica (IRC)

Las causas potenciales de IRC presentan notables diferencias geográficas y cronológicas. Sin embargo, existe un acuerdo general en el que la nefropatía diabética de la diabetes mellitus tipo II, envejecimiento de la población y las enfermedades vasculares renales constituyen hoy en día las causas más frecuentes de IRC. Dentro de las enfermedades vasculares renales, la mayor parte de los casos corresponde a procesos nefroangioescleróticos, tradicionalmente relacionados con hipertensión arterial, pero hoy en día está más estrechamente ligado a la arterioesclerosis generalizada y al envejecimiento (Hernando Avendaño, 2008).

#### 2. 2. 5. Fisiopatogenia de la insuficiencia renal crónica

La IRC tiende a progresar hasta uremia terminal aunque no persista la causa de la nefropatía inicial. Existen dos mecanismos básicos responsables de esta tendencia: i) las lesiones estructurales residuales producidas por la enfermedad causal; ii) numerosos datos de modelos experimentales y clínico-epidemiológicos abogan por una fisiopatología común (teoría de la hiperfiltración), independiente de la causa primaria.

La reducción de la masa nefrónica desencadena en una serie de cambios adaptativos en las nefronas restantes. En el glomérulo se produce vasodilatación de la arteriola aferente, aumento de la presión intraglomerular y de la fracción de filtración. Todo ello, aunque inicialmente es un mecanismo de compensación, va seguido de proteinuria, hipertensión e insuficiencia renal progresiva. La traducción histológica es el desarrollo de glomerulosclerosis y fibrosis tubulointersticial.

Los fenómenos de glomerulosclerosis y fibrosis tubulointersticial están inducidos por la angiotensina II, que activa diferentes factores de crecimiento. El más importante es el factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ), que inhibe la degradación de la matriz extracelular glomerular y facilita la síntesis de proteínas profibróticas. A su vez activa el

factor de transcripción NF-kB, que estimula la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias y moléculas de adhesión. Otra vía patogénica, es la de la aldosterona, la cual se piensa que podría inducir hipertensión arterial mediante la retención de sodio y expansión del espacio extracelular. Asimismo, por un mecanismo más directo, estimula la producción de TGF- $\beta$ , de actividad profibrótica sobre riñón y corazón. Otros mecanismos coadyuvantes son la proteinuria, la oxidación de lipoproteínas en los glomérulos y la hipoxia. Todos ellos inducen la síntesis de factores pro-inflamatorios y pro-fibróticos que favorecen la esclerosis renal (Andrés, 2004). Las manifestaciones bioquímicas a las que da lugar son azotemia, hiperfosfatemia, hipocalcemia, hipermagnesemia, hiponatremia, hiperpotasemia y acidosis metabólica (Lorenzo, 2011; Andrés, 2004).

#### 2. 2. 6. Relación entre insuficiencia renal crónica (IRC) y calcificación vascular

Existen numerosos estudios que han demostrado que la mayoría de los pacientes en el último estadio de IRC presentan una calcificación significativa en arterias coronarias y aorta, y cerca del 50 % presentan calcificación valvular (Hujairi y cols., 2004).

La calcificación puede aparecer tanto en la túnica íntima como en la media, simultáneamente en el mismo paciente, siendo la calcificación de la túnica media una característica importante y temprana de calcificación vascular asociada a IRC. La fisiopatología de la calcificación de la túnica media en IRC es compleja y está asociada a toxinas urémicas, anormalidades en el metabolismo mineral (hiperfosfatemia con hiper- o hipocalcemia), además de hiperparatiroidismo y deficiencia de vitamina D (Shobeiri y cols., 2010).

Se ha demostrado como el suero urémico acelera e incrementa la calcificación *in vitro* de VSMC. Este suero es capaz de inducir la transición osteoblástica de las VSMCs independientemente de la concentración de fósforo (Moe y cols., 2003 y 2004; Chen y cols., 2006). La presencia de toxinas urémicas en combinación con un incremento de la concentración de fósforo en sangre y una calcemia disminuida (consecuencia de la IRC no tratada), es suficiente para inducir la transición condroblástica de VSMCs, gracias a la expresión de factores específicos de condrocitos como SOX-9, condroitín sulfato 1 y colágeno tipo II (Neven y col., 2010). Hay evidencias de que la hidrólisis de pirofosfato, un inhibidor de la calcificación, está incrementada en aortas urémicas por la sobreexpresión de la enzima fosfatasa alcalina (Garg y cols., 2005), la cual podría ser consecuencia de la

*trans*diferenciación osteogénica de VSMCs que tiene lugar durante la condición urémica, con o sin hiperfosfatemia (Moe y cols., 2004).

El papel del calcio y la hiperfosfatemia se ha explicado mediante dos teorías confrontadas.

La primera de ellas, a partir de los resultados del grupo de la Dra. Giachelli, explica la inducción de la calcificación vascular mediante un mecanismo en el que participa el transporte de fosfato al interior de las VSMCs, mediado por Pit1, el cual induciría la *trans*diferenciación osteoblástica, formación de una matriz extracelular calcificante, y la aparición de la calcificación vascular. Esta teoría se planteó a partir de los estudios en los que se había observado que la inhibición del transporte de fosfato inhibía la expresión de osteogenes y evitaba la calcificación vascular (Jono y cols., 2000; Li y cols., 2006). Según esta teoría, la hiperfosfatemia daría lugar a la transformación fenotípica hacia un fenotipo osteoblástico con mayor expresión de proteínas implicadas en la formación del hueso como CBFA1 (también llamada RUNX2) y osteocalcina, que favorecerían el proceso de calcificación (Jono y cols., 2000), junto con la pérdida de bioindicadores de células de músculo liso, como  $\alpha$ -actina y SM22 $\alpha$ , y degradación de la elastina (Proudfoot y cols., 2000; Pai y cols., 2011). Lo que lleva a concluir que la calcificación metastática observada en pacientes con IRC es en parte consecuencia de la transformación fenotípica de las VSMCs.

La segunda teoría sugiere un orden patogénico inverso (Epple & Bäuerlein, 2007). El grupo del Dr. Sorribas ha demostrado que el transporte de fosfato no se ve incrementado en presencia de hiperfosfatemia, debido a que en las VSMCs el transporte está mediado por Pit 1 y Pit 2, y se encuentra saturado en condiciones normofosfatémicas, pudiéndose incrementar únicamente en el caso de que se produjera una sobreexpresión de los transportadores (incremento de la  $V_{max}$ ), pero esto no se ha observado en VSMCs (Villa-Bellosta y cols., 2007). También se ha demostrado que varios inductores de la calcificación, como TNF $\alpha$  y PDGF, incrementan la calcificación y la expresión de osteogenes en VSMCs sin aumentar el transporte de fosfato (Villa-Bellosta y cols., 2009). Así como se ha observado que en presencia de concentraciones elevadas de fosfato en el medio de cultivo, pero con condiciones que impiden la calcificación, la sobreexpresión de genes osteoblásticos no tiene lugar (Villa-Bellosta y cols., 2011a). Por lo tanto, según esta teoría la calcificación vascular no se desarrollaría como consecuencia de la transición osteoblástica inducida por el incremento del transporte de Pi como consecuencia de la hiperfosfatemia (Villa-Bellosta y

cols., 2007). Otra diferencia es la siguiente: el grupo de la Dra. Giachelli afirma que concentraciones de calcio similares a las observadas en hipercalcemia, mantenidas durante largos periodos, estimulan el transporte de Pi sodio-dependiente, el cual sería inhibido fuertemente por el ácido fosfonofórmico (PFA), concluyendo que la causa de la ausencia de calcificación se debe a la inhibición del transporte de fosfato (Yang y cols., 2004). Sin embargo, el grupo del Dr. Sorribas ha demostrado que esta inhibición de la calcificación no es debida a la inhibición del transporte, ya que el PFA es un pobre inhibidor de Pit 1 y Pit 2, sino a que el PFA es capaz de prevenir la calcificación incluso en células muertas, es decir, por un mecanismo independiente de la actividad celular, consecuencia de la inhibición directa de la formación de depósitos de fosfatos de calcio, de un modo similar al pirofosfato o los bisfosfonatos (Villa-Bellosta y cols., 2007, 2009 y 2011a). Por todo ello, se concluyó que la inducción de la calcificación no es consecuencia del aumento de transporte de Pi y que la inhibición de la calcificación por silenciamiento de Pit 1, a la cual no se ha encontrado explicación, puede ser reflejo de una función todavía desconocida de este transportador en la fisiología celular, pero independiente del transporte de Pi. Esta posibilidad se ve apoyada por de expresión de Pit 1 en el retículo endoplásmico, y su función en la proliferación celular (Beck y cols., 2009; Villa-Bellosta y cols., 2009).

Otro factor importante a tener en cuenta para poder entender el proceso es la acción de los inhibidores endógenos de la calcificación. Se ha comprobado que la calcificación en ausencia de actividad celular puede producirse bajo condiciones normofosfatémicas, pero ésta es inhibida en presencia de PPI a concentraciones fisiológicas. El pirofosfato por tanto inhibe la formación de cristales de fosfatos de calcio, pero es insuficiente en condiciones hiperfosfatémicas, ya que a la concentración liberada por las VSMCs únicamente es capaz de inhibir un 30 % de la calcificación en presencia de altas concentraciones de fosfato (Villa-Bellosta y cols., 2011b). Esta teoría se ve apoyada por los resultados obtenidos por otros grupos, como es el hecho de que los cristales incrementan la muerte de VSMCs, reduciendo así la presencia de inhibidores de la calcificación (Ewence y cols., 2008). Otros autores afirman que bajo condiciones fisiológicas las VSMCs liberan inhibidores de la mineralización, aunque en presencia de elevadas concentraciones extracelulares de calcio y fósforo la acción de estos inhibidores endógenos (como MGP y fetuina-A) puede verse comprometida. En ese caso, el daño vascular se ve exacerbado, la liberación de vesículas apoptóticas calcificantes es potenciada, y se produce la nucleación (Proudfoot y cols., 2000; Reynolds y cols., 2004; Reynolds y cols., 2005). La hipótesis de nuestro grupo, por tanto,



modifica el orden de los acontecimientos defendidos por el grupo de la Dra. Giachelli, es decir: en primer lugar ocurriría el depósito de hidroxapatita como consecuencia de la menor eficacia de los inhibidores de la calcificación en condiciones hiperfosfatémicas, el depósito se produce de forma pasiva, termodinámicamente favorecido, sin implicación directa de la actividad celular y, como consecuencia del depósito de hidroxapatita y otros cristales, se desarrollaría la *transdiferenciación* osteoblástica, lo que daría lugar a la estructura organizada en torno a la hidroxapatita (Villa-Bellosta y cols., 2011b).

Para evitar la calcificación mediada por hiperfosfatemia se han usado compuestos basados en calcio (como por ejemplo carbonato de calcio o acetato de calcio), los cuales se unen al fosfato para disminuir su concentración (Slatopolsky y cols., 1986). Sin embargo, este tratamiento es peligroso ya que se eleva la concentración sanguínea de calcio, incrementando con ello la calcificación vascular. Por tanto, se deberían usar otros compuestos que se unan al fósforo pero no contengan calcio en su composición, como es el sevelamer o el carbonato de lantano (Moe y cols., 2006).

En presencia de hiperparatiroidismo, hipocalcemia y deficiencia de vitamina D, la calcificación vascular se ve acompañada de osteodistrofia renal, producida durante la IRC. Al disminuir el filtrado glomerular el fosfato se ve retenido, es decir, se genera hiperfosfatemia, que se ve acompañada de hipocalcemia, por la falta de la síntesis de vitamina D<sub>3</sub> (ver más adelante) con una disminución recíproca del calcio. Tanto la hipocalcemia, como la hiperfosfatemia estimulan la síntesis y liberación de hormona paratiroidea (PTH) y la proliferación de células paratiroideas, que producirán más PTH. La pérdida de masa renal útil da lugar a la reducción de la actividad de la 1 $\alpha$ -hidroxilasa, necesaria para la síntesis de 1-25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (calcitriol) en el túbulo proximal a partir del 25(OH)D<sub>3</sub> de procedencia hepática. El déficit de calcitriol tiene como consecuencia la disminución de la absorción intestinal de calcio, lo que continúa estimulando la producción de PTH, produciéndose así hiperparatiroidismo secundario. En las glándulas paratiroideas, el déficit de calcitriol impide actuar sobre su receptor VDR. En el hueso, el exceso de PTH estimula la resorción ósea, proceso por el cual los osteoclastos eliminan tejido óseo, liberando minerales, resultando en una transferencia de ion calcio desde la matriz ósea a la sangre. A nivel glandular se produce además de la proliferación celular una disminución del receptor sensor de calcio, que en condiciones normales capta el calcio liberado por la resorción y frena la producción de PTH, así como disminuyen los receptores VDR de calcitriol impidiendo su acción (Andrés, 2004).

El hecho de que el calcitriol reprima tanto la proliferación de células paratiroides como la transcripción del mRNA de PTH, ha provocado su uso en pacientes con fallo renal, ya que es la terapia de elección para revertir el paratiroidismo secundario y así normalizar los niveles de PTH. Sin embargo, uno de los principales problemas del tratamiento con calcitriol es el desarrollo de hipercalcemia (Andress, 2005), lo que incrementa la calcificación. A ello se suma la existencia de un receptor para vitamina D en las VSMCs (Kawashima, 1987), sobre el cual actuaría el calcitriol directamente, incrementando la calcificación medial por inhibición, en estas mismas células, de un inhibidor de la calcificación, el péptido relacionado con la PTH (*Parathyroid hormone-related peptide*) (Jono y cols., 1997 y 1998).

Un factor adicional que estimula la calcificación es la alcalemia, a los mismos niveles que se han detectado en sangre tras hemodiálisis (Lomashvili y cols., 2006).

### **3. ENVEJECIMIENTO Y SENESCENCIA**

#### **3. 1. DEFINICIÓN DE ENVEJECIMIENTO Y SENESCENCIA**

Durante el último siglo se ha definido el envejecimiento de muy diversas formas. En 1982, en un esfuerzo por dar rigor a la definición, Strehler sugirió que para considerar los cambios relacionados con la edad como envejecimiento, éstos deben cumplir cuatro condiciones:

1. Deben ser deletéreos, es decir, deben reducir la función.
2. Deben ser progresivos, teniendo lugar gradualmente.
3. Deben ser intrínsecos, no deben ser resultado de agentes medioambientales modificables.
4. Deben ser universales, todos los miembros de una especie deben mostrar tales déficits a edades avanzadas.

Durante un gran periodo de tiempo estos criterios fueron los que definieron el proceso de envejecimiento, pudiendo diferenciarlo de otros fenómenos como enfermedades o accidentes. Sin embargo, nuevos descubrimientos sobre las variaciones individuales dentro de una misma especie, hicieron que los criterios para definir envejecimiento se modificaran, eliminando el concepto de universalidad y manteniendo para definirlo los conceptos deletéreo, progresivo e intrínseco (Arking, 1998).

Otro factor sobre el que se ha discutido a la hora de definir el envejecimiento, es el tiempo. Aparentemente el tiempo es un factor indispensable en el proceso de envejecimiento, sin embargo, es más bien relativo, ya que los ritmos biológicos someten al organismo a miles de controles biológicos, que actúan de forma diferente en cada individuo. Un ejemplo claro es la existencia de personas que aparentemente tienen una edad biológica menor de la que muestran cronológicamente, es decir, por el momento de su nacimiento. Por ello los estudios sobre envejecimiento deberían ser independientes del tiempo, aunque esto no será posible hasta que seamos capaces de conocer todas las variables orgánicas implicadas en el proceso de envejecimiento (Arking, 1998). Según este autor, el envejecimiento podría definirse como el conjunto de cambios deletéreos, progresivos e intrínsecos que tienen lugar desde el proceso de madurez y que disminuyen la capacidad de un ser vivo para sobrevivir.

Un término muy relacionado con el envejecimiento y el cual a menudo se usa como sinónimo, es senescencia. Sin embargo Lamb en 1977 sugirió que senescencia y senescente debían ser reservados para hablar de los cambios que ocurren durante el periodo de declive obvio de la funcionalidad, en los últimos años de vida de un ser vivo. Esto coincide con la definición de Strehler (1982), el cual define senescencia como los cambios que ocurren generalmente en el periodo post-reproductivo, y que resultan en un descenso de la capacidad de supervivencia para el organismo. Por lo tanto, los cambios seniles son los que se producirían más notablemente durante la última etapa de la vida, y que estarían asociados con el incremento exponencial de la probabilidad de morir en este último periodo (Arking, 1998). *In vitro*, sin embargo, la senescencia se define como la dificultad de crecimiento que sufren las células de modo irreversible, a medida que acumulan divisiones, para finalmente cesar su multiplicación (Hayflick, 1985; Hayflick 1994).

De este modo podemos observar como las definiciones de envejecimiento y senescencia llegan a superponerse pero no deben considerarse sinónimos como tales. Envejecimiento tiene una connotación neutra, mientras senescencia tiene una connotación negativa (Rubin, 2002). Envejecimiento es un término más amplio que engloba el proceso de senescencia. El envejecimiento como tal comenzaría, en teoría, a partir de la madurez de un ser vivo, mientras que la senescencia durante el proceso post-reproductivo, en la fase final de la vida.

## 3. 2. SENESCENCIA CELULAR

### 3. 2. 1. Antecedentes históricos

El biólogo alemán August Weismann realizó una crucial distinción entre la línea germinal y las células somáticas. En 1881 especuló que las células somáticas de animales superiores tenían un potencial limitado de duplicación. Weismann afirmó que “la muerte tiene lugar porque un tejido “agotado” no puede renovarse eternamente, y ello implica que la división de las células es finita”, aunque para realizar esta afirmación no aportó ninguna evidencia experimental (Weismann, 1891).

Desde el punto de vista de la gerontología la Historia del cultivo celular puede dividirse en dos fases (Holliday, 1995; Arking, 1998).

La primera fase comenzó en 1919 con el trabajo pionero de Ross Harrison, el cual demostró que los tejidos de vertebrados pueden mantenerse fuera del cuerpo y sus células pueden continuar creciendo y diferenciándose *in vitro* si se mantienen en un baño con fluidos biológicos (Harrison, 1910). Los siguientes resultados dentro de este tema fueron los presentados por Carrel y posteriormente por Ebeling, los cuales fueron capaces de mantener en cultivo células procedentes de corazón de pollo durante meses (Carrel, 1912; Ebeling, 1913), finalmente Carrel prolongó estos cultivos durante más de 30 años, lo que supera la esperanza de vida del animal donante (pollo) y llevó a concluir que las células extraídas del animal y mantenidas en cultivo bajo adecuadas condiciones eran inmortales. Un apoyo para los resultados de Carrel fue el descubrimiento de varias líneas celulares que podían crecer continuamente en cultivo sin cesar su proliferación. Las primeras de estas células fueron las L, a partir de un tumor tímico inducido en ratón (Earle, 1943), y las segundas las células HeLa, a partir de un tumor cérvicouterino de una mujer afroamericana donadora involuntaria y sin su conocimiento de células de su tumor canceroso, a partir de las cuales se estableció un cultivo (Gey y cols., 1952). Sin embargo la diferencia entre las células utilizadas por Carrel y estas células tumorales es que estas últimas son células transformadas, por lo que las teorías sobre envejecimiento no son aplicables en ellas (Holliday, 1995; Arking, 1998).

Estos resultados hicieron creer, durante muchos años, que la teoría de Weismann era incorrecta. Sin embargo actualmente se sabe que los experimentos de Carrell no se llevaron a cabo de la forma que él afirmaba, sino que los procedimientos de cultivo permitían la adición

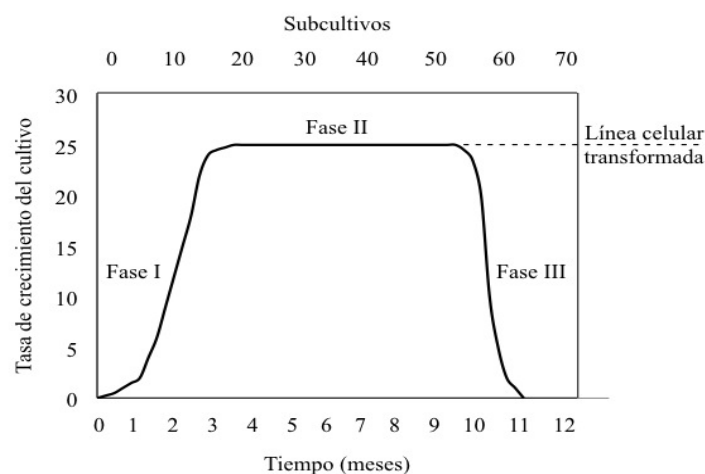
de nuevas células al cultivo (Hayflick, 1982), y que, en realidad, las células de pollo se dividen únicamente 30-40 veces (Gey y cols., 1974).

La segunda fase de la citogerontología comenzó con los resultados experimentales de Hayflick y Moorhead (1961), los cuales demostraron que los fibroblastos humanos en cultivo se dividen un número finito de veces para cesar finalmente su crecimiento, sin ser ello consecuencia de las condiciones de cultivo (Holliday, 1995; Arking, 1998)

### 3. 2. 2. Comportamiento de las células en cultivo

Hayflick y Moorhead (1961) dividieron los estadios del cultivo celular en tres fases (Figura I7). La primera fase supone el establecimiento del cultivo primario desde el tejido de origen. En la segunda fase las células se dividen en cultivo, siendo necesarios subcultivos. Esta fase llega hasta el momento en el que comienzan a dividirse más lentamente, lo cual marca el comienzo de la tercera fase, en la que la división se ralentiza y cesa la multiplicación, sin alcanzar la confluencia, fenómeno al que se denomina senescencia replicativa o límite de Hayflick. Estas células senescentes permanecen activas metabólicamente durante un tiempo, sin embargo no se dividen, aun en presencia de los factores de crecimiento adecuados. En el caso de las células inmortales (transformadas), éstas nunca evolucionan hasta la fase III permaneciendo indefinidamente en la fase II, manteniendo su tasa de crecimiento (Holliday, 1995; Arking, 1998)

**Figura I7.** Fases del cultivo celular. Ejemplo de las fases de un supuesto cultivo celular, a partir de células extraídas de un determinado tejido (modificado de Arking, 1998).



El límite de Hayflick se ha demostrado en diferentes tipos celulares como se puede ver en la tabla I3.

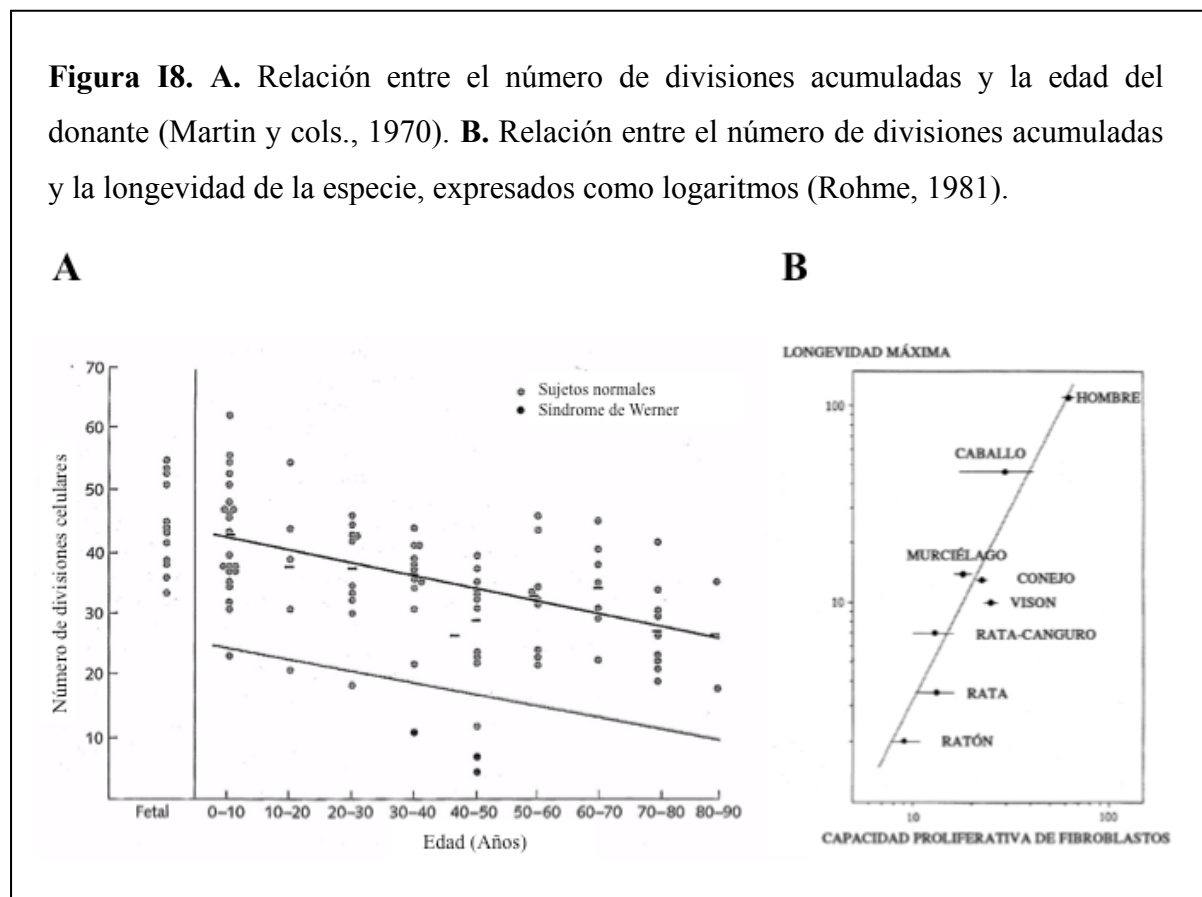
**Tabla I3.** Máximas divisiones acumuladas en cultivo para diferentes tipos celulares humanos (excepto cuando se indica otra especie) (Holliday, 1995).

Tipo celular	Número de divisiones máximas acumuladas (límite de Hayflick)	Referencias
Fibroblastos	50-100	Hayflick y Moorhead (1961 y posteriores publicaciones)
Células gliales	20-30	Ponten y MacIntyre (1968)
Linfocitos T	60-170	McCarron y cols. (1987)
Células de músculo liso	14	Bierman (1978)
Células endoteliales (humanas/bovinas)	25-35 / 18	Mueller, Rosen y Levine (1980)
Queratinocitos	35-40	Rockwell, Johnson y Sibatani (1987)
Células adrenocorticales	55-65	Hornsby y Gill (1978); Hornsby, Simonian y Gill (1979)
Células del epitelio bronquial	35	Lechner y cols. (1981)

Se ha demostrado que hay una relación directa entre el número de divisiones en cultivo y la longevidad de la especie, de modo que a mayor número de divisiones durante la vida del animal, más divisiones en cultivo (Figura I8 B) (Hayflick, 1965; Martin y cols., 1970; Rohme, 1981).

Hayflick y cols. (1965) demostraron la existencia de una relación inversa entre las divisiones en cultivo y la edad del donante. Como las células obtenidas a partir de donantes de mayor edad se habrían dividido un mayor número de veces *in vivo*, el número de divisiones que todavía serían capaces de soportar sería menor que en el caso de un animal joven, en el que las células se habrían dividido un menor número de veces (Figura I8 A). Cabe destacar que estas diferencias se observan entre células de donantes muy jóvenes y muy ancianos, no a edades intermedias. Por ejemplo, en el caso de fibroblastos se observan diferencias entre individuos menores de 10 años e individuos a partir de 70 años, lo que dio lugar a la “hipótesis de Hayflick”, según la cual las células estarían programadas para alcanzar la senescencia (cuando han realizado un determinado número de replicaciones,

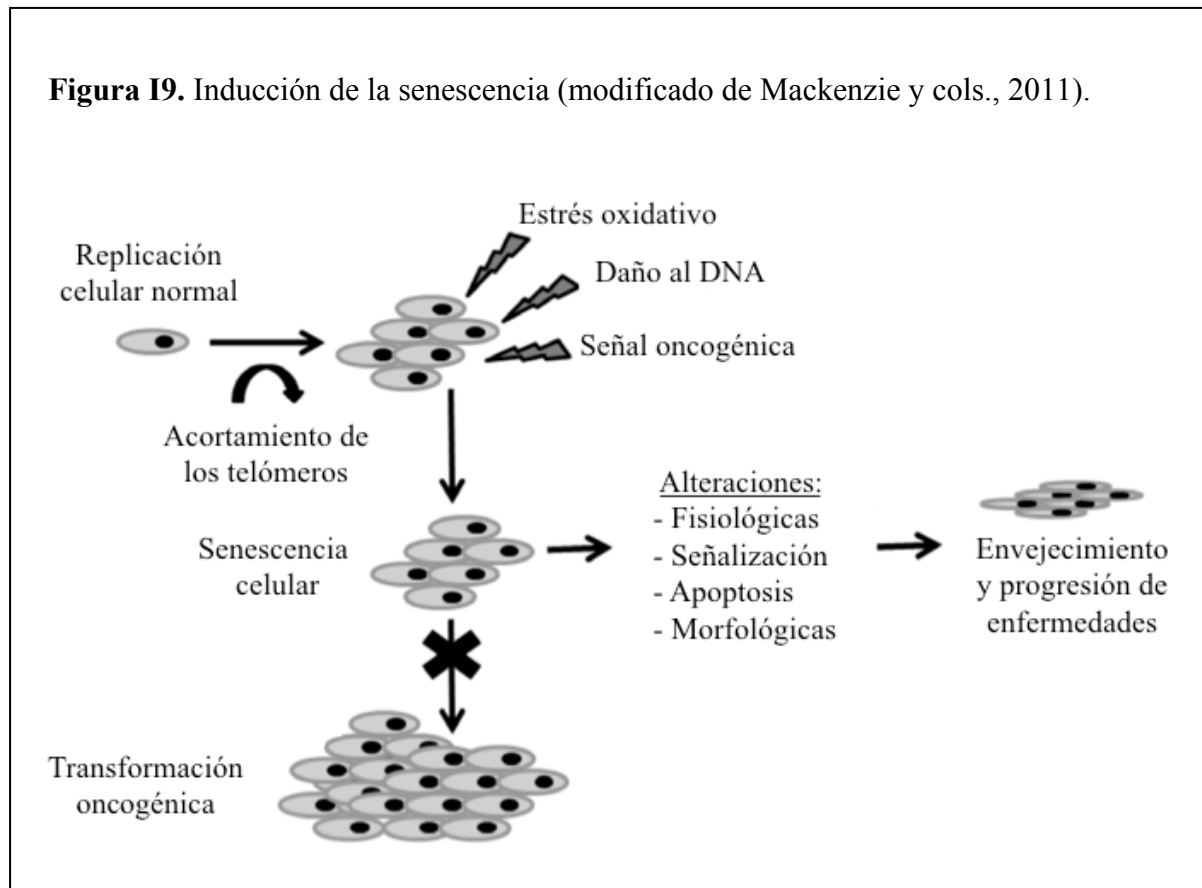
surgiendo el concepto de replicómetro, en lugar de reloj biológico). Estas observaciones se han visto apoyadas por estudios posteriores (Hayflick y cols., 1965, y 1977; Goldstein y cols., 1969; Le Guilly, 1973; Goldstein, 1974; Stanley y cols., 1975; Schneider y cols., 1976; Bierman, 1978; Martin, 1979 y 1981; ). Entre ellos destaca el de Martin y cols. (1970), en el cual además de cultivar fibroblastos de diferentes edades de individuos sanos, cultivaron fibroblastos de personas con el síndrome de Werner, patología caracterizada por un envejecimiento acelerado, observándose como los fibroblastos de los individuos con esta patología alcanzan menos divisiones que los de individuos sanos (Figura I8 A) (Holliday, 1995; Arking, 1998).



### 3. 2. 3. Mecanismos de inducción del proceso de senescencia

La detención del ciclo celular está provocada por diversos mecanismos, destacando el acortamiento de los telómeros, inducción por estrés, y la activación de reguladores negativos del ciclo celular y de oncogenes (Figura I9) (Serrano y cols., 1997; Bodnar y cols., 1998; Rai y cols., 2009; Mackenzie y cols., 2011). El único de estos factores relacionado con la edad

replicativa es el acortamiento de los telómeros, dando por ello lugar a senescencia replicativa, el resto de factores pueden inducir senescencia independientemente de la edad replicativa y de la longitud de los telómeros (Serrano y cols., 2001; Minamino y cols., 2004).

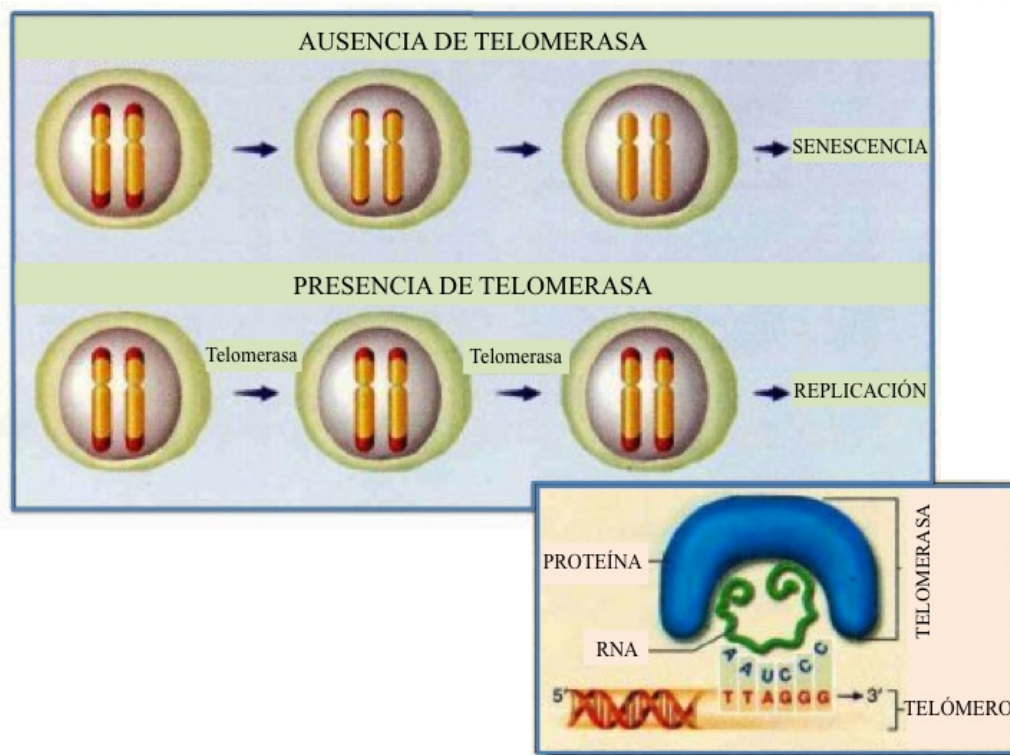


Los telómeros han sido postulados como un reloj mitótico universal responsable de la detención del ciclo celular (Olovnikov, 1971). Los telómeros se acortan de forma paralela al envejecimiento de las células. Son estructuras localizadas en el extremo de los cromosomas, constituidos por secuencias repetidas de nucleótidos (TTAGGG en humanos) conservadas evolutivamente (Blackburn y cols., 1978; Moyzis y cols., 1988; Meyne y cols., 1989) y unidos a proteínas (shelterinas), formando un complejo que protege a los cromosomas de erosiones y fusiones entre ellos (de Lange, 2005). En contraste con la similitud de secuencia, la longitud de los telómeros varía entre especies, así como dentro de una misma especie, de un mismo organismo y entre cromosomas (Takubo y cols., 2002). Debido a la incapacidad de la DNA polimerasa de elongar estos extremos, progresivamente se van acortando con los ciclos replicativos. Cuando los telómeros llegan a una longitud crítica, la célula no es capaz de llevar a cabo más divisiones y se convierte en una célula senescente, o por otro lado



disfuncional. Así, una importante hipótesis sobre envejecimiento es que el acortamiento de los telómeros favorece la aparición de patologías (Oeseburg y cols., 2010). A diferencia de la DNA polimerasa existe una enzima capaz de elongar los telómeros y en ausencia de la cual los telómeros se acortan en cada duplicación: la telomerasa (Greider y cols., 1985; Blasco y cols., 1997) (Figura I10), durante un tiempo se postuló que esta enzima estaba ausente en células somáticas, pero actualmente se sabe que hay células que presentan esta enzima activa, aunque su actividad desciende progresivamente con el envejecimiento (Wright y cols., 1996).

**Figura I10.** Replicación en presencia y en ausencia de telomerasa (modificado de Haber, 1995).



También cabe destacar la existencia de estudios que contradicen la implicación directa de la longitud de los telómeros en el proceso de senescencia, recayendo en este caso la importancia de la inducción o no de la senescencia en la ausencia o presencia de la enzima telomerasa. En estos estudios se indujo senescencia por acortamiento de los telómeros mediante la inhibición de la enzima telomerasa. Sin embargo, estas mismas células se inmortalizaron aun cuando sus telómeros habían alcanzado la longitud crítica, cuando se

reexpresó la enzima telomerasa, por lo que en estos estudios se concluyó que la longitud de los telómeros no actúa como un reloj mitótico, sino que es la telomerasa el factor crucial en el mantenimiento de la capacidad de multiplicación (Yang y cols., 1999; Zhu y cols., 1999; Blackburn, 2000).

El acortamiento de los telómeros también da lugar a la inducción de las vías de p53 y pRb que desembocan en la inducción de senescencia (Matthews y cols., 2006; Minamino y cols., 2004).

Un caso particular de senescencia es la inducida por estrés (SIPS; *stress-induced premature senescence*), que es consecuencia de la exposición de las células a ciertos tipos de estrés repetidos o crónicos, a dosis no letales. Ello conllevaría la acumulación de células senescentes. Estas células, a su vez, podrían ser eliminadas por las células del sistema inmune o mediante apoptosis, lo que a su vez formaría parte del envejecimiento del tejido a través de la modificación del ambiente extracelular, creando un estado micro-inflamatorio o activando a las células vecinas. En este mecanismo estaría implicada la proteína p16, la cual activaría a pRb, provocando la detención del ciclo celular; otra vía implicada es la sobreexpresión de p53, la cual tendría el mismo efecto (Brack, 2000).

Otra causa de activación de senescencia, como ya se ha indicado, es la expresión de formas activadas de oncogenes, los mismos que inducen el desarrollo de tumores. Los oncogenes producen la activación de p53, así como también pueden activar p16 para activar finalmente pRb y por ambas rutas detener la progresión del ciclo celular (Minamino y cols., 2004; Abulaiti y cols., 2006; Frame y cols., 2006).

Las vías de producción de senescencia son las mismas en todos los casos explicados, es decir, aunque la causa de senescencia sea diferente, las vías que la generan son las mismas para todos los casos. Siendo estas rutas las de las proteínas p16-pRb y p53-p21.

Estos estímulos pueden activar a la proteína p16, la cual es un inhibidor de la kinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4). Esta kinasa, en su forma activa, se une a la proteína pRb permitiendo la fosforilación de ésta y por tanto su inactivación, continuando así el ciclo celular. La proteína p16, por medio de la inactivación de la kinasa, permite la forma hipofosforilada de pRb y su activación. En su forma activa, pRb secuestra al factor E2F (promotor del ciclo) impidiendo el desarrollo del ciclo celular.

Los estímulos explicados anteriormente además de activar a p16 pueden activar la proteína p53. El regulador de p53 es Mdm2, el cual activa la degradación de p53 por ubiquitinación. Bajo las señales anteriormente comentadas Mdm2 es secuestrada por p14, activándose en consecuencia p53. La proteína p53 también puede ser activada por PML (proteína de la leucemia promielocítica). p53 activa la transcripción de la proteína p21, la cual inhibe las ciclinas y a PCNA (al unirse p21 a PCNA impide la activación de la polimerasa), inhibiendo el ciclo celular. p21 también puede actuar por medio de la activación de pRb, mediante la inhibición indirecta de E2F, así como por unión a la ciclina D-CDK4/6, inhibiendo la fosforilación de pRb y, como consecuencia de ello, se detiene el ciclo celular (Alarcon-Vargas y cols., 2002; Roninson, 2002; Minamino y cols., 2004; Matthews, 2006; Cazzalini y cols., 2010; Yung y cols., 2010).

Entre otros estímulos inductores de estrés se encuentran la acumulación de proteínas defectuosas. Éstas pueden ser eliminadas por proteasas, pero cuando se pierde el equilibrio entre formación y degradación de estas proteínas alteradas, tiene lugar su acumulación progresiva, hasta provocar el proceso de senescencia. Otra hipótesis sería el fallo en la replicación, como consecuencia de un bloqueo de la iniciación de la síntesis de DNA, como consecuencia de la presencia de inhibidores endógenos o por la insensibilización de las células a factores de crecimiento (Holliday, 1995). Se ha observado como la alteración de las mitocondrias puede desembocar en senescencia. Por ejemplo, las especies reactivas de oxígeno (ROS) procedentes de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, particularmente el anión superóxido, peróxido de hidrogeno y radicales hidroxilo, pueden producir una gran variedad de daños en el DNA, incluyendo la rotura de las hebras y la modificación mutagénica de las bases. Las ROS pueden acelerar la pérdida de los telómeros durante la replicación, así como inducir senescencia prematura independientemente del acortamiento de los telómeros (en este caso senescencia prematura inducida por estrés; Chen y cols., 2001). También se ha propuesto que diversos factores epigenéticos se vean involucrados en el proceso de envejecimiento (Gravina y cols., 2009).

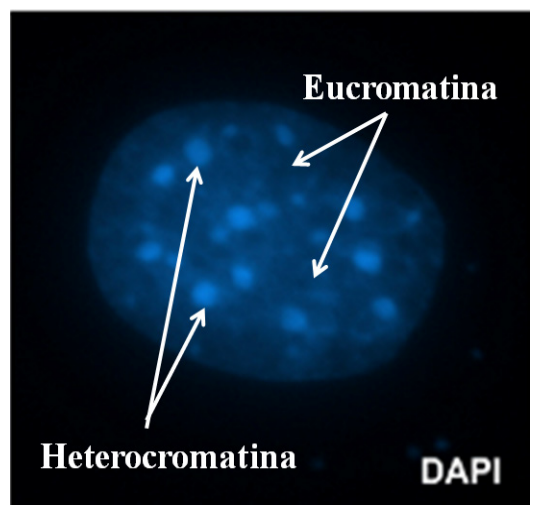
#### 3. 2. 4. Bioindicadores de senescencia

El fenotipo de las células senescentes está definido por una serie de características, llamadas bioindicadores (Campisi, 1999).

Conforme las células envejecen su potencial proliferativo disminuye progresivamente, y esto se evidencia por la disminución del número de células presentes en cada pase (Phipps y cols., 2007), así como por la disminución de la expresión de Ki67, un indicador de proliferación celular (Burton y cols., 2009). Este descenso se va produciendo hasta alcanzar la senescencia total, momento en el que las células no alcanzan la confluencia, detienen el crecimiento en fase G1, y no llegan a fase S. El freno en el ciclo es irreversible y no puede volver a estimularse con factores de crecimiento (Cristofalo y cols., 1993), aunque las células senescentes no mueren, permanecen metabólicamente activas y resistentes a la apoptosis durante largos periodos de tiempo (Goldstein, 1990; Nakano-Kurimoto y cols., 2009; Burton y cols., 2009).

Mientras el daño al DNA y los cambios en la regulación del ciclo celular tienen una gran relevancia, la formación de heterocromatina asociada al proceso de senescencia (SAHF) tiene una importancia fundamental (Hornsby, 2010). Las células normales presentan una tinción con DAPI difusa, lo que se asocia con la eucromatina, en el caso de las células senescentes se observan focos puntiformes que se corresponden con la heterocromatina (Figura I11) (Rai y cols., 2012; Schotta G., 2012). Las formas activas, no fosforiladas, de la proteína Rb inducen la formación de SAHF (Park y cols., 2004; Schulz y cols., 2005; Collado y cols., 2006).

**Figura I11.** Tinción nuclear con DAPI, heterocromatina y eucromatina (Schotta G., 2012).



Las proteínas p53, p21 y p16 son efectores importantes en la senescencia por detección del ciclo celular, de modo que se ha observado un aumento significativo de la expresión de p53, p21 y p16 en células senescentes en comparación con las jóvenes (Blackburn, 2001; Nakano-Kurimoto, 2009). En el caso de usar como bioindicadores de senescencia estas proteínas, se debe tener en cuenta que aunque p53 y p21 son activadas inmediatamente como respuesta al daño celular, las células que han sido senescentes durante

largos períodos pueden mostrar una expresión de p21 normal o baja, y en su lugar encontrarse incrementada la de p16 (Alcorta y cols., 1996; Robles y cols., 1998).

En las células en división las proteínas nucleares Lámina A y C se ven incrementadas conforme las células acumulan divisiones (Ragnauth y cols., 2010).

También se ha observado una relación entre la longitud de los telómeros y el envejecimiento. Los telómeros se van acortando progresivamente con los sucesivos ciclos de división en la mayoría de los tipos celulares (Cherif y cols., 2002; Meyne y cols., 1989), debido a la ausencia de telomerasa, o a bajos niveles de ésta (d'Adda di Fagagna y cols., 2003; Harley y cols., 1990).

Las células normales son diploides, pero en cada subcultivo aumenta el porcentaje de células poliploides (Matsumura, 1980; Ravid y cols., 2004), así como las mutaciones en el DNA mitocondrial, aunque a niveles más bajos (Tanhauser y cols., 1995).

Otro indicador de senescencia es la morfología. Las células senescentes son de mayor tamaño y presentan una morfología más variable que las que acumulan pocas divisiones. De hecho, un cultivo confluyente de células senescentes tiene una densidad menor que un cultivo confluyente de células jóvenes. A ello contribuye el hecho de que las células senescentes sean más sensibles a la inhibición por contacto célula-célula (Absher y cols., 1988; Bayreuther y cols., 1988; Cristofalo y cols., 1993), quizás como resultado de cambios en las interacciones con la matriz extracelular, o por la expresión de proteínas secretoras (Cristofalo, 1988; Cristofalo y cols., 2004). Aunque la síntesis de macromoléculas disminuye con la edad, el contenido intracelular de RNA y proteínas se incrementa. Estos incrementos podrían contribuir al incremento del tamaño celular, junto con el aumento del tamaño del núcleo y de la mayor presencia de cuerpos de inclusión, todo ello podría ser debido a una reducción de la degradación proteica en las vías mediadas por el proteasoma, disminuyendo el recambio de RNA y desacoplando el crecimiento de la división celular (y aparentemente bloqueando el ciclo en la fase G1) (Phipps y cols., 2007). Además del incremento del tamaño celular y del núcleo, se observa un incremento del tamaño de los nucleolos, aumenta la presencia de células multinucleadas, aparecen alteraciones en la cromatina, el aparato de Golgi también aumenta de tamaño, se incrementa el número de vacuolas en retículo endoplásmico y citoplasma, así como el número de microfilamentos y de lisosomas (Robbins y cols., 1970; Brunk y cols., 1973; Cristofalo y cols., 1993).

A su vez se ha demostrado que la enzima  $\beta$ -galactosidasa tiene una expresión anormal en las células senescentes. Esta enzima es una hidrolasa lisosomal, normalmente activa a pH 4, sin embargo en células senescentes también se mantiene activa a pH 6. La actividad  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia se evidencia por una tinción a pH 6, apareciendo un color azulado más intenso en la región perinuclear, debido a que las células senescentes muestran una expresión de la  $\beta$ -galactosidasa de cinco a diez veces mayor que las jóvenes. Tanto *in vitro* como *in vivo* el porcentaje de células positivas se incrementa con las divisiones y con la edad respectivamente (Dimri y cols., 1995). Además es posible encontrar una relación entre el incremento en la actividad  $\beta$ -galactosidasa y la morfología senescente (Toussaint y cols., 2000). Como se ha comentado, los lisosomas incrementan su número y tamaño en las células senescentes (Robbins y cols., 1970; Brunk y cols., 1973) y la actividad  $\beta$ -galactosidasa asociada a la senescencia parece ser el resultado del incremento de la actividad lisosomal a pH sub-óptimo, el cual es detectable en células senescentes debido a un incremento del contenido lisosomal (Kurz y cols., 2000). Otros resultados sugieren que durante el envejecimiento *in vitro* la autofagia quizás esté asociada a un incremento de la masa lisosomal y de la actividad  $\beta$ -galactosidasa (Gerland y cols., 2003). La tinción no es positiva en células quiescentes o en aquellas diferenciadas y no senescentes, así como tampoco lo es en células inmortales (Dimri y cols., 1995).

### 3. 3. RELACIÓN ENTRE ENVEJECIMIENTO, SENESCENCIA CELULAR Y PATOLOGÍAS

Ya que las células son la unidad estructural básica de la vida, el declive de su proliferación podría contribuir al proceso de envejecimiento (de Magalhaes, 2008). Las células senescentes son viables, metabólicamente activas, y muestran un patrón génico y una expresión proteica alterados en comparación con las células no senescentes. Estas son las principales diferencias con respecto a las células quiescentes (Ross y cols., 1984; Burriq, 1991). Se ha observado como estos cambios en el patrón génico y expresión proteica son altamente dependientes del tipo celular (Foreman y cols., 2003).

Las células senescentes evitan la replicación de las células potencialmente neoplásicas, inhibiendo así la formación de tumores. Por ello, estas células son beneficiosas cuando su número es bajo, aunque su acumulación con el envejecimiento puede llevar a detrimento de las funciones del tejido donde se acumulan (Campisi, 2001). En la actualidad está aceptado el fenómeno de acumulación de células senescentes *in vivo*, haciendo que su

fenotipo alterado contribuya a las patologías relacionadas con la edad (Stanulis-Praeger, 1987; Goldstein, 1990; Campisi y cols., 1995, Erusalimsky y cols., 2005).

### 3. 4. ENVEJECIMIENTO Y SENESCENCIA CELULAR DE LA AORTA

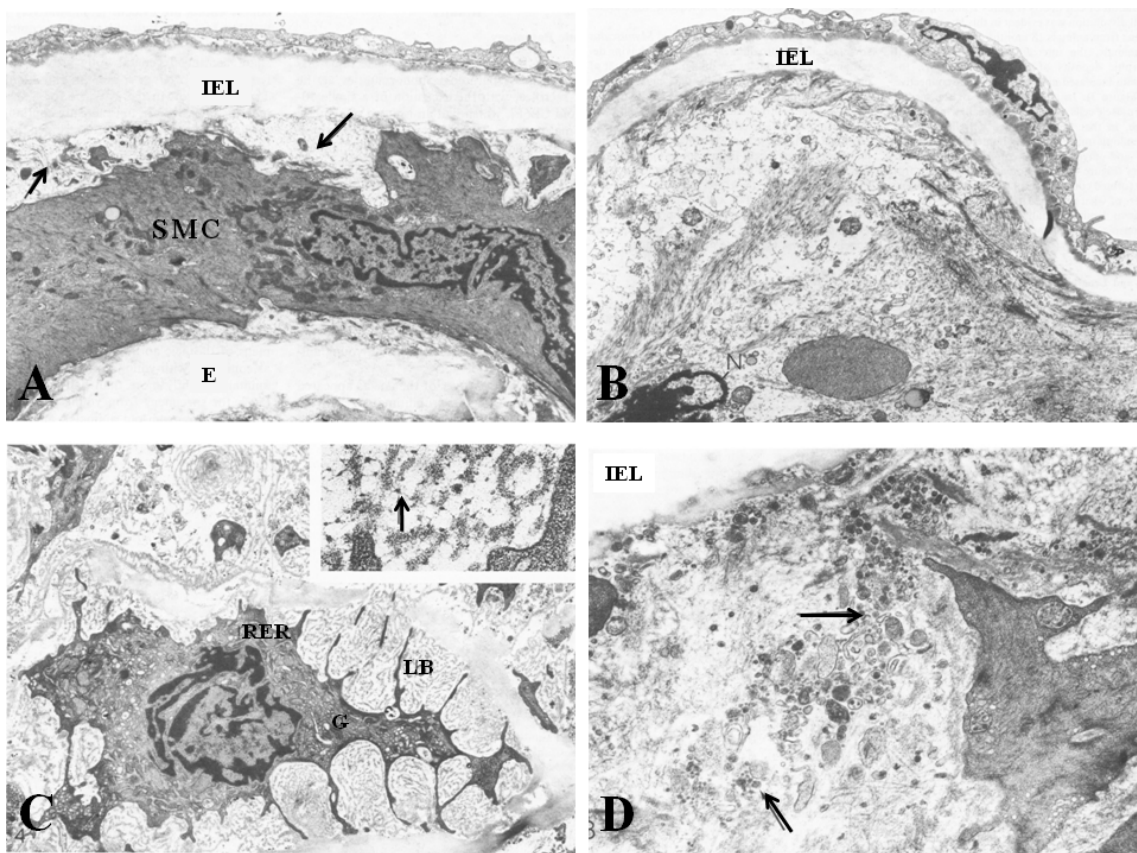
#### 3. 4. 1. Envejecimiento y senescencia de las células del músculo liso de la aorta

Se han realizado estudios en los que se han comparado, mediante microscopía electrónica, la aorta de individuos, en este caso ratones de diferentes edades, libres de signos clínicos y de anomalías anatomopatológicas (Figura I12). En individuos jóvenes se ha observado la presencia de células del músculo liso vascular (VSMCs) bien diferenciadas, conteniendo grandes cantidades de miofilamentos. Sin embargo, la presencia de retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi y mitocondrias es escasa y confinada a la región perinuclear de la célula. En la matriz intercelular se encuentra una escasa cantidad de fibras de colágeno, material filamentoso fino y, ocasionalmente, aparecen pequeñas vesículas unidas a la membrana (Figura I12 A). En el caso de animales envejecidos se observan, en la primera capa subintimal de la túnica media, evidentes signos de degeneración celular y acumulación de desechos (Figura I12 B y D), incluso en algunos casos llega a producirse la completa disolución celular de esta capa (Figura I12 B). La matriz celular contiene depósitos pleomórficos de residuos membranosos, junto con una cantidad incrementada, respecto a los animales jóvenes, de tejido conectivo fibroso (Figura I12 D). Muchas de las VSMCs de esta capa en animales viejos aparecen modificadas con la edad, con un importante desarrollo del retículo endoplásmico rugoso, numerosos elementos del aparato de Golgi y miofilamentos confinados en la periferia de la célula (Figura I12 C). La lámina basal de estas células presenta complicados pliegues y unida a ella aparecen gránulos electrodensos (Figura I12 C) (Martin y cols., 1983).

En este mismo estudio también se observó cómo con la edad no se producen variaciones significativas en la longitud de la aorta, sin embargo sí se produce un incremento progresivo del peso de la misma (Martin y cols., 1983).

Todo ello demostró que aun en ausencia de enfermedad se produce una serie de cambios en la aorta asociadas con la edad (Martin y cols., 1983).

**Figura I12.** Secciones de aorta de ratones macho CB6F, de diferentes edades, analizadas por microscopía electrónica. SMC, células del músculo liso. IEL, capa elástica interna. **A.** 6 meses de edad (x 5000), material granular indicado con flechas. **B.** 18 meses (x 8000), completa disolución celular. **C.** 24 meses (x 6800). RER, retículo endoplásmico rugoso. G, aparato de Golgi. LB, lámina basal. Sección ampliada de la LB (x 75000), gránulos electrodensos indicados con flechas. **D.** 30 meses (x 9000), detritos celulares indicados con flechas (Martin y cols., 1983).



Las VSMCs de la aorta de individuos envejecidos presentan indicadores de senescencia como son tinción  $\beta$ -galactosidasa positiva y elevada expresión de p16 (Yang y cols., 2007), lo cual también es detectable en VSMCs senescentes *in vitro* (Nakano-Kurimoto y cols., 2009).



Las células *in vitro* retienen muchas características morfológicas de las células *in vivo*, aunque también se producen importantes cambios tras el comienzo del cultivo a partir de tejido, como se ha visto por ejemplo en morfología, actividades enzimáticas (Fowler y cols., 1977), comportamiento proliferativo, proteínas contráctiles del citoesqueleto (Franke y cols., 1980; Kocher y cols., 1986 y 1987; Owens y cols., 1986) y distribución de sus componentes en las sucesivas divisiones (Absher y cols., 1988).

Se ha visto que los cambios en cultivo reflejan la modulación fenotípica de las VSMCs que proliferan *in vivo*, sin embargo, la capacidad de proliferación y pérdida de bioindicadores no sólo depende del método de cultivo y de la duración del mismo, sino también del origen de las células y de la edad del donante (Mazurkowitz y cols., 1979; Gospodarowicz y cols., 1981; Absher y cols., 1988).

De la misma manera que se ha observado en cultivos de fibroblastos, el número de divisiones *in vitro* de VSMCs desciende significativamente conforme aumenta la edad del donante. En el caso de cultivos obtenidos mediante explantes, se ha observado que el periodo de latencia (tiempo que las células requieren para empezar a migrar desde el fragmento del órgano a la placa de cultivo) está inversamente correlacionado con la edad del donante, es decir, a mayor edad del donante, mayor es el periodo de latencia (Bierman, 1978).

Las VSMCs recién sembradas tienen un gran porcentaje de miofilamentos y pocos orgánulos biosintéticos, así como retienen la capacidad para contraerse en respuesta a vasoconstrictores, lo que se corresponde con el fenotipo contráctil (diferenciado). Cuando se incrementa el tiempo en cultivo, las células se *transdiferencian* dando lugar al fenotipo sintético (desdiferenciado), disminuyendo el porcentaje de miofilamentos, y presentando una baja cantidad, a la vez que aumenta el porcentaje de orgánulos biosintéticos (Chamley-Campbell y cols., 1979) y lisosomas (Mazurkowitz y cols., 1980).

Con los subcultivos las células se aplanan más, adquiriendo una apariencia fibroblástica, con una concomitante reducción de  $\alpha$ -actina, mientras predomina la  $\beta$  y  $\gamma$ -actina no muscular. Durante los periodos de incremento de la proliferación, una proporción significativa de las células recobra su morfología en huso, con un incremento simultáneo del contenido de  $\alpha$ -actina. Finalmente, la abundancia de ésta disminuye en las últimas divisiones, lo cual podría considerarse como un indicador de senescencia. Las alteraciones de la actividad proliferativa y los perfiles intracelulares proteicos quizás reflejen cambios en el

fenotipo de las células, aunque es posible que también pueda deberse al aumento de la proporción de otros tipos celulares en cultivos que se consideraban minoritarios e incluso ausentes, como fibroblastos y células endoteliales. También se ha planteado que puedan existir dos poblaciones distintas de VSMCs, las cuales difieren en morfología y perfil proteico (Chamley-Campbell, 1979; Franke y cols., 1980; Owens y cols., 1986; Warshaw y cols., 1986; Absher y cols., 1988).

La pérdida de la capacidad de contracción se ve reflejada en los cambios en el contenido proteico cuando las células proliferan (Shanahan y cols.; 1993). En relación a las proteínas implicadas en la contracción hay opiniones contrapuestas. Según algunos autores, proteínas tales como SM-MHC, SM22 $\alpha$ , caldesmonina,  $\alpha$ -actina y calponina, se encuentran principalmente en el fenotipo contráctil y se pierden progresivamente durante la proliferación (Shanahan y cols., 1993). Otros autores han detectado una expresión significativa de SM22 $\alpha$ ,  $\alpha$ -actina y SM-MHC2 en VSMCs senescentes de modo similar a las células jóvenes, y por ello concluyen que es muy improbable la presencia de otros tipos de células que dominen la población celular durante el cultivo en extensos periodos (Nakano-Kurimoto y cols., 2009). Dos genes, osteopontina (OPN) y la proteína Gla de matriz (MGP) son muy abundantes en las VSMCs que han proliferado y durante la mineralización (calcificación vascular), con mayor abundancia que en aorta fresca o células recién extraídas (Shanahan y cols., 1993).

#### 3. 4. 2. Relación entre envejecimiento *in vivo* y calcificación vascular

El envejecimiento es uno de los mayores, sino el principal factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares (Lakatta, 2003). Muchos de los cambios en células vasculares senescentes concuerdan con cambios observados en enfermedades vasculares relacionadas con la edad (Sato y cols., 1993). Se ha observado como el engrosamiento de la túnica íntima y media de los vasos sanguíneos, asociado a la edad, se acompaña de dilatación luminal y reducción de la elasticidad o distensibilidad, junto con un incremento de la rigidez de los vasos (Lakatta y cols., II, 2003). La velocidad de la onda del pulso (VOP), constituye un método cómodo y no invasivo de determinación de la rigidez vascular, la cual se ha visto que se incrementa con la edad. El aumento de la VOP tradicionalmente se ha relacionado con alteraciones estructurales en la túnica media, incluyendo el incremento de colágeno vascular, fracturas y reducción de la elastina, así como la calcificación de los vasos (Avolio, 1995; Lakatta y cols., I, 2003). Se ha observado como la producción de elastasa está incrementada en VSMCs senescentes (Robert y cols., 1998). A todo ello se suma la reducción progresiva

de la eficacia de los mecanismos de reparación cardiovascular con el envejecimiento (Gennaro y cols., 2003; Reed y cols., 2004).

En procesos patológicos se ha observado como las VSMCs presentan características morfológicas de senescencia celular (Ross y cols., 1984; Bürrig, 1991). Se ha visto también que la liberación de angiotensina II se incrementa con la edad, la cual puede inducir senescencia prematura en VSMCs *in vitro*, vía p53/p21 (Najjar y cols., 2005; Kunieda y cols., 2006; Minamino y cols., 2008).

No se conoce exactamente si en el envejecimiento la calcificación medial se desarrolla únicamente como consecuencia de él, por una causa distinta de etiología desconocida, o como resultado de una confluencia de procesos específicos. El envejecimiento se asocia con grados leves de varios procesos que se cree que afectan la calcificación vascular, incluida la insuficiencia renal crónica, la resistencia a la insulina, la aterosclerosis, cambios hormonales, la elastolisis y alteraciones genéticas progresivas. Algunas de estas causas o una combinación de ellas pueden contribuir a la calcificación medial durante el envejecimiento (Demer y cols., 2008).

Hay evidencias que indican que el acortamiento de los telómeros tiene lugar en la vasculatura humana, lo cual podría relacionarse con las enfermedades vasculares asociadas a la edad (Minamino y cols., 2002). Las VSMCs tienen actividad telomerasa (Minamino y cols., 2001a), pero la actividad disminuye con el envejecimiento *in vitro*, por lo cual los telómeros se acortarían progresivamente y esto daría lugar a la senescencia celular (Hsiao y cols., 1997; Minamino y cols., 2001b). Por otra parte, la inducción de la actividad telomerasa en cultivo de VSMCs de rata incrementa su longevidad, de lo que se deduce un papel crítico de los telómeros y la telomerasa en el proceso de senescencia de las células vasculares (Chang y cols., 1995; Minamino y cols., 2001b; Yang y cols., 1999). Sin embargo otros estudios en diferentes órganos, indican que el porcentaje de células senescentes es mucho mayor que el porcentaje de células que presentan un acortamiento significativo de los telómeros con la edad (Hornsby, 2010). Esto, junto con la conocida existencia de patologías a edades avanzadas relacionadas con la calcificación vascular (sin relación con este acortamiento telomérico vascular), impiden descartar alguna de las dos hipótesis, siendo posible una convivencia entre ellas.

Se ha observado que la calcificación medial se incrementa con el envejecimiento. En un estudio realizado por Elliot y cols., se cuantificó la acumulación de calcio en la túnica media de aortas humanas, dividiendo esta capa en tres partes, túnica media interna, medial y externa. En todas las capas se observó un incremento de los depósitos cálcicos con la edad, siendo mayor en la parte medial, parte de la túnica media más rica en elastina. Los depósitos de calcio fueron aproximadamente 35 veces mayores en individuos de 90 años que en individuos de 20 años (Elliot y cols., 1994). Del mismo modo se ha observado que la incubación de aortas *in vitro*, con suero de individuos envejecidos, promueve la calcificación (Martin y cols., 1963).

### 3. 4. 3. Relación entre senescencia celular y calcificación vascular

Las VSMCs senescentes adoptan un fenotipo desdiferenciado y se *transdiferencian* hasta llegar a un fenotipo osteogénico, provocando una reducción de la elasticidad y adaptabilidad de las arterias (Burton y cols., 2009).

En vasos calcificados espontáneamente, de individuos envejecidos, se ha observado un descenso en la expresión de MGP (anticalcificante) y un incremento de la expresión de fosfatasa alcalina (ALP, procalcificante, promueve la calcificación por ruptura del pirofosfato, el cual inhibe la calcificación) (Shanahan y cols., 1999). En el caso de vasos calcificados mediante la inducción de senescencia (*knock-out* para Klotho, gen característico de células jóvenes) se ha observado un incremento en la expresión del factor de transcripción CBFA1 (procalcificante), lo que indica la importancia de la transición osteoblástica de VSMCs senescentes en la calcificación vascular (Nakano-Kurimoto, 2009).

Se ha planteado la hipótesis de que en los vasos sanos la calcificación esté inhibida por inhibidores proteicos, y ésta comience cuando se pierde la inhibición o el equilibrio entre inhibición y calcificación se altera (Shanahan y cols., 1994; Shanahan y cols., 2000).

*In vitro*, la calcificación ocurre cuando las VSMCs son cultivadas con un medio enriquecido en fosfato (medio calcificante). Cuando se incuba con el medio calcificante las células senescentes desarrollan calcificación con mayor rapidez que las células jóvenes. Aunque la apoptosis contribuye a la progresión de la calcificación *in vitro*, el número de células apoptóticas no muestra grandes diferencias entre células senescentes y células jóvenes cultivadas con un medio calcificante. Por ello se piensa que otros factores causan el aumento

de la calcificación en células senescentes como podría ser la transición osteoblástica (Nakano-Kurimoto y cols., 2009; Burton y cols., 2010).

Genes altamente expresados en osteoblastos, tales como ALP y colágeno de tipo I, están sobreexpresados significativamente en VSMCs senescentes, sugiriendo su transición osteoblástica durante la senescencia. Se han realizado *knock-down* de ALP y colágeno tipo I y se ha observado una reducción significativa de la calcificación en células senescentes (Nakano-Kurimoto y cols., 2009).

CBFA1, el factor de transcripción que inicia la transición osteoblástica, también se ve sobreexpresado en VSMCs senescentes, y su *knock-down* reduce la expresión de ALP y la calcificación en VSMCs senescentes, incrementándose a su vez la expresión de MGP (Nakano-Kurimoto, 2009).

Otros factores de transcripción implicados en la transición osteoblástica son Msx2 y Osterix, los cuales no se ven incrementados en células senescentes, lo que lleva a concluir que la transición osteoblástica de VSMCs en la senescencia probablemente sea distinta de la diferenciación osteoblástica fisiológica, aunque compartan ciertos mecanismos (Nakano-Kurimoto y cols., 2009).

La expresión de MGP, una proteína anticalcificante, se encuentra reducida significativamente en VSMCs senescentes en comparación con células jóvenes (Proudfoot y cols., 2006; Burton y cols., 2009; Nakano-Kurimoto, 2009). Algunos autores indican que la expresión del mRNA de MGP se ve reducida en la calcificación medial asociada a senescencia (Nakano-Kurimoto, 2009). Entre otros factores anticalcificantes se encuentran también las proteínas decorina y osteoprotegerina, las cuales se encuentran también inhibidas en VSMCs senescentes (Burton y cols., 2009).

En relación a BMP-2, la proteína de matriz ósea de tipo 2, potente factor de diferenciación osteoblástica, algunos autores afirman que no hay diferencias en la expresión entre células senescentes y jóvenes (Nakano-Kurimoto, 2009), pero otros indican que su expresión está incrementada en células senescentes (Proudfoot y cols., 2006; Burton y cols., 2009). A pesar de las contradicciones entre estos estudios, el análisis de MGP, inhibidor de BMP2, en todos ellos reveló la represión de MGP en células senescentes, sugiriendo que si

BMP2 se encuentra sobreexpresado es como consecuencia de la pérdida de inhibición por MGP (Burton y cols., 2010).

Algunas citoquinas y factores de crecimiento son importantes en la diferenciación osteoblástica, jugando un importante papel en la iniciación del fenotipo osteoblástico en VSMCs senescentes. La interleuquina 1- $\beta$  (IL1 $\beta$ ) se encuentra sobreexpresada en células senescentes (Minamino y cols., 2003; Burton y cols., 2009; Coppé y cols., 2010). Este incremento de IL1 $\beta$  podría estimular la expresión de BMP2 en VSMCs, ya que tanto IL1 $\beta$  como TNF $\alpha$  incrementan la expresión de BMP2 en condrocitos (Fukui y cols., 2003; Burton y cols., 2010). En este caso el incremento de IL1 $\beta$  daría lugar a la sobreexpresión de BMP2 y esto último induciría la expresión de CBFA1 (Burton y cols., 2010).

## **4. CALCIFICACIÓN DE LA TÚNICA MEDIA DE LA AORTA (ESCLEROSIS DE MÖNCKEBERG)**

### **4. 1. INTRODUCCIÓN**

Las calcificaciones patológicas se caracterizan por el depósito de estructuras ricas en fosfatos de calcio en regiones donde estas estructuras normalmente no están presentes, y en este caso aparecen como consecuencia de reacciones inesperadas. Pueden clasificarse en función del estímulo iniciador: trauma, tumor, trastornos del metabolismo mineral, inflamación o causas idiopáticas. Varios componentes celulares se han visto involucrados en estas calcificaciones y hay evidencias que sugieren que las osificaciones y mineralizaciones patológicas son procesos regulados. En términos de estructura y análisis elemental no hay diferencias significativas entre mineralización patológica y formación del hueso (Epple & Bäuerlein, 2007).

La calcificación puede denominarse como “metastática” o “distrófica”. La primera indica que la calcificación tiene lugar en tejidos normales cuando aparecen altas concentraciones de calcio y fósforo, la segunda hace referencia a la calcificación que tiene lugar en tejidos dañados con concentraciones normales de calcio y fósforo (Eisenstein y cols., 1960; Reif y cols., 1972). La calcificación vascular se considera como metastática cuando se asocia a hipercalcemia y/o hiperfosfatemia, como es el caso de la esclerosis de Mönckeberg;

y distrófica cuando se asocia a aterosclerosis o cuando tiene lugar en vasos que presentan cambios degenerativos asociados al envejecimiento (Boström y cols., 2000; Shioi y cols., 2000; Boström, 2001; Demer y cols., 2003; Bonucci, 2007).

La calcificación vascular puede ocurrir tanto en la túnica íntima como en la túnica media. La esclerosis de Mönckeberg es un proceso degenerativo, el cual tiene lugar en la túnica media de arterias y aparentemente no está directamente relacionado con la enfermedad inflamatoria, aunque en algunos estudios se les ha relacionado (Moe y cols., 2005). La calcificación medial arterial no se acompaña del depósito de lípidos o colesterol como en la aterosclerosis, ni se produce la obstrucción del vaso. Preferentemente ocurre en la población envejecida, en individuos con diabetes o insuficiencia renal crónica/uremia (Trion y cols., 2004; Epple & Bäuerlein, 2007; Nakano-Kurimoto y cols., 2009).

Se han descrito dos procesos patológicos diferentes involucrados en la esclerosis de Mönckeberg, asociados a los depósitos minerales. Por un lado, un proceso degenerativo que daría lugar a apoptosis o necrosis de las VSMCs de la túnica media, y por otro, un proceso de *transdiferenciación* de las VSMCs, las cuales expresarían un fenotipo osteogénico (Epple & Bäuerlein, 2007).

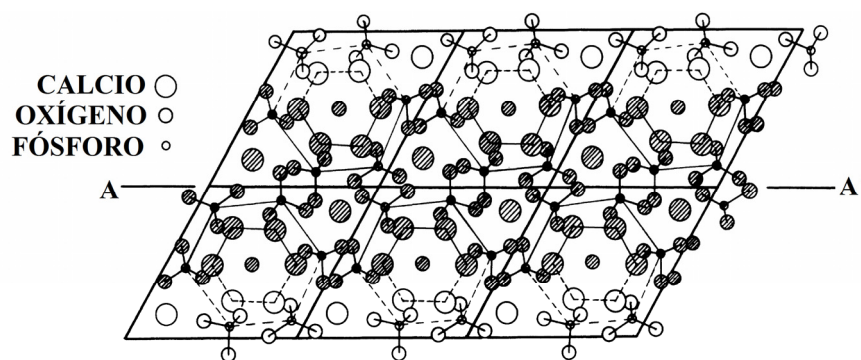
## 4. 2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CALCIFICACIONES

### 4. 2. 1. Fase inorgánica

La naturaleza y composición de los depósitos inorgánicos encontrados en la aorta parecen no diferir en gran medida de los depósitos inorgánicos en tejidos óseos. Los depósitos encontrados tienen una estructura igual a la hidroxiapatita ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ) o muy similar (Bonucci, 2007) (Figura I13). Por ejemplo, la hidroxiapatita es el mineral predominante en calcificación medial asociada a diabetes, pero en determinadas situaciones como intoxicación por vitamina D, la whitlockita es el más abundante (Verberckmoes y cols., 2007). Generalmente se ha asumido que las modificaciones en la estructura de la hidroxiapatita suelen ser consecuencia de la presencia de iones impuros o defectos en su formación, en algunos casos dando lugar a compuestos más solubles y con un grado variable de cristalización dependiente del tiempo (Fitzpatrick y cols., 1994; Tomazic, 2001; Bonucci, 2007). Pueden existir varios precursores de la biomineralización, uno de ellos es el fosfato de octacalcio (fosfato de calcio ácido),  $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Otro de sus precursores es el fosfato

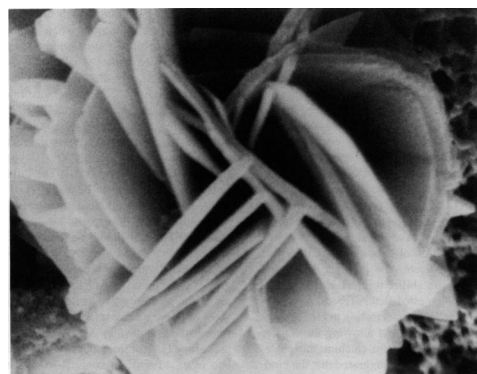
de di-calcio di-hidratado (brusita),  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Ambos fosfatos precipitan en primer lugar para ser, posteriormente, hidrolizados *in situ* y transformados en un producto intermedio entre ambas formas e hidroxiapatita, siendo muy lenta la maduración hasta hidroxiapatita (Brown y cols., 1987; Mats y cols., 1992).

**Figura I13.** Proyección, eje c, de la estructura de la hidroxiapatita. Se muestran seis unidades celulares. Los átomos sombreados definen la región de estructura similar entre hidroxiapatita y fosfato de octacalcio (Brown y cols., 1987).



En las calcificaciones vasculares pueden encontrarse varios tipos de cristales. Cristales en forma de agujas, como los presentes en hueso y cartílago, se han encontrado en aortas de conejos tratados con vitamina D (Eisenstein y cols., 1964) y en arterias arterioscleróticas (Daoud y cols., 1985; Tanimura y cols., 1986). En arterias humanas estos cristales forman placas redondeadas (Figura I14) o con forma de plaqueta, agregados de forma similar a los nódulos presentes en calcificaciones de hueso y cartílago, teniendo estos cristales un tamaño máximo de  $8 \times 80 \times 200 \mu\text{m}$  (Paegle, 1969; Mats y cols., 1992). (Bonucci, E., 2007).

**Figura I14.** Cristales de fosfato de octacalcio en forma de placas, observados mediante microscopía electrónica (Mats y cols., 1992).





#### 4. 2. 2. Matriz calcificante

Las fibras elásticas arteriales son consideradas como las primeras estructuras donde se produce el depósito de las sustancias inorgánicas (Seifert y cols., 1966). Existe una estrecha relación entre las estructuras cristalinas inorgánicas y los filamentos de elastina (Bonucci y cols., 1975), aunque la calcificación está relacionada, más bien, con el material que recubre las láminas elásticas que directamente con ellas (Martin y cols., 1963; Gardner y cols., 1968). En algunos de los casos en los que aparecen calcificadas las fibras elásticas, la sustancia inorgánica se ha relacionado con polianiones resistentes a la hialuronidasa (Martinez-Hernandez y cols., 1974). (Bonucci, 2007).

Existen varios estudios en los que se han eliminado selectivamente varios compuestos de la aorta mediante el uso de enzimas proteolíticas. De estos estudios se ha concluido que la presencia de elastina es un requisito para el inicio de la mineralización, a diferencia del colágeno, el cual parece no estar implicado en el proceso de iniciación, sino en un proceso secundario (Martin y cols., 1963).

La degradación de la elastina tiene lugar en muchos procesos que cursan con calcificación medial, liberando metabolitos que pueden activar, incluso nuclear, el depósito de calcio (Price y cols., 1998; Dao y cols., 2005; Essalihi y cols., 2005; Bailey y cols., 2004; Lomashvili y cols., 2004; O'Neill, 2007). La matriz de elastina intacta estabiliza el fenotipo de las VSMCs, de modo que su degradación está asociada a patologías. Paralelamente a la degradación de elastina se ha observado el incremento de la expresión de osteogenes, contribuyendo así a la calcificación, y la activación de la metaloproteinasa-9, una elastasa que continuaría con la degradación de la propia elastina (Lee y cols., 2006; Qin y cols., 2006).

Aunque se ha demostrado que las fibras elásticas participan en la calcificación (Meyer y cols., 1967; Paule y cols., 1992) se sospecha también que el resto de estructuras de la capa media, eventualmente, también pueden estar implicadas en la progresión de la calcificación (Eisenstein y cols., 1964). (Bonucci, 2007).

Finalmente, las propias VSMCs, incluso la población de células madre relacionadas con la aorta (Campbell y cols., 2000) y los pericitos (Collet y cols., 2005), podrían contribuir a la calcificación gracias a la *transdiferenciación* y expresión de un fenotipo osteogénico (Shanahan y cols., 1999; Tintut y cols., 2003; Tyson y cols., 2003; Davies y cols., 2005),

modificación de la matriz, e iniciación de los depósitos hasta dar lugar a la estructura final de hidroxiapatita (Bonucci, 2007; Villa-Bellosta y cols., 2011b).

#### 4. 3. IMPLICACIÓN DE LA *TRANSDIFERENCIACIÓN* DE VSMCs EN LA CALCIFICACIÓN MEDIAL

La calcificación vascular es un proceso complejo, razón por la cual todavía existen dos teorías diferentes que buscan dar explicación a su origen (Epple & Bäuerlein, 2007):

- Sólo osteoblastos, odontoblastos y condrocitos hipertróficos tendrían la capacidad de producir factores que inducirían la mineralización de la matriz extracelular. Según esta teoría, la mineralización de la aorta estaría inducida activamente como consecuencia de la *transdiferenciación* osteoblástica, bajo determinadas circunstancias.
- Sólo las células no esqueléticas, como es el caso de las VSMCs, producirían factores que evitarían la mineralización de la matriz extracelular. Según esta teoría, la mineralización patológica es activamente inhibida por la presencia de dichos inhibidores, mientras la mineralización fisiológica es explicada por la ausencia de inhibidores, del mismo modo que ocurre en la calcificación vascular.

En relación con estas dos teorías, se han encontrado factores de regulación ósea en los vasos sanguíneos, particularmente en lugares de calcificación medial, así como inhibidores de la calcificación en vasos sanos (Shanahan y cols., 1999; Tyson y cols., 2003; Bostrom, y cols., 1993).

La expresión de los bioindicadores de VSMC, como SM22 $\alpha$  y  $\alpha$ -actina, se ve intensamente reducida durante la mineralización, mientras que se incrementa la de genes normalmente restringidos a la mineralización de tejidos como hueso y diente, como son BMP2, Msx2, CBFA1, fosfatasa alcalina y osteocalcina. Además, también se ve alterada la presencia de inhibidores de la calcificación, como serían la osteopontina, osteoprotegerina, pirofosfato inorgánico, MGP y fetuina. En general, estos cambios indicarían la pérdida del fenotipo contráctil de VSMCs, para *transdiferenciarse* y obtener un fenotipo osteo/condrogénico.

La osteoprotegerina (OPG) es una glicoproteína soluble, miembro de la superfamilia TNF, que inhibe la calcificación por medio del eje OPG/RANKL/RANK (Bucay y cols.,

1998; Papadopouli y cols., 2008). OPG es una proteína homóloga al Receptor Activador del factor Nuclear  $\kappa\beta$  (RANK), proteína transmembranosa, la cual por tanto puede unirse a su ligando, la proteína soluble RANKL, bloqueando la unión entre RANK y RANKL, resultando en la inhibición de la diferenciación osteoblástica. Además de a RANKL, OPG se une a TRAIL, neutralizando a este factor pro-apoptótico (Lacey y cols., 1998).

La osteopontina (OPN) constituye otro de los anticalcificantes implicados en la inhibición del proceso, es una fosfoproteína, la cual no está expresada en vasos sanguíneos normales, mientras sí se encuentra sobrerregulada en lugares de calcificación arterial, como se ha observado en pacientes urémicos, con fallo renal o diabetes (Ahmed y cols., 2001; Moe y cols., 2002). A partir de estudios *in vivo* e *in vitro* se ha concluido que OPN no sólo inhibe el crecimiento del cristal por unión directa al calcio de la superficie del mismo, sino que también promueve activamente su disolución al favorecer la acidificación del medio extracelular tras inducir la expresión de la anhidrasa carbónica II (Steitz y cols., 2002; Speer y cols., 2002). Para llevar a cabo la inhibición de la calcificación es necesario que la OPN se encuentre fosforilada en residuos serina y treonina (Jono y cols., 2000). Por tanto, factores que impiden su correcta fosforilación, como la ALP, inhiben su acción anticalcificante (Essalihi y cols., 2004; Lomashvili y cols., 2004). Se ha observado que la deficiencia de OPN en ratones no produce calcificación vascular por sí sola, pero acelera la calcificación si se encuentra ausente en ratones deficientes en MGP (Speer y cols., 2002). A partir de estos resultados se sugiere que OPN no es un inhibidor endógeno de la calcificación en vasos normales, sino que quizás su acción se centra en la modulación de la calcificación en un estado más avanzado, ya que solamente está presente en vasos calcificados, no en vasos sanos. Otro hecho que apoya esta teoría es la ausencia de calcificación por su sola inhibición, requiriéndose conjuntamente la deficiencia de MGP para desarrollarse calcificación (Lomashvili y cols., 2004).

El pirofosfato inorgánico (PPi), es una pequeña molécula constituida por dos iones fosfato unidos por un enlace éster, el cual inhibe la calcificación a través de su propia acumulación en las regiones a calcificar, se une a los cristales de hidroxapatita por sus grupos fosfato con afinidad por calcio y previene la incorporación de iones fósforo en estos cristales (Fleisch y cols., 1962; Price, 1989; Terkeltaub, 2001; Murshed y cols., 2005; Proudfoot y cols., 2006). También se ha demostrado que la ausencia de calcificación en condiciones normofosfatémicas es consecuencia de la presencia de PPi y otros factores

anticalcificantes (Villa-Bellosta y cols., 2011b). La ausencia de la enzima responsable de la síntesis de PPI, la ectonucleótido pirofosfato/fosfodiesterasa-1, NPP1, y del transportador de pirofosfato, la proteína ANK, produce calcificación medial severa al impedir su liberación desde la célula al medio extracelular (Rutsch y cols., 2001; Johnson y cols., 2005). Por ello, la presencia de pirofosfatasas, como la fosfatasa alcalina (ALP), promovería la calcificación por hidrólisis del pirofosfato (Lomashvili y cols., 2004, 2005 y 2008).

La proteína de matriz Gla (MGP) es un inhibidor de la calcificación dependiente de la vitamina K, y para encontrarse activa debe ser  $\gamma$ -carboxilada, en una reacción mediada por esta vitamina (Hao y cols., 1995). De hecho, ratas tratadas con warfarina, un antagonista de la vitamina K, desarrollan calcificación vascular medial (Price y cols., 1998 y 2006), tanto por falta de carboxilación como por inhibición directa de la síntesis de MGP, como se ha demostrado en un reciente estudio (Lomashvili y cols., 2011). Además, ratones que presentan delección del gen de MGP presentan una calcificación severa (Luo y cols., 1997). Humanos con una mutación que altera la formación de MGP (síndrome de Keutel) también desarrollan calcificación vascular medial, pero en menor grado que por delección (Hao y cols., 1995; Meier y cols., 2001). En el caso de aortas calcificadas algunos autores indican que se observa un descenso de MGP inversamente correlacionado con el grado de calcificación, mientras otros indican que esta proteína aparece sobrerregulada en vasos calcificados (Shioi y cols., 1995; Mori y cols., 1998; Tintut y cols., 1998; Steitz y cols., 2001; Moe y cols., 2004). En caso de ser anticalcificante, lo esperable habría sido la ausencia de MGP en los vasos calcificados, sin embargo los vasos urémicos no sólo no son deficientes en MGP, sino que se encuentra sobrerregulada, particularmente en los lugares de calcificación (Lomashvili y cols., 2006). Una posible explicación sería que no se llevase a cabo la  $\gamma$ -carboxilación, sin embargo recientemente se ha comprobado que ésta si se lleva a cabo, y que es posible determinar la presencia tanto de la forma carboxilada, GlaMGP (MGP con residuos Gla, ácido carboxiglutámico), como GluMGP, no siendo por tanto la ausencia de carboxilación la causa primaria de la calcificación en este caso (Lomashvili y cols., 2011).

El mecanismo por el que MGP inhibe la calcificación no está claro, aunque parece ser por unión a la hidroxiapatita (Roy y cols., 2002), lo que se corroboraría por la presencia de MGP en aortas calcificadas, siendo su contenido proporcional al contenido de hidroxiapatita (Price y cols., 2000) y por la alta concentración de MGP alrededor de los depósitos de hidroxiapatita (Shanahan y cols., 1999; Spronk y cols., 2001).

Otro mecanismo de acción que se ha propuesto para MGP es la inactivación de BMP2, por unión a él (Wallin y cols., 2000; Boström y cols., 2001). BMP2 es un potente inductor de la diferenciación osteoblástica de los precursores mesenquimales de las células a través de la activación de CBFA1 y Msx2 (Lee y cols., 2000; Hruska y cols., 2005). El resultado de la inactivación de BMP2 por MGP ha sido propuesto a partir de estudios *in vitro* (Boström y cols., 2001; Zebboudj y cols., 2003). Sin embargo los resultados en vasos sanos no apoyan esta teoría, ya que los tratamientos con warfarina y la consiguiente inactivación de MGP, no tienen efecto sobre la transcripción de CBFA1 (Romberg y cols., 1986).

La discrepancia entre los resultados *in vitro* e *in vivo* apoya la teoría de que MGP previene la calcificación medial por unión directa a la hidroxapatita, inhibiendo su formación, lo que también es apoyado por el incremento del contenido de MGP en aortas calcificadas (Romberg y cols., 1986).

Los resultados en cultivo sugieren que la deficiencia de PPI, pero no de MGP, es suficiente para producir calcificación, y que la deficiencia de PPI es necesaria para que se produzca la calcificación en ausencia de MGP (Loshmavili y cols., 2011), aunque la importancia relativa de PPI y MGP no están claras *in vivo* (Luo y cols., 1997; Price y cols., 1998; Rutsch y cols., 2001; Johnson y cols., 2005).

En contraste con OPN, OPG, PPI y MGP, que ejercen su acción en la pared de los vasos, la fetuina, también conocida como glicoproteína  $\alpha$ 2-Heremans-Schmid (Ahsg), es un inhibidor de la calcificación circulante. *In vitro*, la fetuina inhibe la formación *de novo* de los cristales de hidroxapatita, pero no afecta a los ya formados. *In vivo* se ha demostrado como los ratones deficientes en fetuina desarrollan una intensa calcificación de los tejidos blandos (Heiss y cols., 2003; Ketteler y cols., 2003 y 2005; Johnson y cols., 2006). El complejo MGP-fetuina en suero parece que evita la propagación del fosfato de calcio precipitado (Price y cols., 2002), aunque la función de MGP en este complejo no está clara.

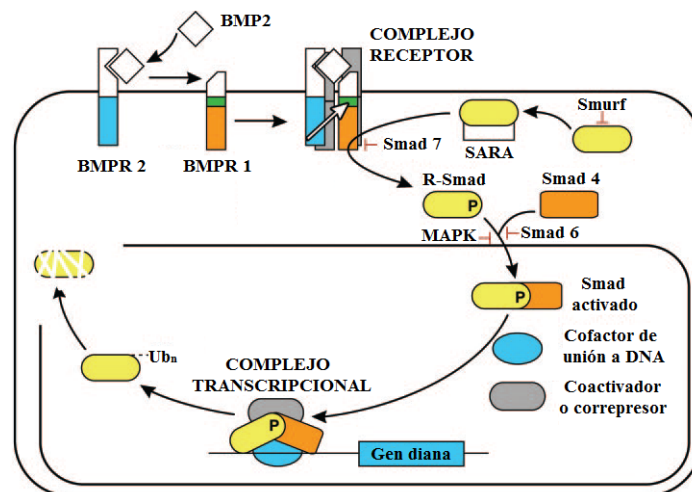
En los vasos sanguíneos, algunos estímulos promueven la transferencia osteogénica de las VSMCs (Reynolds y cols., 2004; Chen y cols., 2006; Byon y cols., 2008).

La familia de proteínas BMP (proteínas morfogenéticas del hueso) está constituida por conocidos inductores de calcificación ectópica (Wang y cols., 1990). Las BMPs son una gran subclase de la superfamilia de factores de crecimiento  $\beta$ , TGF $\beta$ , conocida como

mediadora en la calcificación vascular. Dentro de la familia de BMP destacan como procalcificantes BMP2, BMP4 y BMP6. Sin embargo también en ella existe un inhibidor de la calcificación, la proteína BMP7 (Hruska y cols., 2005; Johnson y cols., 2006).

Entre los BMPs involucrados en calcificación vascular destaca la acción de BMP2, la cual se inicia por la unión a su correspondiente receptor (BMPR), un heterodímero formado por BMPR2 y BMPR1. La unión de BMP2 al receptor 2 activa al receptor de tipo 1, el cual una vez activo fosforila a las proteínas reguladoras Smad, y éstas se unen a su receptor soluble (Massague y cols., 2000; Chen y cols., 2004). El complejo Smad-receptor se trasloca al núcleo donde se une a cofactores de unión a DNA y coactivadores, y ya formado el complejo transcripcional se une al DNA regulando la expresión de genes diana osteogénicos (Figura I15) (ten Dijke y cols., 2003; Hruska y cols., 2005). Cabe destacar que hay algunos efectos de BMP2 que parecen no estar mediados por la unión a receptores (Johnson y cols., 2006).

**Figura I15.** Mecanismos de señalización de BMP2 en la calcificación vascular (Hruska y cols., 2005).



Se ha demostrado la existencia de dos tipos de Smad, 6 y 7, que en lugar de activar genes osteoblásticos, se encargan de la inhibición de la señal de BMP2 (Figura I15). Smad 6 realiza su inhibición por competición con Smad 4, mientras que Smad 7 se une al receptor BMPR2 e inhibe su señalización. La realización de *knock-out* de Smad 6 ha dado lugar a una

extensa calcificación ectópica de todas las capas de los vasos sanguíneos y metaplasia cartilaginosa en la aorta (Galvin y cols., 2000; Hruska y cols., 2005).

En contraste con las acciones de BMP2, BMP7 promueve el fenotipo propio de VSMCs debido a la sobreexpresión de Smad 6 y 7. Se ha observado como BMP7 sobreexpresa la expresión de  $\alpha$ -actina y evita y revierte la transición al fenotipo osteoblástico (Dorai y cols., 2000). Las diferentes acciones de BMP2 y BMP7 se han relacionado con diferentes receptores y vías de señalización desencadenadas posteriormente (Hruska y cols., 2005).

BMP2 es un mediador crucial en el proceso de calcificación vascular a través de inducción de factores de transcripción entre los que se incluyen Msx2, CBFA1 y osterix (Hruska y cols., 2005; Johnson y cols., 2006).

Msx2 es un factor de transcripción activador de la osteoblastogénesis, expresado en cultivos de VSMCs y vasos calcificados, e inducido por BMP2. Las células que expresan Msx2 elaboran señales paracrinas que promueven la diferenciación osteogénica y suprimen la adipogénesis. Msx2 regula positivamente la expresión de múltiples ligandos Wnt (Goodwin y cols., 2002) y mejora la señalización aórtica canónica de Wnt (Mao y cols., 2002). Por lo tanto, Msx2 activaría la localización nuclear de  $\beta$ -catenina a través de Wnt al impedir su fosforilación. En el núcleo  $\beta$ -catenina se une al factor de transcripción de células T/factor potenciador linfocitario (TCF/LEF) y recluta a su coactivador, la proteína de unión a CREB (CBP), lo que induce la expresión de genes que dan lugar a la diferenciación de osteoblastos (Eastman y cols., 1999; Hu y cols., 2005). Entre sus efectos más importantes se encuentra la activación de osterix (Rifas y cols., 2003; Hruska y cols., 2005). Las primeras células vasculares en las que se observó la inducción de Msx fue en los fibroblastos adventiciales (Towler y cols., 1998), los cuales influirían sobre las VSMCs mediales a través de señales paracrinas de Wnt desde la adventicia a la túnica media (Heistad y cols., 1981). También se ha observado que las propias células adventiciales pueden migrar hasta la túnica media en respuesta a una lesión mural (Hu y cols., 2004) contribuyendo al conjunto de células calcificantes de la túnica media (Shao y cols., 2005).

CBFA1 (factor de unión central a la subunidad  $\alpha$ 1), también conocido como RUNX2 (factor de transcripción 2 relacionado con Runt), es un regulador clave de la diferenciación osteoblástica, y que, como se ha indicado antes, puede ser activado por BMP2 (Hruska y

cols., 2005; Johnson y cols., 2006). Se ha visto que individuos deficientes en CBFA1 presentan una osificación incompleta, lo que indica el papel crucial de CBFA1 en la formación del hueso (Ducy y cols., 1997; Komori y cols., 1997; Otto y cols., 1997; Mundlos y cols., 1997). La expresión de CBFA1 en VSMCs es un bioindicador temprano de diferenciación osteoblástica (Moe y cols., 2003). CBFA1 controla la expresión de varias proteínas implicadas en la calcificación, incluyendo a osteocalcina, OPN y colágeno tipo I (Xiao y cols., 2005). Sin embargo, existe una relación pobre entre la abundancia del mRNA de CBFA1 y la expresión de genes osteoblásticos relacionados con él, y esto es debido a que la transcripción dependiente de CBFA1 no es simplemente regulada por la cantidad de proteína CBFA1 presente, sino que también está regulada por las interacciones entre la célula y la matriz extracelular mediada por integrinas. La ruta de la señal de transducción es mediada por la rama MEK/ERK de la ruta de las proteinkininas activadas por mitógenos (MAPK) (Xiao y cols., 2002; Franceschi y cols., 2003) y por la inducción de la vía cAMP por TNF $\alpha$  (Tintut y cols., 2000). Aunque CBFA1 es un mediador crucial de la diferenciación osteoblástica, por sí solo no es capaz de inducir el fenotipo. Parece ser que para que se lleven a cabo todos sus efectos CBFA1 requiere la activación de osterix. Se ha observado que en ratones deficientes en osterix la formación de hueso no se lleva a cabo, aunque las células de estos animales sí expresan CBFA1. Por el contrario células aisladas de animales deficientes en CBFA1 no expresan osterix, sugiriendo que su transcripción es consecuencia de CBFA1, y porque, además, CBFA1 se une al promotor de la transcripción de osterix (Nakashima y cols., 2002; Nishio y cols., 2006).

Se ha demostrado que la capacidad de osterix para inducir la formación del hueso se ve incrementada por la interacción cooperativa entre los factores nucleares de células T activadas (NFATs) con los promotores de los genes regulados por osterix (Koga y cols., 2005). NFATs son activados, a través de la señalización por citoquinas, por RANK, así como por desfosforilación como resultado de la señalización calcio/calmodulina. El mensajero secundario calcio/calmodulina activa la calcineurina, la cual se une directamente a NFATs. La desfosforilación de NFATs permite su translocación al núcleo y la activación de sus genes diana, entre ellos el del propio osterix (Proudfoot y cols., 1998; Yang y cols., 2004). Una función destacada de osterix es la inducción de la síntesis de ALP (Nakashima y cols., 2002).

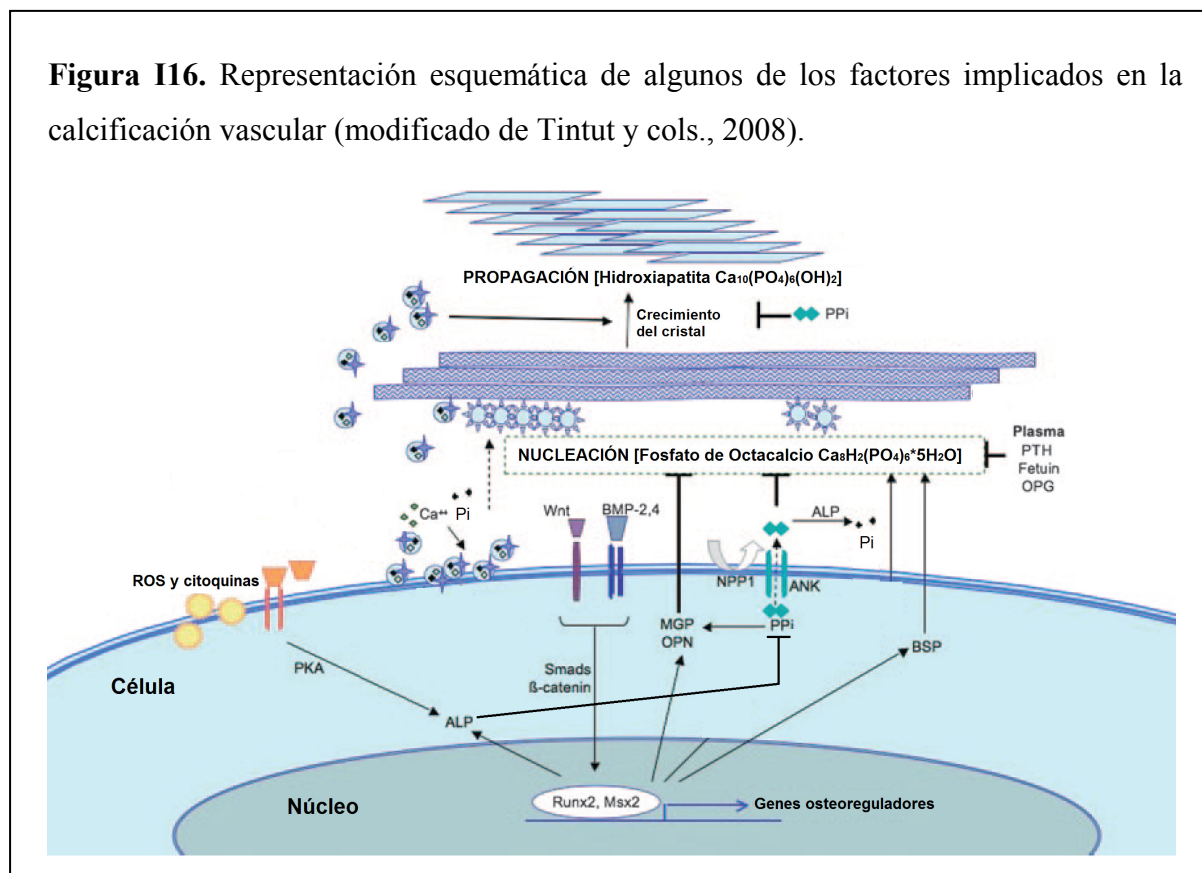
La calcificación vascular también se ha visto favorecida por proteínas asociadas al hueso, como osteonectina, osteocalcina y sialoproteína ósea. La osteonectina, también



conocida como BM-40 o SPARC (proteína ácida de secreción, rica en cisteína) es una glicoproteína involucrada en la matriz de mineralización, por unión a la hidroxiapatita y a iones calcio libres, la cual se ha relacionado con la iniciación de la calcificación (Termine y cols., 1981). La sialoproteína ósea (BSP) se ha visto que sirve de núcleo para la formación del cristal (Hunter y cols., 1993). La osteocalcina (proteína Gla del hueso, BGP) es una pequeña proteína con un puente disulfuro y tres residuos Gla (ácido carboxiglutámico), resultantes de una carboxilación post-traducciona (vitamina K dependiente) que le permite ligar al calcio. Su función está relacionada con la maduración de los cristales de hidroxiapatita en la matriz de estructuras mineralizadas (Romberg y cols., 1986). Se ha observado un incremento en la presencia de estas proteínas asociada al incremento de la calcificación, así como también se ha detectado su presencia en la túnica media en regiones de desorganización de VSMCs debida al depósito de sustancias similares a la matriz, antes de tener lugar los depósitos cálcicos, lo que podría indicar que su presencia es necesaria para que se inicie la calcificación (Moe y cols., 2002).

Además de la inducción o favorecimiento de la progresión de la calcificación por estas proteínas relacionadas con el hueso, la degeneración de la túnica media se ha visto que favorece los depósitos cálcicos (Kim, 1976).

**Figura I16.** Representación esquemática de algunos de los factores implicados en la calcificación vascular (modificado de Tintut y cols., 2008).



#### 4. 4. CONSECUENCIAS PATOLÓGICAS DE LA CALCIFICACIÓN MEDIAL

La calcificación medial da lugar al incremento de la rigidez arterial, la cual produce el incremento de la presión y rapidez del pulso, con descenso de la presión sanguínea diastólica e incremento de la sistólica (Johnson y cols., 2006), hipertrofia ventricular izquierda, isquemia miocárdica y de las extremidades inferiores, y fallo cardíaco congestivo (Kelly y cols., 1992; Watanabe y cols., 1992; Ohtsuba y cols., 1994).

En el caso de insuficiencia renal crónica y diabetes mellitus de tipo II, la calcificación vascular es un importante marcador de mortalidad en ambas (Amann, 2008) y de amputación de extremidades inferiores en diabetes (Reaven y cols., 2005).

### **5. ARSÉNICO**

#### 5. 1. DEFINICIÓN

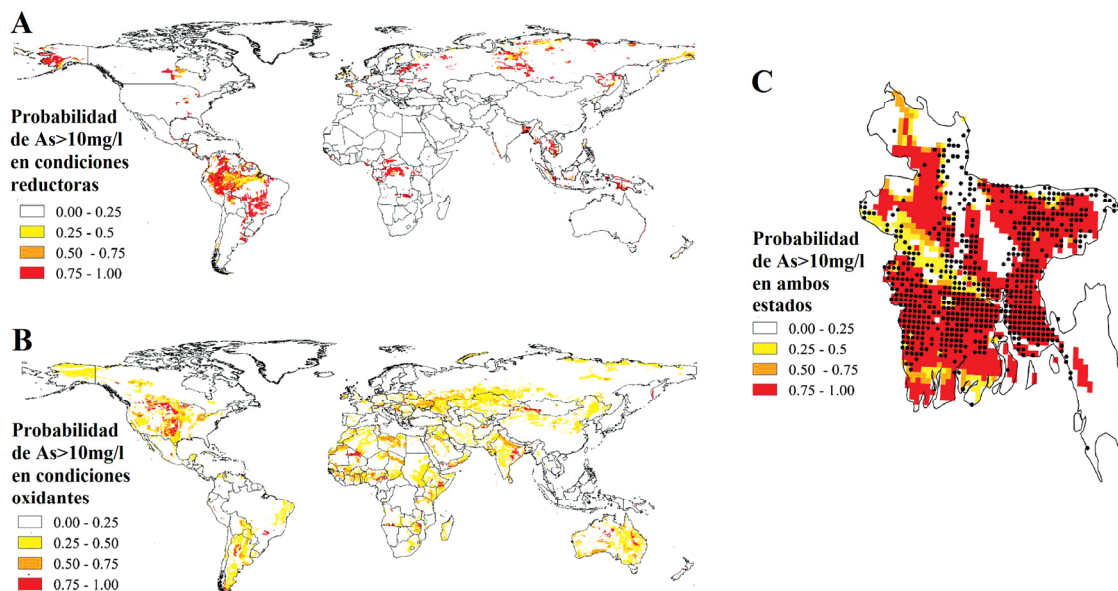
El arsénico (As) es un metaloide tóxico y carcinogénico, el cual existe en forma trivalente y pentavalente y se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Los compuestos más comunes de arsénico trivalente inorgánico (arsenito,  $As^{III}$ ) son el trióxido de arsénico y el arsenito de sodio, mientras los compuestos más comunes de arsénico pentavalente (arseniato,  $As^V$ ) son el arseniato de sodio, el pentóxido de arsénico y el ácido arsénico. Importantes formas orgánicas de arsénico incluyen el ácido arsanílico, arsenoazúcares y varias formas metiladas producidas como consecuencia de la biotransformación del arsénico inorgánico en diferentes organismos, entre ellos los humanos. Además de estas formas sólidas existe una forma gaseosa, la arsina ( $AsH_3$ ), de origen principalmente industrial y usada como arma química histórica (Casarett y Doull's, 2008).

#### 5. 2. FUENTES DE EXPOSICIÓN

La exposición ocupacional ocurre en la fabricación de plaguicidas, herbicidas y otros productos agrícolas. La industria de la fundición es una causa también importante de exposición por contaminación con gases y polvo arsenical (Casarett y Doull's, 2008).

La exposición natural ocurre principalmente por el consumo de aguas profundas contaminadas con arsénico. El origen de este arsénico a menudo proviene de lechos rocosos ricos en arsénico, como piritas, bañadas por aguas subterráneas. La organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado una concentración máxima de 10  $\mu\text{g/l}$  (ppb) de arsénico inorgánico en el agua de bebida, aunque se tiene conocimiento de la existencia de muchas zonas en las que las aguas superan esa concentración, como se puede observar en la figura I17. El caso más llamativo es el de Bangladesh (Figura I17 C), donde se ha estimado que alrededor de 21 millones de personas han sido expuestas a concentraciones superiores a 50 ppb en el agua de bebida, incluso llegando en determinadas zonas a 300 ppb (Smith y cols., 2000; Casarett y Doull's, 2008; Amini y cols., 2008).

**Figura I17.** Modelo global de probabilidad de aguas contaminadas por arsénico (As) con concentración mayor a 10  $\mu\text{g/l}$ . **A.** As en condiciones reductoras,  $\text{As}^{\text{III}}$ . **B.** As en condiciones oxidantes,  $\text{As}^{\text{V}}$ . **C.** Contaminación en Bangladesh, los puntos negros indican regiones (10 km x 10 km) con medias superiores a 10  $\mu\text{g/l}$  (Amini y cols., 2008).

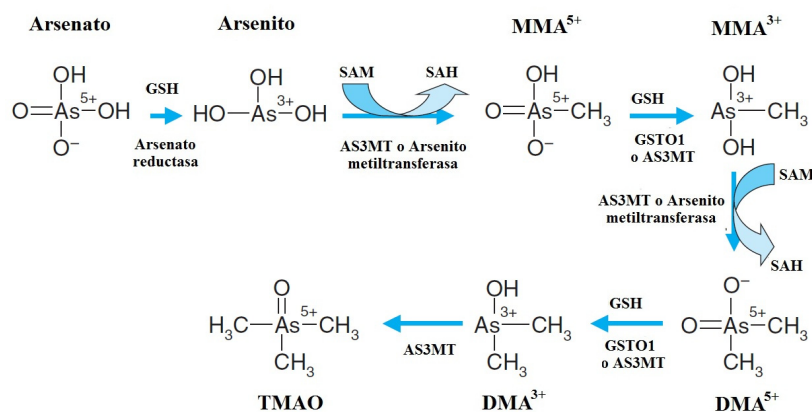


## 5. 3. TOXICOCINÉTICA

Las formas inorgánicas de arsénico son absorbidas (80-90 %) en el tracto gastrointestinal y distribuidas a través del organismo. Los compuestos de arsénico de baja solubilidad, como por ejemplo el trióxido de arsénico, son absorbidos menos eficientemente tras la exposición oral. Los compuestos de arsénico también se pueden absorber vía dérmica, dando lugar a toxicidad sistémica. La absorción vía respiratoria depende del tamaño de la partícula y de su forma química. La excreción urinaria es la forma principal de eliminación de estos compuestos, y su determinación sirve para el diagnóstico de intoxicación reciente, mientras que para detectar intoxicaciones lejanas en el tiempo la muestra de elección es pelo o uñas, ya que es el lugar de acumulación en humanos (Casarett y Doull's, 2008).

La metilación de las formas inorgánicas se ha considerado durante mucho tiempo un proceso de detoxificación, pero en este momento ya no es así, ya que se ha identificado una alta toxicidad de las formas arsenicales metiladas. El arseniato ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) rápidamente es reducido a arsenito ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) por la arseniato reductasa.  $\text{As}^{\text{III}}$  es secuencialmente metilado a metilarsenato ( $\text{MMA}^{\text{V}}$ ) y ácido dimetilarsénico ( $\text{DMA}^{\text{V}}$ ) por la enzima arsénico metiltransferasa o arsenito metiltransferasa, usando como cofactor el donador de grupos metilo S-adenosilmetionina (SAM). En el metabolismo de estos compuestos se forman  $\text{MMA}^{\text{III}}$  y  $\text{DMA}^{\text{III}}$  de alta toxicidad (Figura I18) (Aposhian y cols., 2006; Thomas y cols., 2007; Casarett y Doull's, 2008).

**Figura I18.** Metabolismo del arsénico. GSH, glutatión reducida; GSTO1, glutatión S-transferasa  $\omega$ 1; SAM, S-adenosilmetionina; SAH, S-adenosilhomocisteina; AS3MT, arsénico metiltransferasa (Cyt19); TMAO, oxido trimetilarsénico (Casarett y Doull's, 2008).



#### 5. 4. TOXICIDAD

El arsénico tiene una gran cantidad de efectos tóxicos, destacando su vasculotoxicidad (Balakumar y cols., 2009; States y cols., 2009).

Algunos de los mecanismos descritos de toxicidad vascular por arsénico incluyen la inhibición de la producción de óxido nítrico a través del bloqueo de la óxido nítrico sintetasa, lo que afecta a la vasodilatación de las células endoteliales (Kumagai y cols., 2004). El arsenito también incrementa la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) tras la activación de la NADPH oxidasa, y este aumento indirectamente incrementa la permeabilidad endotelial mediante la inducción de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Bao y cols., 2010). Además de estos efectos, el arsénico exacerba las lesiones ateroscleróticas por medio del incremento de la proliferación de VSMC, la generación de estrés oxidativo, y la inducción de la expresión de factores de crecimiento (TGF- $\alpha$ ), citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8), proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), etc. (Simeonova y cols., 2004; Balakumar y cols., 2009). La hipertensión y la vasoconstricción son otros indicadores de la exposición al arsénico, varias especies y metabolitos han demostrado inducir estas condiciones (Lee y cols., 2005; Park y col., 2005; Lim y cols., 2011). La apoptosis de VSMC también se ha implicado en la vasculotoxicidad del trióxido del arsénico, con un aumento concomitante de ROS y de calcio intracelular, *in vitro* (Li y cols., 2010). De manera similar, se ha observado la inducción del estrés de retículo endoplásmico en varios tipos de células expuestas a arsénico (Yen y cols., 2012), observándose esta alteración también en otros trastornos vasculares (Duan y cols., 2009).

En resumen, los diversos mecanismos que se han observado durante la vasculotoxicidad del arsénico incluyen apoptosis, estrés oxidativo, estrés del retículo endoplásmico, mediadores de la inflamación, etc. Estos fenómenos se han observado también en trastornos vasculares degenerativos, como la calcificación vascular medial (Ketteler y cols., 2011).

## **6. FLÚOR**

### **6. 1. DEFINICIÓN**

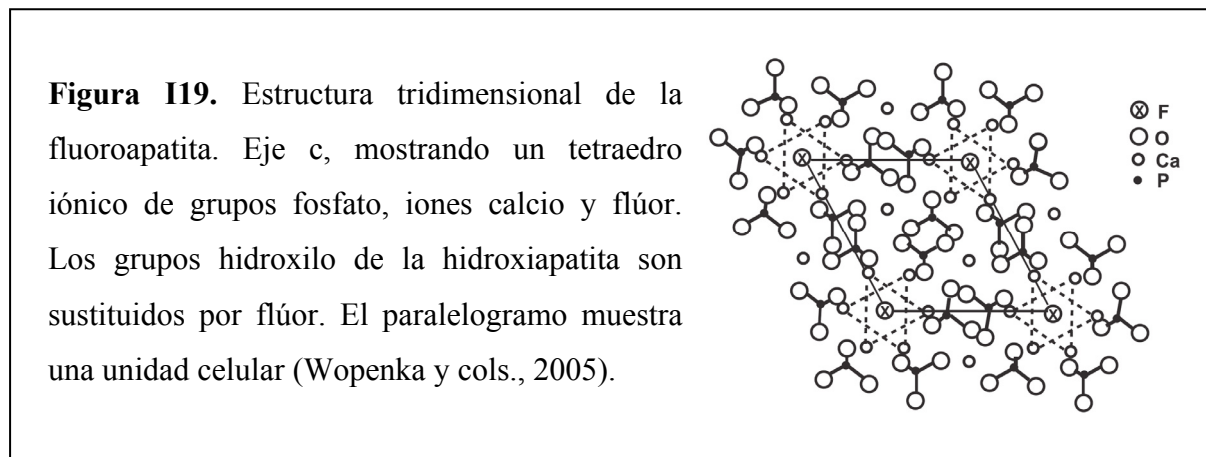
El flúor es un elemento no metal halogenado. Los fluoruros son compuestos tanto orgánicos como inorgánicos, los cuales contienen en su composición este elemento. El ion flúor es un componente esencial para la normal mineralización de huesos y esmalte dental, por lo que ha sido ampliamente usado para reducir la prevalencia y severidad de la caries dental, sobretodo en zonas de alta prevalencia de consumo de azúcar. Este compuesto, con el fin de prevenir la caries, puede ingerirse en distintas presentaciones farmacéuticas, o aplicarse localmente en forma de geles, enjuagues y pastas dentales. En algunos países, tanto ácido fluorosilícico como fluorosilicato de sodio, han sido usados en la fluoración de las aguas desde 1940 para mejorar la salud dental (Casarett y Doull's, 2008). La Organización mundial de la Salud (OMS) fija como límite máximo en aguas fluoradas 1,5 mg F<sup>-</sup>/l. Por lo general la concentración de flúor en aguas fluoradas se encuentra en un rango entre 0,5 (mínima concentración que da lugar a efectos beneficiosos) y 1 mg/l (WHO, 2008). La ingestión adecuada de flúor es de 0,05 mg/kg/día en adultos, siendo esta dosis menor en niños (Ziegler y cols., 1996; ATSDR, 2003).

La presencia de flúor en el agua no es únicamente consecuencia de su adición intencionada para fluorizarla, también puede estar presente en las aguas a partir de fuentes naturales. Junto con la ingestión de flúor en el agua, éste es ingerido a partir de los alimentos, todos ellos contienen al menos trazas de flúor, una fuente importante son los vegetales que captan este elemento de suelo y agua (WHO, 2008).

### **6. 2. TOXICOCINÉTICA**

Los fluoruros son absorbidos en el tracto gastrointestinal con un porcentaje entre 75 y 90 %. Una vez absorbidos son rápidamente distribuidos a través del organismo. La concentración de flúor en tejidos y fluidos corporales está directamente relacionado con la ingesta y no con la regulación homeostática (Casarett y Doull's, 2008; Palmer y cols., 2012), y constituye un bioindicador de exposición aguda, mientras que el pelo, las uñas y el esmalte dental son indicadores de la respuesta a largo plazo (ATSDR, 2003).

Aproximadamente el 99 % del flúor en el organismo se localiza en huesos y dientes. El ion fluoruro es incorporado en el hueso por reemplazamiento del ion hidroxilo de la hidroxiapatita para formar hidroxifluorapatita (Figura I19). El ion flúor puede ser eliminado lentamente del hueso como resultado del proceso de remodelación ósea, especialmente en niños. Su excreción es principalmente vía urinaria, se filtra libremente en el glomérulo, y el grado de reabsorción tubular está inversamente relacionada con el pH del fluido tubular. Aproximadamente el 50 % del flúor ingerido es eliminado, y el otro 50 % es retenido en tejidos calcificados. En el caso de los niños el porcentaje retenido es mayor, pudiendo ascender hasta el 80 %, debido a que fisiológicamente sus huesos y dientes se encuentran en desarrollo, por el contrario, en individuos de mayor edad la excreción puede ser superior al 50 % (Casarett y Doull's, 2008; Palmer y cols., 2012).



### 6. 3. TOXICIDAD

Las concentraciones de flúor que se utilizan para fluorar las aguas dan lugar a efectos beneficiosos, sin embargo concentraciones elevadas (superiores a 3-6 mg/l en la especie humana) durante largos periodos de tiempo, pueden dar lugar a efectos adversos, desarrollándose tanto fluorosis esquelética como dental (WHO, 2008).

En relación con la calcificación, esta patología produce debilidad de los dientes y, en el caso del hueso, en una primera fase puede aparecer aumento de la masa ósea, aunque en fases posteriores se asocia con osteoporosis, debilidad ósea, fracturas, osteoesclerosis de la pelvis renal, calcificación de ligamentos, articulaciones, etc. (Kaminsky y cols., 1990; Casarett y Doull's, 2008).

## 6. 4. RELACIÓN CON LA CALCIFICACIÓN

### 6. 4. 1. Calcificaciones fisiológicas

Se ha demostrado que una dosis adecuada de flúor tiene un efecto positivo en el tejido óseo, ya que estimula la proliferación de los osteoblastos e incrementa el depósito de nuevo mineral en el hueso. Estos efectos beneficiosos parecen ser consecuencia de la incorporación del ion flúor en los cristales óseos, lo que incrementaría el tamaño de los mismos y reduciría la solubilidad de los cristales de apatita. Los cristales de mayor tamaño son más resistentes a la acción de los osteoclastos. Cabe destacar que las concentraciones utilizadas para fluorar el agua, aunque sí son adecuadas para la protección dental, no son suficientes para producir estos efectos beneficiosos en el tejido óseo, requiriéndose concentraciones mayores (Palmer y cols., 2012).

En el diente el flúor incrementa la mineralización y remineralización, disminuye y revierte la desmineralización, e inhibe el metabolismo de las bacterias productoras de ácido, responsables de la caries dental (Wynn, 2002). El ion flúor se incorpora al esmalte en el diente en desarrollo antes de su erupción, dando lugar a una estructura más resistente a la caries. También se ha encontrado este efecto positivo sobre dientes post-erupcionados, aunque en este caso debido a la aplicación tópica (CDC, 2001, Singh y cols., 2004). Tras la erupción del diente el mecanismo de acción del flúor ingerido vía sistémica es diferente, éste es secretado por la saliva y contribuye a la protección tópica frente a la caries, al reducir la secreción de ácido por parte de las bacterias, y al aumento de la remineralización de lesiones tempranas (Gleen, 2002; Singh y cols., 2004).

### 6. 4. 2. Calcificaciones vasculares

Existen estudios en los que se ha observado que el tratamiento de ratas con flúor reduce el grado de calcificación vascular (Zipkin y cols., 1969; Luoma y cols., 1975), aunque estos estudios no representan el efecto real de las aguas fluoradas sobre la calcificación vascular, ya que se utilizaron concentraciones elevadas, las cuales podrían llegar a desarrollar los efectos secundarios del tratamiento con este elemento, siendo por tanto la reducción de la calcificación consecuencia de ellos. Es decir, sería necesario valorar el impacto del flúor en la calcificación vascular utilizando dosis no tóxicas, principalmente las presentes en aguas fluoradas.





## **II. OBJETIVOS**



Esta tesis doctoral consta de tres partes en torno a la calcificación vascular medial. Por ello, los objetivos han sido también divididos en sendas secciones:

## **PARTE I. ENVEJECIMIENTO DE LAS VSMCs**

Muchos de los resultados sobre el comportamiento de las células en cultivo, que aparecen en la bibliografía consultada, hacen referencia a tipos celulares diferentes de células vasculares de músculo liso (VSMCs). En el caso de VSMCs, los resultados obtenidos hasta el momento por otros grupos se han centrado principalmente en la senescencia en función del número de divisiones celulares o envejecimiento replicativo a lo largo del cultivo, en lugar de estudiarla en función de la edad del donante.

**El objetivo fundamental de esta primera parte es estudiar las diferencias entre células de donantes (ratas macho) de diferente edad (dos, doce y veinticuatro meses), y compararlas con las observadas a lo largo del cultivo, por medio del estudio de la relación entre envejecimiento y calcificación vascular, y entre envejecimiento y *transdiferenciación celular*.**

Para este estudio se ha marcado una serie de **objetivos parciales**:

1. Extracción de células del músculo liso de la aorta (VSMCs) de ratas Wistar macho de dos, doce y veinticuatro meses de edad.
2. Cultivo seriado de VSMCs hasta alcanzar la senescencia, y en distintos momentos de su vida replicativa realización de los siguientes estudios:
  - a. Análisis de la expresión de bioindicadores de músculo liso ( $\alpha$ -actina y SM22 $\alpha$ ) mediante PCR en tiempo real, análisis inmunoabsorbente (*Western-blot*), y microscopía inmunofluorescente.
  - b. Determinación del grado de senescencia en cultivo, mediante la tinción de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, por expresión de lámina A/C y p21, mediante *Western-blot* y microscopía inmunofluorescente.
  - c. Evaluación del estrés oxidativo mediante expresión de p38 fosforilada mediante *Western-blot*.
3. Conocer el efecto de la senescencia sobre la calcificación de VSMCs por expresión de bioindicadores osteogénicos mediante PCR en tiempo real y cuantificación de los depósitos de calcio en condiciones calcificantes.

## PARTE II. INFLUENCIA DEL ARSÉNICO EN LA CALCIFICACIÓN VASCULAR Y SENESCENCIA DE VSMCs

La senescencia celular puede ocurrir por distintos mecanismos, de manera cronológica (como consecuencia de la edad) y como senescencia prematura inducida por el estrés (SIPS). Este estudio se realizó en una primera fase *in vitro*.

**El objetivo fundamental de esta segunda parte es determinar si los diferentes compuestos de arsénico ( $As^{III}$ ,  $As^V$ , MMA, DMA) son capaces de inducir senescencia y calcificación vascular, y a qué concentración producen SIPS sin desencadenar otros efectos citotóxicos.**

Para ello se fijó una serie de **objetivos parciales**:

ESTUDIO “*IN VITRO*”:

1. Determinación de las concentraciones de los diferentes compuestos a las que no producen efectos tóxicos, mediante evaluación de la actividad de la lactato deshidrogenasa intracelular (LDH) liberada al medio de cultivo. El resto de estudios se llevará a cabo con concentraciones no citotóxicas determinadas en estos estudios.
2. Análisis del efecto del arsénico sobre la producción de SIPS en VSMCs, mediante:
  - a. Tinción de  $\beta$ -galactosidasa asociada al envejecimiento.
  - b. Determinación de la expresión de proteínas asociadas al proceso de senescencia como Lámina A/C y p21, tanto por *Western-blot* como mediante inmunofluorescencia.
  - c. La senescencia está asociada a desdiferenciación celular, por lo que se estudiará el efecto del arsénico sobre bioindicadores de músculo liso de aorta, como  $\alpha$ -actina, SM22 $\alpha$  y calponina, por *Western-blot*, PCR en tiempo real e inmunofluorescencia.
  - d. Se conocen los efectos del resveratrol como agente anti-envejecimiento, por lo que en el caso de que el arsénico produjera SIPS se estudiaría la reversión del proceso con resveratrol.
3. Entre los factores relacionados con la calcificación vascular se encuentra el envejecimiento, por lo que se determinará el efecto del arsénico sobre la calcificación de VSMCs, como consecuencia de la inducción de senescencia, mediante:
  - a. Cuantificación de la expresión de genes relacionados con el proceso de calcificación.

- b. Incubación de VSMCs en condiciones calcificantes: cuantificación de los depósitos de calcio y visualización mediante tinción de calcio (rojo de alizarina).
4. Estudio de los mecanismos que dan lugar a los efectos del arsénico, estudiando para ello:
    - a. Inflamasoma, mediante la cuantificación de interleukina-1 $\beta$  mediante ELISA y expresión de caspasa 1 por *Western-blot*.
    - b. Estrés oxidativo, cuantificación de los grupos carbonilos mediante ELISA, expresión de p38 fosforilada por *Western-blot* y determinación de especies reactivas de oxígeno por inmunofluorescencia.
    - c. Apoptosis, mediante la técnica de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*).

#### ESTUDIO “*IN VIVO*”:

Tras la fase *in vitro*, los mismos estudios se realizaron *in vivo*.

1. Tratamiento con arsénico de ratas macho Wistar de 2 meses de edad, sanas, con el fin de determinar el grado de envejecimiento, calcificación y desdiferenciación celular:
  - a. Tinción  $\beta$ -galactosidasa asociada al envejecimiento de la aorta.
  - b. Tinciones inmunofluorescentes de bioindicadores de músculo liso de la aorta:  $\alpha$ -actina, calponina, SM22 $\alpha$ , p21 y lámina A/C.
  - c. Cuantificación de los depósitos cálcicos en aorta completa.
2. Tratamiento con arsénico en condiciones calcificantes, de ratas macho Wistar de 2 meses de edad, sometidas a nefrectomía 5/6 para determinar el grado de calcificación en caso de insuficiencia renal mediante:
  - a. Cuantificación de los depósitos cálcicos.
  - b. Cortes de la aortas para realizar tinción de calcio (rojo de alizarina) y fosfato (von Kossa).

### PARTE III. EFECTO DEL FLÚOR SOBRE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR

En determinadas ciudades de algunos países, como EE.UU., las aguas potables se fluorizan con el objetivo de mejorar la salud dental y ósea de la población. La mayor resistencia a caries y de los huesos se debe a la formación de fluoroapatita, es decir, los hidroxilos de la hidroxiapatita son sustituidos por fluoruros. En esta tesis hemos estudiado si el efecto del flúor también ocurre en la hidroxiapatita en formación en las arterias, y las consecuencias que ello podría tener para el organismo.

**El objetivo fundamental de esta tercera parte es el estudio del efecto del flúor sobre la calcificación vascular.**

Para este estudio se ha marcado una serie de **objetivos parciales**:

1. ESTUDIO “*IN VITRO*”. Calcificación de VSMCs con diferentes concentraciones de flúor, en el rango de las determinadas en sangre en poblaciones que consumen agua fluorada:
  - a. Cuantificación de los depósitos cálcicos en presencia y ausencia de flúor, tanto en células vivas como muertas.
  - b. Cuantificación de los depósitos cálcicos con tratamientos simultáneos con ácido fosfonofórmico (PFA) y pirofosfato (PPi), para determinar la concentración necesaria de estos inhibidores de la calcificación para reducirla al 50 % (IC<sub>50</sub>), en presencia o ausencia de flúor.
  - c. Estudio de la formación de fluoroapatita, comprobando las ratios Ca/P y la aparición de otros compuestos, mediante microscopía electrónica, en células vivas y muertas.
  - d. Cuantificación de la expresión de osteogenes (BMP2, CBFA1 y Msx2) para determinar si el efecto del flúor es consecuencia de una modulación del comportamiento celular o debido a modificaciones en el proceso de nucleación de cristales en las células.
  
3. ESTUDIO “*IN VIVO*”. Tratamiento de ratas macho Wistar de dos meses de edad sometidas a nefrectomía 5/6, con flúor a distintas concentraciones, en condiciones calcificantes, para comprobar el efecto del flúor sobre la calcificación arterial mediante: cuantificación de los depósitos cálcico y cortes de la aortas para realizar tinción de calcio (rojo de alizarina) y fosfato (von Kossa).

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**





## **1. REACTIVOS**

Los reactivos utilizados fueron de calidad para análisis (PA) o para biología molecular (BM, exentos de ribonucleasas, DNAsas y proteasas) según las necesidades específicas de cada técnica. Los reactivos procedieron principalmente de las marcas Acros-Organics (Geel, Bélgica), Amersham Biosciences (Barcelona, España), Biotools (Madrid, España), Fluka (St Louis, EE.UU.), Invitrogen-MolecularProbes-Gibco (Paisley, Reino Unido), Merck (Whitehouse Station, EE.UU.), Panreac (Castellar del Vallès, España), Scharlau (Sentmenat, España), Sigma-Aldrich (St Louis, EE.UU.), etc.

El material de cultivo celular fue adquirido a Gibco: medio esencial mínimo (MEM, Ref. 31095), medio Eagle modificado Dulbecco (DMEM:F-12, Ref. 31330), tampón fosfato salino (PBS, Ref. 14040), suero fetal bovino (Ref. 10270), antibióticos (penicilina+estreptomicina) más glutamina (Ref. 10378) y tripsina/EDTA (Ref. 25200). El material fungible (frascos de Roux, placas, criotubos, etc.) fue adquirido a Nunc (Roskilde, Dinamarca). Las placas de microscopía fueron tratadas con poli-L-lisina de Sigma-Aldrich (Ref. P4832) para favorecer su adhesión.

## **2. APARATOS**

- La esterilización de parte del material de vidrio, del material de plástico (puntas de pipetas, tubos de centrifugación, etc.), del agua, del instrumental quirúrgico y de distintas disoluciones se llevó a cabo en un autoclave Selecta (Abrera, España) modelo Autester 437-G. El resto de material de vidrio se esterilizó en una estufa también de la marca Selecta, modelo S-381, a 120 °C durante al menos ocho horas. Las disoluciones termolábiles se esterilizaron mediante filtración con filtros de 0,22 µm de diámetro de poro, modelo Minisart de Sartorius Stedim Biotech (Goettingen, Alemania).
- Se utilizó también una estufa de marca Indelab (Esparza de Galar, España) para las incubaciones realizadas a 37 °C.
- El agua empleada para trabajar fue agua Milli-Q. El agua fue desclorada, descalcificada, desionizada y filtrada (agua Milli-RX), siendo posteriormente filtrada, por segunda vez, para la obtención de agua Milli-Q, la cual se autoclavó antes de su uso. Para la extracción y procesado de RNA, el agua Milli-Q se trató además con DEPC (dietil-pirocarbonato),

adquirido a Fluka (Ref. 32490), para eliminar las RNAsas y se autoclavó posteriormente para destruir el DEPC y esterilizar de nuevo. Para cultivo celular se empleó agua comercial apta para cultivos celulares de Gibco (Ref. 15230).

- Para pesar las diferentes sustancias se emplearon tres tipos de balanzas, una de la marca ANT, modelo EK600A y dos balanzas de precisión, una de marca OHAUS (Heuwinkelstrasse, Suiza) modelo Discovery, y otra también de precisión de marca Sartorius modelo A200S ubicada en el interior de la campana extractora para pesar sustancias peligrosas.
- El pesado de animales se realizó en una báscula modelo Viper Sw35 de Mettler-Toledo (L'Hospitalet de Llobregat, España).
- Para proceder al rasurado del campo quirúrgico de los animales utilizados se usó una afeitadora de la marca Oster (Madrid, España), modelo Artisan.
- Las agujas y jeringas usadas fueron de la marca BD (Franklin Lakes, EE.UU), modelo Microlance y Plastipak respectivamente.
- Los animales anestesiados durante la cirugía se colocaron sobre una manta eléctrica de marca Ufesa (Pamplona, España), modelo AL5523.
- Las medidas de pH se efectuaron en un pHmetro digital marca Crison (Alella, España), modelo micro pH 2002, con electrodo combinado de pH y sonda de temperatura.
- Los agitadores magnéticos han sido de la marca Selecta modelo Agimatic-N y multimatic 9N, y los de tipo vórtex de la marca Heidolph (Kelheim, Alemania) modelo REAXtop.
- Para la incubación de muestras con agitación se usaron dos tipos de agitadores, un orbital y un balancín de marca Ovan (Badalona, España).
- Para la incubación de muestras con agitación a 38 °C se usó un agitador de marca N-Biotek (Winooski, EE.UU) modelo NB-205, en el cual se podía seleccionar tanto las revoluciones como la temperatura.
- Se utilizaron dos tipos de baños, ambos de la marca Selecta, uno de tipo Precising ajustado a 37 °C para cultivo celular y otro de tipo Frigiterm para el resto de disoluciones.
- Los cortes de aorta de rata se realizaron a -30 °C y 7 µm de grosor en un criostato de la marca Leica Microsystems, modelo CM 1510S (Weztlar, Alemania) con las muestras embebidas en OCT-medio criosolidificable, también de Leica. El medio de montaje para observación al microscopio, cuando no fue necesaria fluorescencia, se realizó con Inmuno HistoMount de SantaCruz Biotechnology (Ref. sc-45086).

- Para las determinaciones espectrofotométricas se utilizaron dos modelos de espectrofotómetro. Un espectrofotómetro de la marca Bio-Rad (Hercules, EE.UU) tipo SmartSpec 3000 para cuantificar RNA, usando cubetas de cuarzo de 10,00 mm, y un espectrofotómetro para microplacas de la marca Beckman Coulter (Brea, EE.UU), modelo DTX 880, con el que se cuantificaron el resto de muestras, mediante el programa Multimode Detection software de Beckman Coulter versión 2.0.0.10 del año 2004.
- Se emplearon dos tipos de centrifugas. Una minicentrífuga de marca Eppendorf (Nueva York, EE.UU.) modelo 5415R con selección de temperatura, y otra de marca Selecta, modelo Mixtasel, para la centrifugación de células vasculares de la aorta en el proceso de extracción.
- Las transcripciones reversas y tratamientos con DNasa se realizaron en un termociclador tipo MJ Mini de Bio-Rad.
- Las electroforesis de RNA se realizaron con geles de agarosa en cubetas horizontales, modelo Mini Sub DNA Cell de Bio-Rad y Hoeffer HE33 Mini Horizontal Submarina Unir de Amersham Biosciences.
- La agarosa utilizada para los geles se disolvió en un horno microondas Fagor.
- Las fuentes de alimentación para electroforesis fueron de la firma Bio-Rad modelo Power/Pac 300 y Power/Pac 1000, y de la firma Pharmacia Biotech, modelo EPS 300.
- Para la electroforesis de proteínas se utilizó una cubeta Mini Protean Tetra Cell de Bio-Rad. Para la transferencia a membrana durante un primer periodo se usó una cubeta Mini Trans Blot-Mini Protean II, también de Bio-Rad, procedimiento de transferencia húmeda. Posteriormente se cambió a un nuevo sistema de transferencia semi-seca Trans-Blot Turbo, de Bio-Rad.
- La visualización del RNA en geles de agarosa se consiguió mediante la tinción con bromuro de etidio y excitación con luz ultravioleta mediante el sistema GelDoc 1000 de Bio-Rad y el programa informático Quantity One, versión 4.6.9, de Bio-Rad.
- La detección de la quimioluminiscencia emitida en los *western blots* se realizó mediante el sistema VersaDoc 400 MP de Bio-Rad, la captura se realizó con el programa Quantity One, versión 4.6.9 y el análisis con el programa Image Lab, versión 2.0.1, ambos de Bio-Rad.
- La PCR en tipo tiempo real se llevó a cabo en un LightCycler 1.5 de Roche (Basilea, Suiza). El análisis de datos se realizó con el programa LightCycler Software versión 4.05, también de Roche.

- El trabajo en cultivos celulares se realizó en un laboratorio exclusivo para ese uso. Las manipulaciones de las células se realizaron en una campana de flujo laminar vertical marca Telstar modelo bio-II-A (Tarrasa, España). Las incubaciones de las células se llevaron a cabo en un ambiente de CO<sub>2</sub> al 5 % y a 37 °C mantenidas en una estufa de CO<sub>2</sub> de la marca Barnstead/Labline. Las balas de CO<sub>2</sub> fueron proporcionadas por Air Liquide S. A. (Zaragoza, España). Para el mantenimiento de células congeladas se utilizó nitrógeno líquido (adquirido al Servicio de líquidos criogénicos de la Universidad de Zaragoza) en un tanque Statebourne Borack 2400 (Washington, EE.UU), previa congelación a -80 °C en un contenedor de congelación 5100 Cryo 1°C Mr. Frosty de Nalgene (Rochester, USA). La observación de las células se realizó con un microscopio invertido de Lan Optics (Esparza de Galar, España). El conteo de las células se llevó a cabo con una cámara de Neubauer marca Marienfeld (Lauda-Königshofen, Alemania).
- Para la limpieza de las aortas se usaron lupas marca Zeiss (Oberkochen, Alemania), modelo StemiDV4.
- La toma de imágenes se realizó con un microscopio electrónico Zeiss Axiovert 200M acoplado a una lámpara de fluorescencia FluoArc, cámaras AxioCam HRC y MRm y a un sistema de Apotome, todos ellos de Zeiss. El programa de tratamiento de imágenes fue AxioVision 4.1 de Zeiss.

Los reactivos, kits y disoluciones se guardaron a temperatura ambiente o refrigerados a 4 °C según su conveniencia. Los kits de RNA se almacenaron a -20 °C. Las muestras se conservaron a -20 °C, excepto las de RNA que se guardaron a -80 °C, todo ello en frigoríficos/congeladores de las marcas Fagor y Liebherr (Bulle, Suiza), congeladores de -20 °C de marca Beko (Estambul, Turquía) y Whirlpool (Benton Harbor, EE.UU.) y un congelador de -80 °C de Thermo Scientific (Waltham, EE.UU), modelo Revco Value Plus.

Para manejar pequeños volúmenes se emplearon pipetas mecánicas marca Eppendorf de 2,5, 10, 20, 100, 200, 1000 y 5000 µl. También se usó una pipeta multicanal de Eppendorf de 100 µl.

### 3. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

#### 3. 1. GENERALIDADES

En esta tesis se ha utilizado como especie animal la rata de laboratorio (*Rattus norvegicus*). Las ratas utilizadas fueron siempre machos de la estirpe Wistar, obtenidas de Janvier S.A.S. (Le Genest-St-Isle, Francia), mantenidas con libre acceso al agua de bebida y pienso en todos los experimentos realizados.

Las edades de los animales se fijó en función del estudio. Para los estudios de envejecimiento se usaron animales de tres edades diferentes: dos, doce y veinticuatro meses, únicamente se utilizaron para extraer VSMCs, no fueron sometidas a ningún tratamiento. Para los estudios sobre arsénico y flúor la edad de las ratas fue de dos meses. En este último caso se usaron tanto ratas normales, para estudios sobre senescencia (en el caso del arsénico), como ratas sometidas a nefrectomía 5/6 para estudios de calcificación vascular (en ambos).

Todo lo referente al manejo, instalaciones y eutanasia de los animales se realizó de acuerdo a la legislación vigente en materia de protección de los animales utilizados para experimentación (Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, publicado en el Boletín Oficial del Estado nº 252 del 21 de Octubre de 2005, páginas 34367 a 34391). A lo largo de mi tesis doctoral también obtuve el título de categoría B. La eutanasia de los animales de experimentación animal se ha realizado según las recomendaciones de FELASA (Federación de Asociaciones Europeas de las Ciencias del Animal de Laboratorio).

#### 3. 2. TRATAMIENTOS

##### 3. 2. 1. Estudios de senescencia inducida por arsénico

Para estudiar la relación entre arsénico y senescencia *in vivo* se utilizaron ratas machos Wistar de 2 meses de edad. El grupo control durante el mes de tratamiento bebió agua embotellada de composición conocida y libre de arsénico. El grupo tratado con arsénico bebió esta misma agua, a la que se añadió  $\text{As}^{\text{V}}$  hasta alcanzar una concentración final de 50 ppm.

### 3. 2. 2. Estudios sobre calcificación

Se realizaron dos estudios diferentes sobre calcificación, en ambos casos el modelo animal consistió en ratas sometidas a nefrectomía 5/6.

En primer lugar se estudio el efecto del arsénico sobre la calcificación vascular. En este caso los animales fueron adquiridos con dos meses de edad ya sometidos a esta intervención quirúrgica. Para realizar este estudio se hicieron tres grupos de animales. Un primer grupo control negativo, en el cual los animales no habían sido sometidos a nefrectomía 5/6, un segundo grupo control positivo con animales nefrectomizados y un tercer grupo de ratas nefrectomizadas y tratadas 50 ppm As<sup>V</sup> en el agua de bebida. Todos los grupos ingirieron una dieta con alta concentración de fosfato (Pi al 1,2 %) para inducir el proceso de calcificación vascular, a la vez que fueron tratados tres veces por semana con una concentración de 80 ng/kg de vitamina D<sub>3</sub> (calcitriol) (Sigma, Ref. D1530) para acelerar este proceso. En el momento del sacrificio se recogieron muestras de sangre (con jeringas heparinizadas) y orina. La sangre se centrifugó a 1.500 g durante 10 minutos a 4 °C para extraer el plasma. Todas las determinaciones de plasma y orina las realizó Balagué Center (Barcelona).

El segundo estudio en el que se utilizó este modelo se realizó para analizar el efecto del flúor sobre la calcificación vascular, en este caso se adquirieron ratas sanas de 1,5 meses de edad y se sometieron en nuestras instalaciones a la intervención mencionada, extremando las medidas higiénicas y de asepsia para evitar infecciones derivadas de esta manipulación.

El material requerido fue el siguiente:

- Anestésicos: Ketamina adquirida a Merial (nombre comercial Imalgene 500, Ref. 9760) (Barcelona, España) y Medetomidina adquirida a Laboratorios Calier S. A. (nombre comercial Sedin, Ref. CN572768) (León, España).
- Analgésico: Buprenorfina adquirida a Braun (Vetergesic, Ref. 30049000) (Barcelona, España).
- Antibiótico: Amoxicilina adquirida a Pfizer (Clamoxyl LA, Ref. 8814) (Madrid, España).
- Lágrimas artificiales: Suero fisiológico monodosis adquirido a Aposan (Ref. 0459).
- Almohadilla térmica de marca Ufesa (Pamplona, España), modelo AL5523.

- Afeitadora eléctrica.
- Bolsas de plástico (campo quirúrgico).
- Gasas estériles.
- Etanol al 75 % adquirido a Paricio (Zuera, España), clorhexidina (HIBIPlus, adquirido a Mölnlycke HealthCare, Ref. 690-DES) y povidona yodada (Betadine, adquirido a Meda, Ref. 997437.4).
- Sutura reabsorbible: Monofast Poliglecaprone 3/0 adquirida a Kruuse (Ref. 153224).
- Pinzas mosquito y pinzas de campo (Backhaus).
- Tijeras de punta roma y de punta aguda.
- Bisturí (nº 4) y hojas de bisturí.
- Separadores.
- Portaagujas.
- Pinzas de disección (diente de ratón y punta redonda). Pinzas hemostáticas.

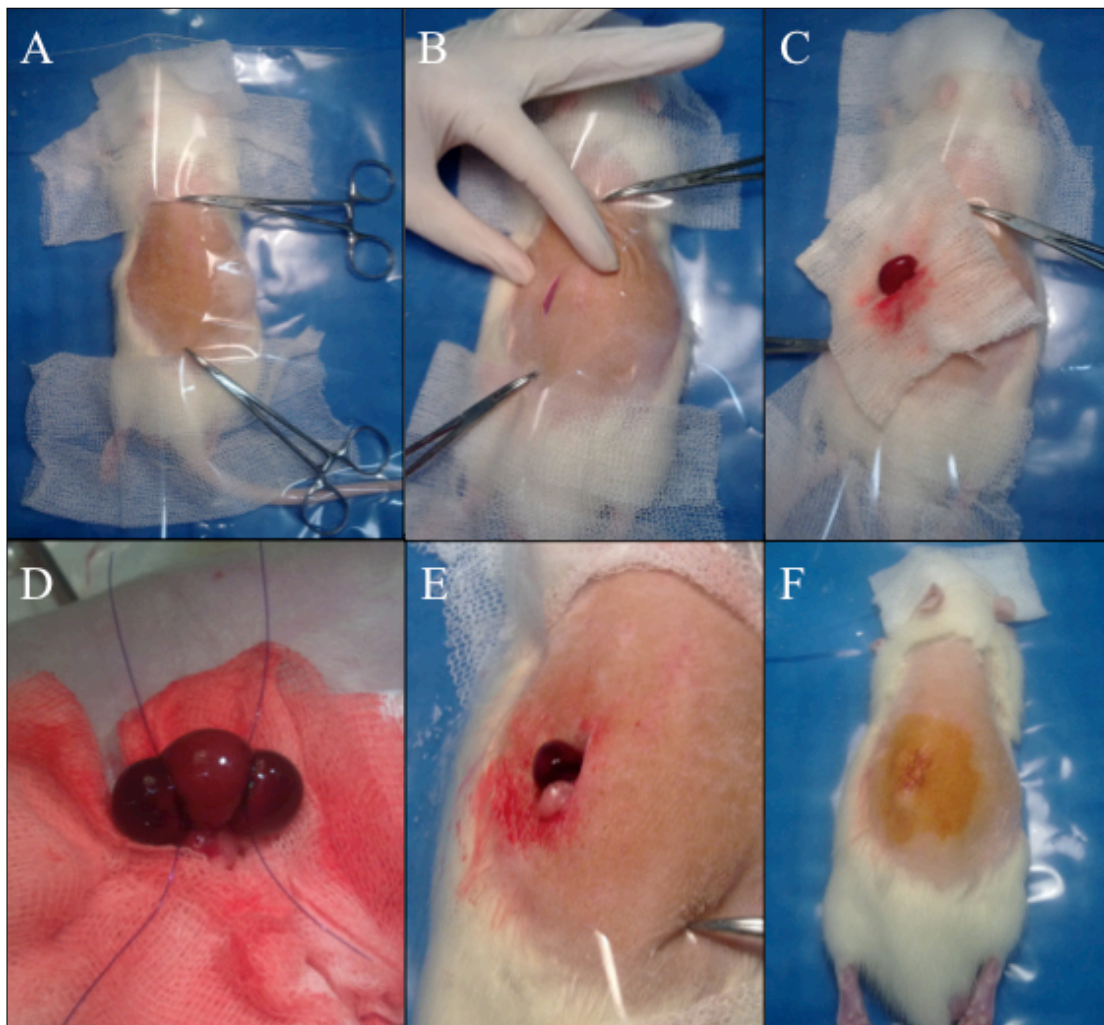
A continuación se detalla el procedimiento anestésico, quirúrgico y cuidados de los animales:

Los animales fueron anestesiados utilizando anestesia combinada, ketamina a una dosis de 75 mg/kg vía intraperitoneal y medetomidina a dosis 0,5 mg/kg vía intraperitoneal. Cuando el animal entró en fase anestésica se le inyectó antibiótico, ampicilina a una dosis de 15 mg/kg vía subcutánea y se afeitó el área dorsal. Se colocó sobre una almohadilla eléctrica, para evitar pérdidas de temperatura durante el procedimiento, seguidamente se desinfectó la piel con clorhexidina y se colocó un campo quirúrgico estéril. Se instilaron lágrimas artificiales en los ojos del animal, así como se colocó una gasa humedecida con suero fisiológico sobre los mismos, para proteger de la desecación, ya que con esta anestesia se mantienen los ojos abiertos (Figura M1 A). Tras la palpación externa del riñón se realizó una incisión cráneo-caudal a la izquierda de la línea dorsal (aproximadamente de 2 cm de longitud) inmediatamente por detrás de la última costilla (Figura M1 B) y por palpación interna se localizó el riñón izquierdo del animal y se expuso. A continuación se liberó delicadamente del tejido que lo rodeaba (Figura M1 C). Una vez liberado se colocó una sutura reabsorbible (3/0) alrededor de cada polo del riñón, junto al pedículo renal, dejando el riñón dividido en tres partes iguales, con cuidado de no ligar el uréter (Figura M1 D). Las ligaduras colocadas alrededor de los polos se fueron apretando lentamente para conseguir el corte de los polos sin utilización de bisturí ni posterior uso de técnicas para lograr la



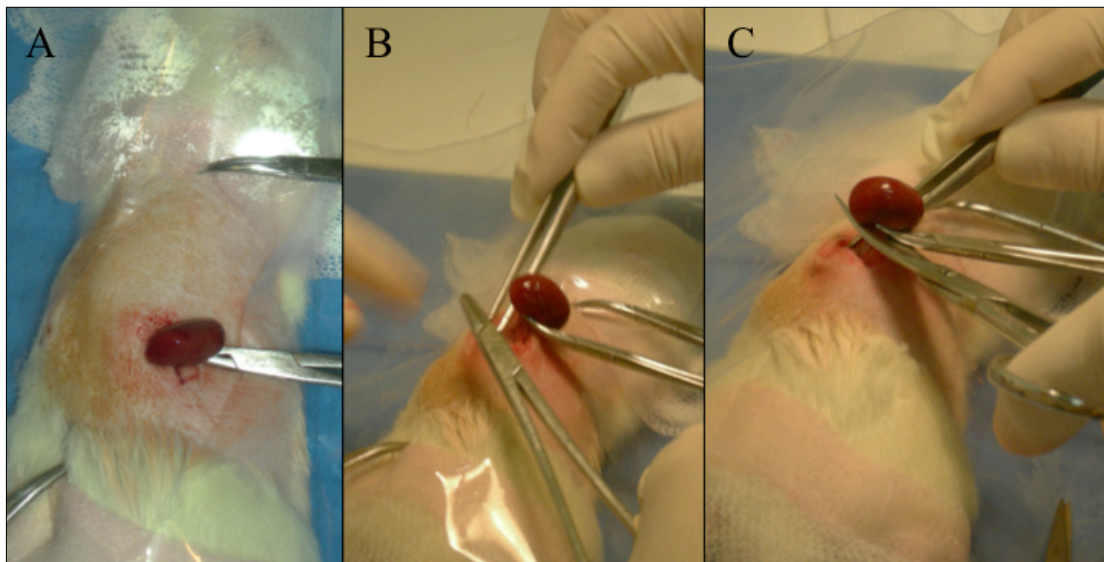
hemostasia. Una vez finalizada la escisión (Figura M1 E) se comprobó la ausencia de sangrado y se reintrodujo el riñón en la cavidad abdominal. La capa muscular se suturó mediante la sutura de Reverdin (o festoneada), y subcutáneo y piel conjuntamente con sutura subcutánea o subcuticular continua. Una vez finalizada la sutura se limpió el campo con una gasa para retirar posibles restos de sangre y se aplicó povidona yodada (Figura M1 F).

**Figura M1.** Nefrectomía 2/3 del riñón izquierdo. **A.** Preparación del campo quirúrgico. **B.** Incisión. **C.** Riñón extraído de la cavidad abdominal y libre de tejidos circundantes. **D.** Ligaduras alrededor de los polos renales. **E.** Riñón tras la escisión de los polos. **F.** Sutura de la incisión y limpieza del campo quirúrgico.



Una semana tras la primera intervención se procedió a la resección del riñón derecho. La preparación del animal fue la misma que en el caso de la escisión de los polos del riñón izquierdo. Se realizó una incisión cráneo-caudal a la derecha de la línea dorsal, inmediatamente tras la última costilla. Se extrajo el riñón derecho y se liberó del tejido circundante. Se colocó una pinza hemostática en el pedículo (lo más próximo posible al riñón) (Figura M2 A) y se realizaron tres ligaduras por debajo de la pinza (Figura M2 B), para liberar el riñón completo mediante el corte del pedículo por encima de las ligaduras (Figura M2 C). Se suturó la incisión como en la intervención anterior.

**Figura M2.** Nefrectomía completa del riñón derecho. **A.** Clampaje del pedículo renal. **B.** Realización de ligaduras del pedículo renal. **C.** Corte del pedículo renal.



Tras cada intervención se colocó al animal en una caja con cama limpia, protegiéndole los ojos con una gasa húmeda y manteniéndolo tapado para evitar la pérdida de calor. Cuando recuperó el reflejo podal se le administró la primera dosis de analgésico, buprenorfina a dosis de 0,1 mg/kg vía subcutánea, a las 6 horas se inyectó de nuevo este anestésico a la mitad de la primera dosis administrada.

Al cabo de una semana de recuperación los animales se dividieron en seis grupos. Se fijaron tres grupos diferentes como control negativo. Dos grupos control negativo en los que

los animales no fueron sometidos a nefrectomía y a los que se les administró pienso con concentraciones normales (Pi al 0,6 %) o altas (Pi al 1,2 %) de fosfato; y un tercer grupo control negativo, en el que los animales consumieron pienso con Pi al 0,6 % y habían sido sometidos a nefrectomía. El grupo control positivo se compuso de animales nefrectomizados, los cuales ingirieron una dieta con alta concentración de fosfato (Pi al 1,2 %). El quinto y sexto grupo estuvieron formados por animales nefrectomizados, que consumieron una dieta con Pi al 1,2 % y agua fluorada, un grupo a concentración 1,5 mg F<sup>-</sup>/l y el otro grupo a concentración de 15 mg F<sup>-</sup>/l. Este tratamiento a diferencia del anterior se prolongó 4,5 meses, debido a que no se usó vitamina D<sub>3</sub>, para evitar el exceso de calcificación derivado de su administración, y observado en el estudio del arsénico (Ver Discusión: Figura DII-1).

En el momento del sacrificio se recogieron muestras de sangre (con jeringas heparinizadas) y orina. La sangre se centrifugó a 1.500 g durante 10 minutos a 4 °C, para extraer el plasma. Las determinaciones de plasma y orina de este estudio se realizaron con kits colorimétricos adquiridos a BioAssay Systems (Hayward, EE.UU.): creatinina (DICT-500), fosfato (DIPI-500), urea (DIUR-500) y calcio (DICA-500).

#### **4. OBTENCIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS DE MUSCULATURA LISA VASCULAR DE AORTA**

Para todos los estudios realizados en este trabajo se utilizaron cultivos primarios de células del músculo liso de la aorta (VSMCs), obtenidas de aortas de ratas, con el procedimiento que se detalla a continuación.

Las extracciones de VSMCs se realizaron a partir de grupos de ocho ratas macho Wistar, para cada una de las tres edades utilizadas en los estudios. De este modo se obtuvieron tres cultivos o líneas, a partir de ratas de 2 meses, de 12 meses, y de 24 meses.

En los tres casos se siguió el mismo procedimiento, únicamente modificando el número de digestiones necesarias para extraer todas las células en función de las necesidades específicas de cada edad.

#### 4. 1. MATERIALES, REACTIVOS Y APARATOS

- Ocho ratas macho Wistar por cada extracción de VSMCs.
- Afeitadora.
- Etanol al 75 % adquirido a Paricio (Zuera, España) para la esterilización del material y campo quirúrgico.
- Material quirúrgico: agujas, jeringas, pinzas, tijeras y bisturí.
- Pentobarbital adquirido a Vétoquinol (Nombre comercial Dolethal) (Lure Cedex, Francia), inyectado a concentración de 40-50 mg/kg pv vía intraperitoneal.
- Colagenasa de *Clostridium histolyticum*, adquirida a Sigma-Aldrich (Ref. C2674), con una actividad específica de 223,8 U/mg. La actividad colagenasa final para llevar a cabo las digestiones fue de 600 U/ml.
- Medio de cultivo MEM, con y sin suero fetal bovino (SFB).
- Una placa de 56,7 cm<sup>2</sup> y un tubo Falcon de 50 ml estériles.
- PBS 1 X, conteniendo penicilina+estreptomicina+glutamina a concentración final 1X.
- Filtro de 0,22 µm de poro.
- Lupa.
- Estufa de CO<sub>2</sub> de cultivo celular.
- Agitador a 38 °C.
- Centrifuga.

#### 4. 2. PROCEDIMIENTO

##### 4. 2. 1. Preparación de la colagenasa

La colagenasa se disolvió en medio MEM (sin SFB) a concentración de 600 U/ml. La disolución se filtró posteriormente en campana de flujo laminar con un filtro de 0,22 µm para proceder a su esterilización. A continuación se añadieron 10 ml de la disolución de colagenasa a una placa de cultivo celular de 56,7 cm<sup>2</sup> y 9 ml a un tubo Falcon de 50 ml.

##### 4. 2. 2. Procedimiento quirúrgico

La limpieza del instrumental quirúrgico se realizó con alcohol al 75 %.

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital y una vez alcanzaron un plano

anestésico profundo se procedió a la preparación del campo quirúrgico para la extracción de las aortas. Se rasuró el pelo de la región ventral de la rata y la superficie del animal se limpió con alcohol al 75 %.

Se realizó un corte de la piel en el abdomen, y a continuación en la musculatura abdominal y peritoneo. Se prolongó la apertura cranealmente hasta abrir la cavidad torácica. Posteriormente se retiraron todos los órganos abdominales hacia el lado derecho del animal para visualizar la aorta, anexa a la columna vertebral.

Una vez se localizó la aorta, se pinzó y se procedió a su separación de la columna vertebral mediante un corte cuidadoso entre aorta y columna, sosteniéndola en todo momento con pinzas, hasta liberarla totalmente de la unión con la columna. Finalmente, la aorta se cortó en su inserción al corazón.

A continuación se realizó el lavado de la aorta en PBS frío, y se mantuvo en PBS en hielo hasta su limpieza.

#### 4. 2. 3. Limpieza de la aorta y extracción de células

Manteniendo la aorta en hielo se eliminó la capa muscular que rodeaba a la aorta, utilizando para ello pinzas sin dientes y pinzas de punta fina para evitar dañarla.

Una vez limpias, las ocho aortas se incubaron durante 1 hora a 38 °C en estufa de cultivos, sin agitación, en una placa de 56,7 cm<sup>2</sup> con 10 ml de colagenasa.

Transcurrida la hora de incubación se eliminaron los restos de la adventicia de las aortas, siendo necesario el uso de una lupa. Una vez eliminada toda la adventicia se procedió al corte transversal de la misma con bisturí, en fragmentos de aproximadamente 2-3 mm.

Estos fragmentos se añadieron a un tubo Falcon de 50 ml que contenía 9 ml de la disolución de colagenasa, el cual había sido previamente incubado durante 15 minutos en la estufa de CO<sub>2</sub> para conseguir la captación de CO<sub>2</sub> por el medio. Una vez adicionados los fragmentos, se llevaron a un agitador atemperado a 38 °C, y se mantuvieron en agitación suave durante 1 hora y 45 minutos.

Terminado el proceso de digestión, se centrifugó el tubo con colagenasa con los

fragmentos de las aortas, durante 5 minutos a 500 g. Se desechó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en medio MEM adicionado con 10 % de SFB a 37 °C en campana de flujo laminar, y se sembraron las células obtenidas en un frasco de 75 cm<sup>2</sup>. Las células se mantuvieron sin cambiar el medio al menos durante dos días, ya que a lo largo de ese tiempo se van adhiriendo a la superficie del frasco. A partir del primer cambio, el medio se renovó en días alternos.

Éste es el procedimiento que se detalla en los distintos protocolos de los que disponemos en el laboratorio, sin embargo en todas las edades fueron necesarias digestiones adicionales, las cuales se realizaron con la misma concentración de colagenasa. Para las células procedentes de aortas de ratas de 2 meses fueron necesarias dos digestiones adicionales a las dos sugeridas en el protocolo, la tercera de 1 hora y 40 minutos y la cuarta de 30 minutos. Para las células procedentes de aortas de ratas de 12 meses fueron necesarias dos digestiones adicionales, la tercera de 1 hora y 40 minutos y la cuarta de 40 minutos. Para las células procedentes de aortas de ratas de 24 meses fue necesaria una única digestión adicional de 1 hora y 30 minutos.

## **5. TÉCNICAS BÁSICAS DE CULTIVO CELULAR**

### **5. 1. MATERIALES, REACTIVOS Y APARATOS**

- PBS, adquirido a Gibco (Ref. 14040).
- Tripsina al 0,25 %, adquirida a Gibco (Ref. 25200).
- MEM y DMEM:F-12, adicionados con 10 % SFB y 1 X PSG.
- Cámara de Neubauer.
- Frascos de Roux y placas de cultivo.
- Criotubos y contenedor de congelación.
- Dimetilsulfóxido, adquirido a Sigma-Aldrich (Ref. 472301).
- Tanque de nitrógeno líquido.
- Incubadora: 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C y humedad saturada.
- Campana de flujo laminar, bio-II-A.
- Baño termostatzado a 37 °C.

## 5. 2. PROCEDIMIENTOS

### 5. 2. 1. Mantenimiento en cultivo

Las VSMCs fueron cultivadas en una incubadora a 37 °C, con 5 % de CO<sub>2</sub>, y humedad saturada, utilizando medio MEM suplementado con 1 X penicilina+estreptomicina+glutamina y suero fetal bovino (SFB) al 10 %. Todas las manipulaciones de estas células se realizaron en campana de flujo laminar. Los medios fueron calentados a 37 °C antes de ser adicionados a las células en cultivo.

### 5. 2. 2. Tripsinización: pasaje y conservación

Las células se tripsinizaron aproximadamente una vez por semana, y en cada pase se sembraron 6.000 células/cm<sup>2</sup>. Para tripsinizar un frasco de Roux de 75 cm<sup>2</sup>, el medio de cultivo fue eliminado y las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X, para eliminar los restos de suero que pudieran inactivar la tripsina. Seguidamente se añadieron 5 ml de tripsina/EDTA, se observaron las células al microscopio y cuando comenzaron a redondearse se eliminó parte de la tripsina dejando aproximadamente 1 ml, con la que se incubaron las células aproximadamente 5 minutos a 37 °C. Cuando las células estuvieron totalmente redondeadas, se terminaron de despegar dando unos golpes secos en los laterales del frasco. Se añadieron 5 ml de medio completo (para detener la actividad de la proteasa), se homogenizó suavemente con una pipeta y se realizaron los sucesivos subcultivos en frascos de Roux y/o placas, en función de la utilidad que se le fuera a dar a las células.

A la vez que se realizaron subcultivos sucesivos, las células se congelaron en criotubos en presencia de un 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO) final. El DMSO actúa como preservante frente a la congelación, evitando la formación de cristales que podrían romper las células. Los criotubos se introdujeron en el contenedor de congelación a -80 °C con isopropanol consiguiéndose así una disminución gradual de la temperatura y por tanto menos daño celular. Tras 24 horas se transfirieron al tanque de nitrógeno líquido para su almacenamiento a -195°C.

Para descongelar, las células se transfirieron directamente del tanque de nitrógeno a un baño termostático a 37 °C. Una vez descongeladas, las células se transfirieron con pipeta a un frasco de Roux, el cual contenía medio completo, y se dejaron con ese medio en

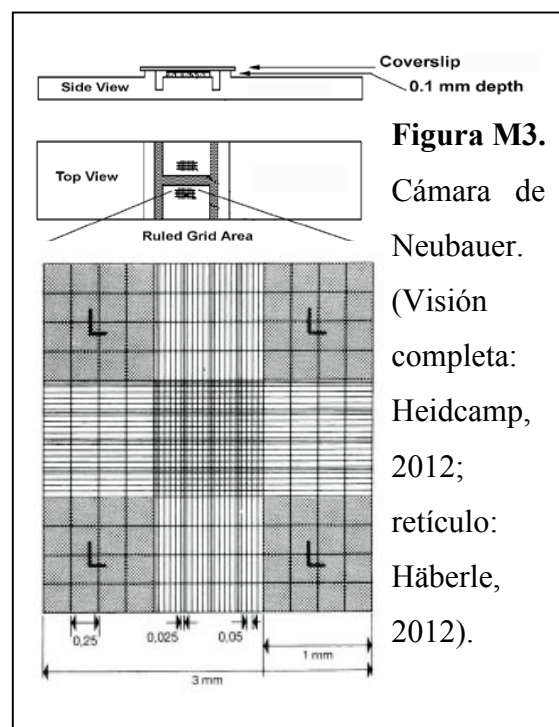
presencia de DMSO hasta que se adherieron al plástico. Una vez adheridas, se cambió el medio para eliminar el DMSO.

Se realizaron sucesivos subcultivos hasta alcanzar 17 divisiones, momento a partir del cual comenzaron a usarse para realizar los experimentos. Durante veinticuatro horas previas al comienzo de cada experimento, las células se incubaron con medio de quiescencia, es decir, MEM o DMEM:F-12 en función de las necesidades experimentales, suplementado con 0,2 % de suero fetal bovino. Los tratamientos para cada experimento se realizaron también con suero fetal bovino al 0,2 %.

### 5. 2. 3. Cálculo de la densidad celular

La densidad celular fue determinada por conteo de las células en una cámara de Neubauer, tras la tripsinización de frascos de Roux confluentes. La cámara de Neubauer es un portaobjetos en el que está grabada una retícula de dimensiones precisas (Figura M3).

Se contaron las células localizadas en el cuadrante central. La medida se repitió varias veces para reducir el error experimental. Se aplicó la siguiente fórmula para el cálculo de las células presentes en el frasco a la confluencia:



**Figura M3.** Cámara de Neubauer. (Visión completa: Heidcamp, 2012; retículo: Häberle, 2012).

\* *Superficie y profundidad son valores referidos a la cámara de Neubauer.*

$$\frac{n^{\circ} \text{ células.recogidas}}{[\text{superficie}(\text{mm}^2)] \times [\text{profundidad}] \times [\text{dilución}]} = \frac{\text{células}}{\mu\text{l}}$$

A partir del número de células recogidas (tras la tripsinización) y conociendo las células sembradas al inicio del cultivo se calcularon las divisiones acumuladas (CPDs):

$$CPDs = \frac{\log(\text{células.recogidas}) - \log(\text{células.sembradas})}{\log_{10}(2)}$$



#### 5. 2. 4. Selección del tipo de suero fetal bovino (SFB) usado para el mantenimiento de cultivos celulares

Las VSMCs se cultivaron con medio MEM. A éste se adicionó suero fetal bovino a concentración 10 % final y PSG 1 X. Debido a la existencia de numerosos sueros bovinos comerciales con notables efectos diferentes en estas células en cultivo, se adquirieron diferentes sueros de la casa Gibco y se cultivaron duplicados de placas con sueros de distintos orígenes, con los siguientes números de referencia, para comprobar con cuál de ellos crecían mejor estas células: 10500-Sudamérica, 10106-Sudáfrica, 10100-Australia, 10270-Sudamérica, 10108-Europa y 16140-EE.UU.

Se sembraron las células en placas de 8,8 cm<sup>2</sup>, todas ellas a la misma concentración celular (células/cm<sup>2</sup>). Desde el momento de la siembra se comenzó a cultivar cada placa con el suero correspondiente. Se eligió el suero con el que las células permanecían en quiescencia (SFB 0,2 %) durante más tiempo sin morir. Se hizo el experimento tres veces y finalmente se eligió como suero a usar el de referencia 10270, adquiriéndose suficiente cantidad del mismo lote para completar los estudios.

### **6. DISEÑO EXPERIMENTAL: TRATAMIENTOS “IN VITRO”**

Los estudios *in vitro* se realizaron en todos los casos con VSMCs. Se llevaron a cabo diferentes tipos de estudios, determinación de la citotoxicidad, senescencia y calcificación. Además de cultivos para extraer proteína, RNA y muestras para ELISA.

En todos los casos las células se sembraron y se mantuvieron con medio MEM adicionado con SFB al 10 %. Una vez alcanzaron la confluencia este medio de cultivo se substituyó por medio de quiescencia, MEM (o DMEM:F-12 para todos los tratamientos con arsénico, excepto en el caso de la calcificación, en los que se usó MEM), reduciendo el porcentaje de SFB al 0,2 %, medio con el que se mantuvieron durante 24 horas para seguidamente comenzar los correspondientes análisis o tratamientos, usando para ello estos mismos medios. En todos los casos el medio se cambió a días alternos.

A continuación se detallan cada uno de los tratamientos llevados a cabo:

## 6. 1. DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

La determinación de la citotoxicidad por cuantificación de la LDH intracelular (lactato deshidrogenasa) liberada al medio se realizó en placas de 24 pocillos, tanto para los estudios sobre arsénico como en el caso del flúor.

### 6. 1. 1. Citotoxicidad asociada a las diferentes especies de arsénico

En los estudios para evaluar la citotoxicidad de las diferentes formas de arsénico mediante la cuantificación de la liberación de LDH, las VSMCs se trataron con los siguientes compuestos, arsenito ( $\text{As}^{\text{III}}$ ), arseniato ( $\text{As}^{\text{V}}$ ), ácido monometilarsénico (MMA) y ácido dimetilarsénico (DMA). Las concentraciones usadas fueron 0, 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$  para cada uno de ellos. Se realizó un control positivo como detalla el propio kit (explicado en el apartado correspondiente). Para evaluar la citotoxicidad mediante la doble tinción fluorescente con naranja de acridina y bromuro de etidio las VSMCs se sembraron en placas de microscopía, en este caso únicamente se valoró la citotoxicidad de  $\text{As}^{\text{III}}$  a 5 y 10  $\mu\text{M}$  y  $\text{As}^{\text{V}}$  a 10  $\mu\text{M}$ . El control positivo en este caso fueron células fijadas con metanol al 100 % y el control negativo células incubadas bajo las mismas condiciones pero en ausencia de arsénico. En ambos estudios el tratamiento se prolongó durante 5 días.

En el caso de los estudios para evaluar la citotoxicidad asociada a calcificación, las células se incubaron durante 5 días en condiciones hiperfosfatémicas ( $\text{Pi}$  2,5 mM) en presencia de  $\text{As}^{\text{III}}$  a concentraciones crecientes, 0, 1, 2,5, y 5  $\mu\text{M}$  con medio MEM.

### 6. 1. 2. Citotoxicidad asociada a las diferentes concentraciones de flúor

La citotoxicidad asociada al tratamiento con flúor se evaluó tanto a concentraciones normofosfatémicas ( $\text{Pi}$  1 mM) como hiperfosfatémicas ( $\text{Pi}$  2 mM). En ambos casos las VSMCs se trataron con concentraciones crecientes de  $\text{F}^-$ : 0, 2,5, 5 y 10  $\mu\text{M}$ , durante 5 días.

## 6. 2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA

La determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa se realizó en VSMCs extraídas de ratas de diferentes edades, 2, 12 y 24 meses y con diferentes divisiones acumuladas en cultivo, 17, 30, 70 y 90. La siembra de las células se realizó en placas de 24 pocillos, la actividad se determinó al tercer día post-siembra.

Para determinar la senescencia prematura inducida por estrés (SIPS) por efecto del arsénico, las VSMCs se sembraron en placas de 24 pocillos, al alcanzar la confluencia las células se trataron con  $As^{III}$ ,  $As^V$ , MMA y DMA. Las concentraciones usadas fueron 0, 1, 10 y 100  $\mu M$  para cada una de ellos. El tratamiento se prolongó durante 5 días.

### 6. 3. INMUNOFLUORESCENCIA

En todos los casos en los que se realizó inmunofluorescencia las VSMCs se sembraron en placas de microscopía.

En los estudios sobre envejecimiento se sembraron VSMCs extraídas de ratas de diferentes edades, 2, 12 y 24 meses y con diferentes divisiones acumuladas en cultivo, 17, 30, 70 y 90. Al alcanzar la confluencia se incubaron durante 24 horas con medio de quiescencia y seguidamente se realizaron los análisis oportunos: apoptosis (técnica de TUNEL) o detección de proteínas citoplásmicas y nucleares, con sus correspondientes metodologías (explicadas más adelante en los apartados correspondientes a cada una de ellas).

En el estudio sobre arsénico se determinó mediante inmunofluorescencia: apoptosis (técnica de TUNEL), estrés oxidativo (determinación de la presencia de especies reactivas de oxígeno) y expresión de proteínas citoplásmicas y nucleares. En todos los casos las VSMCs al alcanzar la confluencia se incubaron con medio de quiescencia durante 24 horas y seguidamente comenzó el tratamiento en ausencia de arsénico o con  $As^{III}$  a 5 ó 10  $\mu M$  o  $As^V$  10  $\mu M$ , el cual se prolongó durante 5 días.

### 6. 4. TRATAMIENTOS PARA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA Y RNA

Para la extracción de proteína y RNA las VSMCs se sembraron en placas de 56,7  $cm^2$ . En estudios sobre envejecimiento se sembraron VSMCs extraídas de ratas de diferentes edades, 2, 12 y 24 meses y con diferentes divisiones acumuladas en cultivo, 17, 30, 70 y 90, se mantuvieron en cultivo hasta alcanzar la confluencia, momento en el que se pusieron en quiescencia durante 24 horas para proceder seguidamente a la extracción de la muestra. En el caso de arsénico una vez alcanzada la confluencia se pusieron en quiescencia y tras 24 horas de incubación se inició el tratamiento en ausencia de arsénico o con  $As^{III}$  a 5 ó 10  $\mu M$  o  $As^V$  10  $\mu M$ , el cual se prolongó durante 5 días.

Para la extracción de RNA en los tratamientos con flúor bajo condiciones calcificantes

(Pi 2 mM) las VSMCs se sembraron también en placas. Se mantuvieron con medio completo hasta alcanzar la confluencia, momento en el que este medio se sustituyó por medio de quiescencia, con el que se incubaron durante 24 horas para comenzar seguidamente el tratamiento con diferentes concentraciones de flúor, 0, 5 y 10  $\mu\text{M}$ , en presencia de Pi 2 mM. Como control negativo paralelamente se cultivaron células en ausencia de flúor y en presencia de Pi 1 mM. Las muestras se recogieron tras 5 días de tratamiento.

#### 6. 5. TRATAMIENTOS EMPLEADOS EN TÉCNICAS DE ELISA

Estos análisis únicamente se llevaron a cabo en los estudios sobre arsénico. En el caso de ELISA sándwich (cuantificación de interleukina 1 $\beta$ ) la muestra utilizada fue el sobrenadante del medio de cultivo, para ELISA directo (cuantificación de proteínas oxidadas-estrés oxidativo) la muestra requerida fue proteína. El tratamiento llevado a cabo fue en ambos casos el mismo que para la recolección de proteína y RNA.

#### 6. 6. ESTUDIOS SOBRE CALCIFICACIÓN

Para evaluar la relación entre calcificación y envejecimiento, tras alcanzar la confluencia las células de diferentes divisiones y edad del donante se incubaron con medio calcificante (Pi 2 mM) durante 5 días, tras los cuales se recogió la correspondiente muestra (como se explica en el apartado referente a la cuantificación de la calcificación).

En el estudio sobre arsénico se realizaron varios estudios relacionados con la calcificación. Para determinar si el arsénico es capaz de inducir calcificación en condiciones normales o basales, las VSMCs tras alcanzar la confluencia fueron incubadas durante 5 días en medio MEM sin adicionarle fosfato (Pi 1 mM), con  $\text{As}^{\text{III}}$  a concentraciones crecientes 0, 1, 2,5 y 5  $\mu\text{M}$ . Paralelamente para evaluar el efecto del arsénico en condiciones hiperfosfatémicas se incubaron, con estas mismas concentraciones de  $\text{As}^{\text{III}}$ , en presencia de Pi 2,5 mM. Este ensayo se realizó tanto en células vivas como en células muertas (como modelo de calcificación pasiva). Con el fin de relacionar la senescencia inducida por  $\text{As}^{\text{III}}$  y la calcificación, se llevaron a cabo un tercer y cuarto estudio. En primer lugar las células tras alcanzar la confluencia se incubaron durante 5 días con  $\text{As}^{\text{III}}$  a concentraciones crecientes 0, 2,5, 5 y 10  $\mu\text{M}$  en medio MEM sin adicionarle fosfato (Pi 1 mM) para inducir senescencia y tras este tratamiento el medio de cultivo se sustituyó por un medio libre de  $\text{As}^{\text{III}}$  y con una concentración final de Pi de 2,5 mM. En segundo lugar se valoró la reversión de la

calcificación con resveratrol, en este caso se incubaron las VSMCs bajo condiciones calcificantes durante 5 días, con las siguientes concentraciones de  $As^{III}$ : 0, 1, 2,5 y 5  $\mu M$ , en presencia y ausencia de resveratrol 10  $\mu M$ .

El estudio de la relación entre flúor y calcificación se llevó a cabo incubando las VSMCs tras alcanzar la confluencia, durante 5 días, en medio MEM sin adicionarle fosfato ( $P_i$  1 mM), con  $F^-$  a concentraciones crecientes 0, 2,5, 5 y 10  $\mu M$ . Paralelamente para evaluar el efecto del flúor en condiciones hiperfosfatémicas se incubaron las VSMCs, con estas mismas concentraciones de  $F^-$ , en presencia de  $P_i$  2 mM. Este ensayo se realizó tanto en células vivas como en células muertas (como modelo de calcificación pasiva). En el caso de las células muertas se realizó un segundo estudio con las mismas concentraciones indicadas anteriormente en condiciones hiperfosfatémicas, pero en este caso en lugar de recoger muestras únicamente a los 5 días de tratamiento, las muestras se recogieron a día 2, 3 y 5. En el caso de las células vivas, tras este estudio previo se estudió el efecto inhibitorio del flúor en el proceso de calcificación vascular, para ello se realizó una curva dosis-respuesta con concentraciones crecientes de un inhibidor de la calcificación: pirofosfato (0, 0,1, 0,2, 0,4, 1, 2, 10, 100  $\mu M$ ) o ácido fosfonofórmico (0, 0,5, 1, 2, 5, 10, 100 y 1000  $\mu M$ ), bajo condiciones calcificantes, en presencia o ausencia de 5  $\mu M F^-$ .

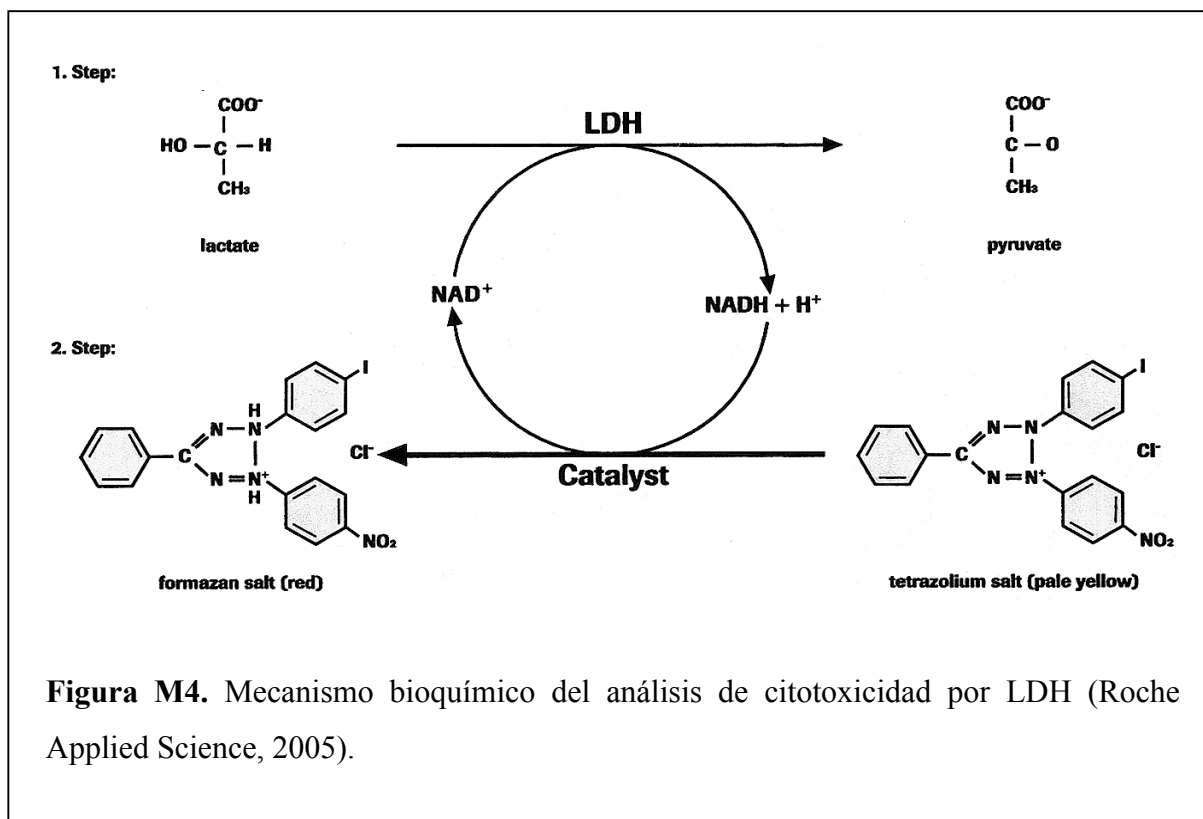
## **7. DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD**

Las células en cultivo fueron sometidas a diferentes tratamientos (detallados en el apartado “Diseño experimental”) siendo necesaria la determinación de la existencia de citotoxicidad en los mismos. Para ello se usó un análisis colorimétrico basado en la aparición de actividad lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo, como consecuencia de la liberación de LDH intracelular por ruptura de la membrana celular.

Para ello se usó un kit de Roche, *Citotoxicity Detection Kit* (Ref. 11 644 793 001).

El mecanismo bioquímico del análisis es el siguiente. En primer lugar  $NAD^+$  es reducido a  $NADH/H^+$  por oxidación de lactato a piruvato en una reacción catalizada por la LDH. En un segundo paso un catalizador, la diaforasa, transfiere  $H/H^+$  desde el  $NADH/H^+$  a la sal 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-cloruro de feniltetrazolio (INT) de color amarillo, la

cual se reduce a formazán, pasando a tener color rojo (Figura M4). Un incremento en la cantidad de muerte celular o daño a la membrana resulta en un incremento de la actividad LDH en el sobrenadante. Este incremento se correlaciona directamente con la cantidad de formazán generado, siendo éste proporcional a la cantidad de células lisadas. El formazán acumulado es hidrosoluble, y presenta un máximo de absorbancia a alrededor de 500 nm, mientras la sal INT de tetrazolio no presenta una absorción significativa a esa longitud de onda.



## 7. 1. MATERIALES, REACTIVOS Y APARATOS

- *Citotoxicity Detection Kit* de Roche.
- Placas de 96 pocillos.
- Espectrofotómetro para microplacas.
- Tritón X-100 al 2 %.

## 7. 2. PROCEDIMIENTO

Se procedió a la toma de muestras del sobrenadante de las células en cultivo, 50

μl/condición por duplicado, el día de inicio del tratamiento (día 0), el día 1, 3 y 5. También se tomaron muestras del control negativo (mismo medio de tratamiento en ausencia de células para determinar la señal de fondo) y del control positivo (células lisadas con el medio de tratamiento conteniendo adicionalmente Tritón X-100 al 2 %). Las muestras se mantuvieron refrigeradas hasta el análisis de las mismas.

Se adicionaron 50 μl del reactivo (preparado según las indicaciones del fabricante) a cada uno de los pocillos de la microplaca con la muestra recogida, se mezcló en un orbital y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz. Finalizada la incubación se midió la absorbancia (A) a una longitud de onda de 450 nm. El cálculo de la citotoxicidad se realizó con la siguiente fórmula:

$$\frac{A_{muestra} - A_{control(-)}}{A_{control(+)} - A_{control(-)}} \times 100$$

## **8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD β-GALACTOSIDASA**

Se ha demostrado que la enzima β-galactosidasa tiene un comportamiento anormal asociado con las células senescentes. Esta enzima es una hidrolasa lisosomal, normalmente activa a pH 4, pero en células senescentes también se mantiene activa a pH 6, debido a que las células senescentes muestran una expresión de la β-galactosidasa de cinco a diez veces mayor que las jóvenes. Los lisosomas incrementan su número y tamaño en las células senescentes (Brunk y cols., 1973; Robbins y cols., 1970), y la actividad β-galactosidasa asociada a la senescencia parece ser el resultado del incremento de la actividad lisosomal a pH sub-óptimo (pH 6), el cual es detectable en células senescentes debido a un incremento del contenido lisosomal (Kurz y cols., 2000). Se ha visto que la tinción no es positiva en células quiescentes o en aquellas diferenciadas y no senescentes, así como tampoco lo es en células inmortales (Dimri y cols., 1995).

Esta tinción fue desarrollada originalmente por Dimri y cols., en 1995.

## 8. 1. MATERIALES, REACTIVOS Y APARATOS

- PBS 1 X: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, a pH 7,4.
- Solución de fijación: paraformaldehído al 4 % en PBS 1 X.
- Reactivo X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido de Sigma (Ref. B4252), disuelto en dimetilformamida.
- Solución de tinción/control positivo: la diferencia entre control positivo y solución de tinción fue el pH del tampón, en el caso del control positivo era pH 4 y para la solución de tinción pH 6. La composición fue X-gal 1 mg/ml, ferricianuro potásico 5 mM, ferrocianuro potásico 5 mM, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM y ácido cítrico/tampón fosfato de sodio 40 mM pH 4 ó 6.
- Incubadora a 37 °C de aire normal.

## 8. 2. PROCEDIMIENTO

El procedimiento fue ligeramente diferente en el estudio sobre senescencia y sobre arsénico.

En el caso de senescencia se sembraron 6.000 células/cm<sup>2</sup> por pocillo y se cultivaron durante 3 días. Al tercer día se lavaron con PBS dos veces y se fijaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. La fijación se realizó para impedir la autólisis y mantener la morfología y localización de los constituyentes celulares en forma lo más próxima posible a la existente durante la vida celular. Una vez fijadas se lavaron dos veces con PBS y se añadió la solución de tinción (200 µl/pocillo), con la que se incubaron durante 12 horas a 37 °C.

En el estudio sobre arsénico las células fueron tratadas durante 5 días y una vez finalizado el tratamiento se llevó a cabo la tinción.

En el caso de las aortas completas se extrajo la aorta del mismo modo que para obtener VSMCs, pero en este caso la aorta no fue sometida a ninguna digestión posterior, sino que una vez extraída se lavó con PBS y se fijó en paraformaldehído al 4 % en PBS durante 4 horas. Tras la fijación se procedió a la inmersión de la aorta completa en la solución de tinción durante 16-18 horas.

La tinción se realizó tanto a pH 4 (control positivo) como a pH 6 en todos los casos.



## **9. INMUNOFLUORESCENCIA**

Las técnicas inmunofluorescentes para la detección de proteínas citoplásmicas y nucleares se realizaron tanto en cultivo celular (inmunocitología) como en tejido (inmunohistoquímica), en este caso aorta, variando el procedimiento entre ellos.

Otras técnicas de microscopía fluorescente utilizadas se dirigieron a la determinación de la viabilidad celular (TUNEL y naranja de acridina/bromuro de etidio) y del estado de estrés oxidativo.

### **9. 1. MATERIALES, REACTIVOS Y APARATOS**

- Cubreobjetos, placas de cultivo para microscopía de BD (Ref. 314508) para inmunocitología o porta-objetos HistoBond de StatLab (McKinney, EE.UU.) tratados con silano para inmunohistoquímica.
- Criostato atemperado a -30 °C.
- PBS 1 X frío: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O 7,75 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, CaCl<sub>2</sub>\*H<sub>2</sub>O 0,88 mM, MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O 0,5 mM a pH 7.4. Esterilizado.
- Solución de fijación:
  - Inmunocitoquímica: Paraformaldehído al 4 % en PBS 1 X.
  - Inmunohistología: paraformaldehído al 1,5 % + glutaraldehído al 0,1 % + sacarosa al 20 % en PBS 1 X.
- Glicina 20 mM en PBS.
- Saponina al 0,1 % en PBS.
- Tween 20 al 1 % en PBS.
- Suero anti-cabra (Sigma, Ref. G9023) o albúmina sérica bovina (Sigma, Ref. A6003).
- Anticuerpos primarios y secundarios, características detalladas en la tabla M1.
- Protector de la fluorescencia (*anti-fading*), con y sin DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) adquirido a Invitrogen-Molecular Probes (Ref. P36930).
- Microscopio de fluorescencia.

**Tabla M1.** Características de los anticuerpos usados para inmunofluorescencia

<b>Proteína</b>	<b>Concentración anticuerpo primario</b>	<b>Casa comercial anticuerpo 1<sup>ario</sup> (referencia)</b>	<b>Anticuerpo secundario Alexa: Comprado a Invitrogen-Molecular Probes (referencia)</b>
$\alpha$ -Actina	1:400	Sigma (A5228)	1:400 Cabra anti-ratón 488 (A11029)
SM22 $\alpha$	1:50	Santacruz (sc-18513)	1:400 Burro anti-cabra 568 (A11057)
Calponina	1:50	Santacruz (sc-16604-R)	1:400 Cabra anti-conejo 568 (A11036)
Lámina A/C	1:250	Santacruz (sc-6215)	1:400 Burro anti-cabra 568 (A11057)
p21	1:50	Santacruz (sc-6246)	1:400 Cabra anti-ratón 488 (A11029)
p21	1:50	Sigma (P1484)	1:400 Cabra anti-ratón 488 (A11029)
Faloidina FITC	1:50	Sigma (P5282)	No es necesario

## 9. 2. INMUNOCITOLOGÍA

Las células se sembraron en placas de microscopía pre-tratadas con poli-L-lisina para favorecer la adhesión de las células al vidrio. Al alcanzar la confluencia, las células se lavaron tres veces con PBS para eliminar todos los restos del medio de cultivo y se procedió a la fijación de las mismas para impedir la autólisis y mantener la morfología y localización de los constituyentes celulares. La fijación se realizó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras la fijación se realizaron tres lavados con PBS para eliminar el paraformaldehído sobrante. El paraformaldehído actúa entrelazando grupos amino mediante enlaces covalentes, por ello tras los lavados con PBS las células se incubaron durante 10 minutos con glicina, para inactivar las trazas de paraformaldehído activo, evitando que alterara los anticuerpos utilizados en las incubaciones posteriores.

Se procedió a lavar de nuevo con PBS, tres veces, y seguidamente, para permitir que los anticuerpos penetraran en el interior de las células, éstas fueron permeabilizadas con saponina durante 30 minutos. A partir de este paso, todas las incubaciones y lavados se llevaron a cabo en presencia del detergente suave saponina.

Conjuntamente con la permeabilización se procedió al bloqueo para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos, con suero anti-cabra al 10 % o BSA al 3 %, en función del anticuerpo usado. El bloqueo ideal se realiza con suero de la misma especie que el anticuerpo secundario a usar, y si no es posible, puede usarse BSA.

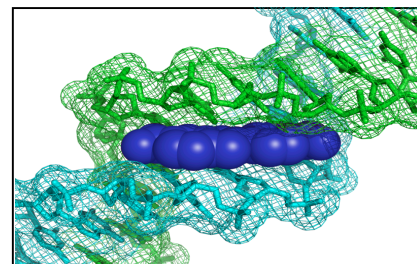
Seguidamente se realizaron tres lavados con PBS y la incubación de las células con el anticuerpo primario (a la concentración indicada en la Tabla M1) en PBS con saponina y suero anti-cabra al 1,5 % o BSA al 3 %, durante 1 hora en atmósfera húmeda para evitar la evaporación del medio y concentración del anticuerpo.

Transcurrida la hora de incubación se procedió al lavado de las células con PBS, tres veces, y a la incubación con el anticuerpo secundario frente a la especie en la que fue obtenido el primario, conjugado con las moléculas fluorescentes Alexa 488 (verde) o Alexa 568 (rojo) (a la concentración indicada en la Tabla M1), en atmósfera húmeda y oscuridad para evitar la pérdida de fluorescencia.

Una vez finalizada la incubación con el anticuerpo secundario se lavaron las células dos veces con PBS con saponina y el último lavado sin saponina, y se añadió la solución con *antifading* para proteger la fluorescencia, en presencia o ausencia de DAPI, reactivo con fluorescencia de color azul que marca el DNA intercalándose entre los pares de bases de éste, y por tanto hace visibles los núcleos bajo luz de 358 nm (Figura M5).

Seguidamente se colocó un cubre sobre las células, sellándolo por todos sus extremos.

La preparación se mantuvo durante un día a temperatura ambiente en oscuridad antes de la observación con el microscopio de fluorescencia, para que el *antifading* ejerciera su máxima actividad protectora. Las muestras una vez observadas se conservaron a -20 °C.



**Figura M5.** DAPI en color azul intercalado en la hebra de DNA (Wheeler, 2007).

### 9. 3. INMUNOHISTOLOGÍA

Se extrajo la aorta (por el método explicado anteriormente) y se fijó con paraformaldehído al 1,5 % + glutaraldehído al 0,1 % + sacarosa al 20 % en PBS a 4 °C durante 2 horas. Tras la fijación se lavó con PBS y seguidamente se crioprotegió con sacarosa

al 20 % en PBS a 4 °C durante 1 hora. Finalizada la incubación con sacarosa se lavó en PBS, se secó por contacto con papel de filtro húmedo, se embebió en OCT y se congeló.

Los cortes se realizaron a 7 µm con un criostato a -30 °C. El protocolo de tinción presentó ligeras diferencias con el de inmunocitología.

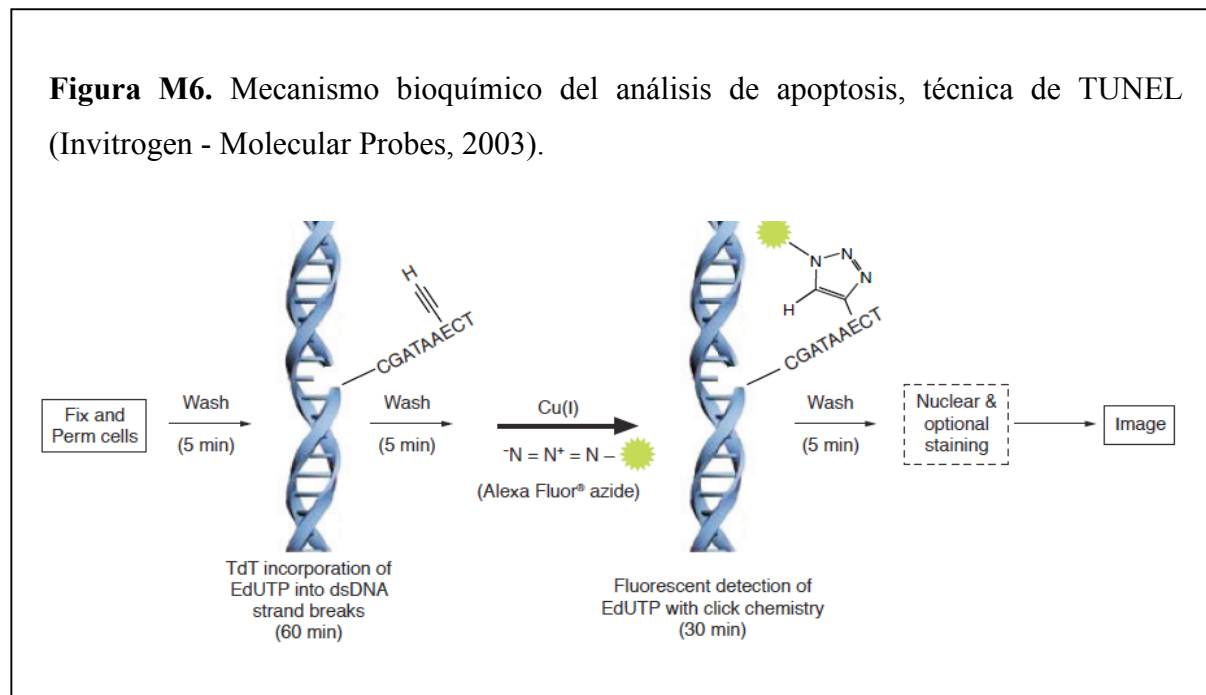
En el caso de la aorta, tras la adhesión de los cortes al cubreobjetos tratado con silano, se incubaron con glicina durante 20 minutos. Se lavaron con PBS 2 veces y se procedió al bloqueo y permeabilización simultánea de los cortes de aorta con suero anti-cabra al 15 % o BSA al 10 % en PBS con Tween 20 al 1 % durante 20 minutos. A partir de este punto todos los lavados e incubaciones se realizan con PBS+Tween 20 al 1 %. Tras la incubación se lavaron los cortes dos veces con PBS, incubando durante 3 minutos en cada lavado. Una vez realizados los lavados se incubaron los cortes con el anticuerpo primario en PBS con suero anti-cabra o BSA al 3 %, durante toda la noche a 4 °C en atmósfera saturada de humedad para evitar el secado de las muestras. Finalizada la incubación se lavó dos veces con PBS y se procedió a la incubación durante 2 horas con el anticuerpo secundario frente a la especie en la que fue obtenido el primario, conjugado con las moléculas fluorescentes Alexa 488 (verde) o Alexa 568 (rojo) (a la concentración indicada en la Tabla M1), en atmósfera húmeda y oscuridad para evitar la pérdida de fluorescencia. Tras esta incubación se lavaron los cortes tres veces, el último lavado sin Tween 20 y se realizó el montaje con *antifading*.

#### 9. 4. DETECCIÓN DE APOPTOSIS – TÉCNICA DE TUNEL

Para determinar el grado de apoptosis de las células en cultivo se usó la técnica de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) (Gavrieli y cols., 1992) sobre células crecidas en placas de microscopía. Para ello se usó el kit *Click-iT TUNEL Alexa Fluor Imaging Assay* de Invitrogen (Ref. C10245)

En el proceso de apoptosis el DNA se fragmenta o degrada (*nicks*) dejando extremos libres. El ensayo de TUNEL se basa en la incorporación por la enzima desoxinucleótido terminal transferasa (TdT) de dUTPs modificados por adición de un grupo alquino, al extremo 3'-OH de los fragmentos de DNA hidrolizados por la enzima endonucleasa de las células apoptóticas. La detección está basada en una reacción “*click*”, en la que un ión cobre (I) cataliza una reacción entre el grupo alquino y azida marcada con el fluoróforo Alexa, sustituyéndose el alquino por el grupo azida marcado, lo que dará fluorescencia al observarlo

por microscopía fluorescente (Figura M6). En la cromatina de células normales no hay prácticamente tinción ya que cada cadena de cromatina tiene sólo un extremo libre.



Se realizó un control positivo de la reacción mediante incubación con DNasa I, como especifica el propio kit. Esta enzima genera roturas en la cadena de DNA, simulando el efecto de las endonucleasas durante la apoptosis.

#### 9. 5. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR CON BROMURO DE ETIDIO Y NARANJA DE ACRIDINA

Este método emplea la fluorescencia diferencial del DNA por unión a naranja de acridina y bromuro de etidio. El naranja de acridina se intercala en el DNA dando fluorescencia verde al núcleo y se une al RNA pero no se intercala, dando una leve coloración naranja, en forma de punteado, al citoplasma. Así las células viables presentan el núcleo de color verde y el citoplasma verde con punteado anaranjado (Robbins, 1963). El bromuro de etidio es únicamente captado por células no viables, en ellas se intercala en el DNA dando fluorescencia naranja/roja al núcleo, de mayor intensidad que la del naranja de acridina (verde) (Waring, 1965).

Una vez finalizados los tratamientos en placa, las células fueron lavadas con PBS y se adicionaron 100 µl por pocillo de la mezcla de naranja de acridina y bromuro de etidio,

ambos a concentración de 50 µg/ml en PBS. El control positivo se correspondió con células fijadas con metanol 100 % durante 5 minutos. La toma de fotografías se realizó rápidamente tras la adición de la tinción, para evitar la pérdida de fluorescencia y generación de falsos positivos, como consecuencia del daño celular producido por el bromuro de etidio.

#### 9. 6. DETERMINACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO

Para determinar el grado de estrés oxidativo mediante inmunofluorescencia se utilizó el kit *CellROX (Oxidative Stress) Green Reagent* de Molecular Probes (Ref. C10444) que detecta la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células vivas. La tinción aparece por unión del fluoróforo al DNA principalmente en núcleo y mitocondrias de células que presentan un estado oxidado. Se utilizó como control positivo células tratadas durante 1 hora con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM. Una vez finalizados los tratamientos en placa las células fueron lavadas con PBS y se adicionaron 200 µl del reactivo por pocillo disuelto en PBS a concentración 5 µM y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Tras esta incubación se eliminó la solución de tinción, se lavaron tres veces con PBS y se realizó el montaje de la placa (sin DAPI) para proceder a la observación en el microscopio de fluorescencia.

### 10. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

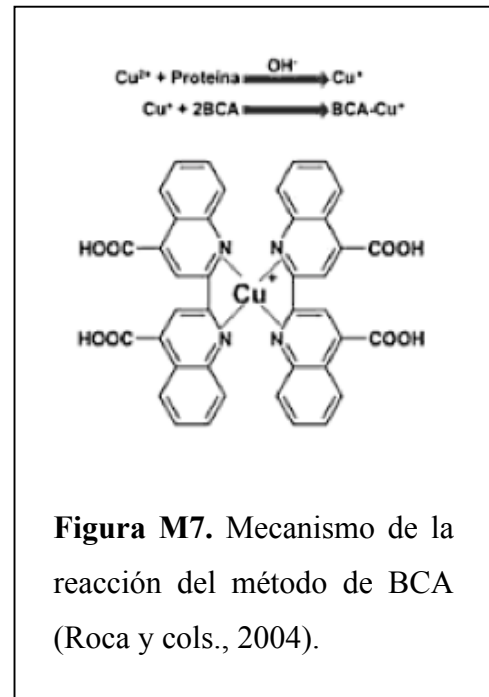
Se utilizaron dos métodos de cuantificación de proteínas en función de la técnica para la que se requería la cuantificación. La proteína destinada a *Western-blot* se cuantificó mediante el método de BCA, mientras la proteína recogida post-calcificación se cuantificó mediante el método de Bradford. Esta disparidad se debió a la diferente concentración de proteína extraída en cada caso (explicado más adelante).

#### 10. 1. MÉTODO DE BCA

Este método presenta una formulación basada en ácido bicinconínico (BCA) compatible con muchos detergentes, para la detección colorimétrica y cuantificación total de proteína (Smith y cols., 1985). Combina la reducción del Cu<sup>+2</sup> a Cu<sup>+1</sup> por la proteína en un medio alcalino (reactivo de Biuret) y la determinación de los iones cuprosos formados por el establecimiento de un complejo con dos moléculas de BCA (Figura M7), el cual presenta

coloración púrpura con un máximo de absorción a 562 nm. El rango de cuantificación es de 20 a 2.000 µg/ml.

El Reactivo de Biuret es aquel que detecta la presencia de proteínas, péptidos cortos y otros compuestos con dos o más enlaces peptídicos en sustancias de composición desconocida. Su composición consta de un compuesto hidróxido (sódico o potásico) y sulfato cúprico (CuSO<sub>4</sub>), junto con tartrato de sodio y/o potasio (KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>\*4H<sub>2</sub>O). El hidróxido no participa en la reacción, pero proporciona el medio alcalino necesario para que tenga lugar.



Esta técnica se usó para cuantificar la proteína recogida a partir de placas de 56,7 cm<sup>2</sup> destinada a *Western-blot*, en tampón de lisis RIPA (lisis con detergentes).

#### 10. 1. 1. Materiales, reactivos y aparatos

- Proteína estándar: Albúmina sérica bovina (BSA), con un rango de concentración de 1.650 a 20,63 µg /ml.
- *Pierce BCA Protein Assay Kit* de Thermo Scientific (Ref. 23225), reactivos:
  - A: Carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinconínico (BCA) y tartrato de sodio en hidróxido sódico 0,1 M.
  - B: Sulfato de cobre al 4 %.
- Placa de 96 pocillos.
- Espectrofotómetro.

#### 10. 1. 2. Procedimiento

Se preparó el reactivo mezclando 50 partes del reactivo B con 1 parte del reactivo A.

Se añadieron 25 µl de cada muestra a una placa de 96 pocillos (por triplicado), así como 25 µl de cada estándar para realizar la recta de calibrado. A cada pocillo con muestra o estándar se adicionaron 200 µl de la mezcla de reactivo, se mezcló en un orbital y se incubó

durante 30 minutos protegido de la luz a 37 °C. Finalizada la incubación se procedió a medir la absorbancia.

Con la BSA se realizó una recta de calibrado de concentración conocida en la que se extrapoló el valor de la absorbancia de cada muestra de concentración de proteína desconocida. Los cálculos se realizaron teniendo en cuenta la dilución inicial (cuando fue necesario diluir la muestra).

## 10. 2. MÉTODO DE BRADFORD

Este método (Bradford, 1976) se basa en la cuantificación espectrofotométrica de la luz emitida a longitud de onda 595 nm por un compuesto azul formado por la interacción entre los residuos de los aminoácidos básicos de las proteínas y el colorante azul brillante G (Coomassie). Con este sistema se detectan concentraciones de proteína entre 1 y 1.400 µg/ml usando BSA como estándar. Es compatible con agentes reductores pero solo es compatible con detergentes si éstos se encuentran a bajas concentraciones (por ejemplo es incompatible con tampón RIPA ya que en su composición aparece Nonidet P-40 al 1 %, mientras la cantidad compatible de este detergente con este método no debe superar el 0,5 %).

Esta técnica se usó para cuantificar la proteína recogida de cada pocillo de placas de 24 pocillos tras el tratamiento calcificante. La muestra fue cuantificada por pocillo (1,9 cm<sup>2</sup>/pocillo), obteniéndose cantidades muy pequeñas, en torno a 15-20 µg/ml. La elección de esta técnica fue debida a que la técnica de BCA no era capaz de cuantificar pequeñas cantidades de proteína (rango entre 20 y 2000 µg/ml), por ello se eligió el método de Bradford para este caso concreto. La recta de calibrado usada cubría el rango de 1 a 40 µg/ml.

### 10. 2. 1. Materiales, reactivos y aparatos

- Proteína estándar: Albúmina sérica bovina (BSA), a concentración de 1 a 40 µg/ml.
- Azul brillante G en ácido fosfórico y metanol: Reactivo de Bradford de Sigma-Aldrich (Ref. B6916).
- Placa de 96 pocillos.
- Espectrofotómetro.



### 10. 2. 2. Procedimiento

La muestra recogida tras calcificación estaba disuelta en HCl 0,6 N, disolución necesaria para solubilizar el calcio para su cuantificación. El método de Bradford es incompatible con concentraciones superiores a HCl 0,1 N, por lo que todas las muestras se diluyeron 6 veces para alcanzar una concentración compatible con el método.

Se añadieron 50 µl de cada muestra ya diluida a una placa de 96 pocillos (por duplicado), así como 50 µl de cada estándar para realizar la recta de calibrado. A cada pocillo con muestra o estándar se le adicionaron 50 µl del reactivo, se mezcló en un orbital y se incubó durante 45 minutos protegido de la luz. Finalizada la incubación se procedió a medir la absorbancia.

El valor de la absorbancia de cada muestra de concentración de proteína desconocida se extrapola a partir de la recta realizada con BSA a concentraciones conocidas. Los cálculos se realizaron teniendo en cuenta la dilución inicial.

## **11. WESTERN-BLOT: ANÁLISIS INMUNOADSORBENTE**

La técnica de *Western-blot* analiza la expresión proteica, la cual se desarrolló a partir de los trabajos de Laemmli y cols., 1976, y Towbin y cols., 1979. Éstos desarrollaron respectivamente la electroforesis discontinua en geles con SDS (dodecilo sulfato sódico) y la transferencia de proteínas desde geles de poliacrilamida a hojas de nitrocelulosa. Así se puede dividir esta técnica en varias fases: obtención de la muestra, electroforesis, transferencia e inmunodetección.

### 11. 1. MATERIALES, REACTIVOS Y APARATOS

- Muestra de proteína disuelta en tampón de carga con la siguiente composición:
  - Tris-Cl 0,058 M / SDS al 0,047 %, pH 6,8.
  - Glicerol al 5 %: aporta densidad para que la muestra entre en el pocillo del gel.
  - SDS al 1,67 %: desnaturaliza por completo las proteínas y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria. Los grupos alifáticos dodecil se colocan en el interior, mientras que los grupos sulfato en la superficie y

todos los complejos SDS-proteína toman carga neta negativa (que excede la carga intrínseca de las cadenas de aminoácidos) (García, 2000).

- DTT 0,1 M (Ditiotreitol): desnaturaliza las proteínas y es un agente reductor, permite desplegar completamente una proteína y separar las subunidades de una proteína multimérica; ambos efectos son necesarios para que la movilidad de la proteína en una electroforesis SDS-PAGE sea acorde con su masa molecular (García, 2000).
- Azul de bromofenol al 0,002 %: aporta color azul para poder seguir la muestra durante la electroforesis.
- Gel de poli-acrilamida: se forma por la polimerización vinílica del monómero acrilamida ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) y el monómero entrecruzador N,N'-metilen-bis-acrilamida ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ ). La polimerización se inicia con la formación de radicales libres del monómero, que se producen por radicales libres de oxígeno, por causa de la acción de iones persulfato (APS). Las aminas terciarias como el N, N, N, N'-tetrametilen-diamina (TEMED) se emplean como catalizadores de esta reacción, porque causan la formación de radicales libres del persulfato. Se dividen en dos regiones:
  - “*Stacker*”: primera porción del gel, en el que se cargan las proteínas. Acrilamida al 5 %, por su baja concentración de acrilamida las proteínas se mueven rápidamente y se acumulan en la entrada de la segunda región del gel.
  - Gel: acrilamida al 11 %, zona de separación de proteínas por su peso molecular.
- “*Running buffer*”: compuesto por Tris-base 0,012 M, glicina 0,1 M y SDS al 0,1 %.
- Cubeta de electroforesis *Mini Protean Tetra Cell* de Bio-Rad.
- Material, reactivos y aparatos para la transferencia:
  - Transferencia húmeda: cubeta *Mini Trans Blot-Mini Protean II* y membranas de PVDF (*Hybond-P PVDF Membrane* de Amersham (Ref. RPN2020F)), fue necesario activarlas previamente con metanol al 100 %.
  - Transferencia semi-seca: *Trans-Blot Turbo* y membranas *Trans-Blot Turbo Midi PVDF Transfer* de Bio-Rad (Ref. 170-4157).
- PBS-T: 11,5 g di-sodio hidrógeno ortofosfato, 2,96 g sodio dihidrogeno ortofosfato, 5,84 g cloruro de sodio, Tween 20 al 0,1 %, pH a 7,5 (ajustado con NaOH).
- Leche en polvo desnatada.
- Anticuerpos primarios y secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP).
- *Kit Immobilon Western* de Millipore (Billerica, EE.UU.) (Ref. P36599), para realizar la inmunodetección.

- Versadoc 400 MP para la visualización de la señal en las membranas.

## 11. 2. PROCEDIMIENTOS

### 11. 2. 1. Extracción de muestras de proteína

Se llevó a cabo la siembra de las células en placas de 56,7 cm<sup>2</sup>. Al llegar a la confluencia se incubaron durante 24 horas en medio de quiescencia. Finalizada esta incubación, la placa se lavó dos veces con PBS y se procedió a la lisis mediante raspado de la placa con tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 25 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, NP-40 al 1 %, desoxicolato de sodio al 1 %, y SDS al 0,1 %). Para cuantificar la concentración de proteína de las muestras recogidas se usó el método de BCA.

### 11. 2. 2. Electroforesis

Las proteínas se separaron mediante electroforesis según el método de Laemmli y cols., 1976, electroforesis unidimensional en gel de SDS, a 10 mA constantes por gel durante aproximadamente 1 hora y 45 minutos (hasta que el frente de corrido llegó al final del gel). El gel se preparó a concentración final de acrilamida 11 %. La cantidad de proteína a cargar dependió de la proteína a analizar (Tabla M2).

### 11. 2. 3. Transferencia

Húmeda: las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de PVDF, a 200 mA constantes durante 2 horas.

Semi-seca: las proteínas se electrotransfirieron con el programa “*Turbo: Mix Mw*” a 2,5 A (25 V) constantes durante 7 minutos.

### 11. 2. 4. Bloqueo de la membrana

Se realizó el bloqueo de la membrana con leche desnatada al 5 % para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a las membranas, durante 1 hora y en agitación.

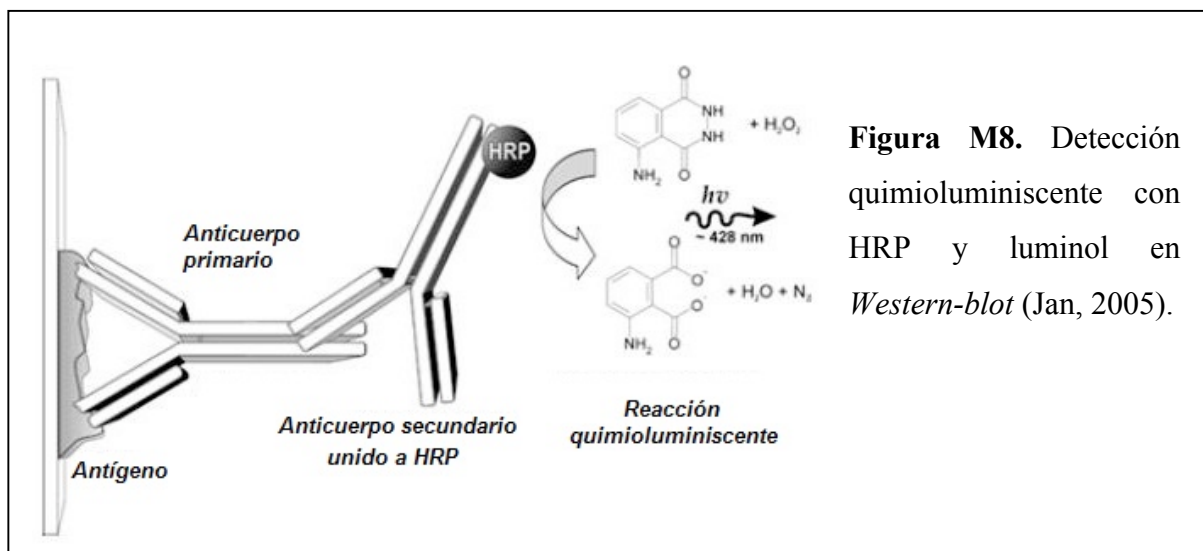
### 11. 2. 5. Inmunodetección

La incubación con el anticuerpo primario disuelto en PBS-T se realizó durante la

noche, en agitación suave y con azida de sodio al 0,01 %, la concentración del mismo se indica en la tabla M2.

Una vez finalizada la incubación se lavó la membrana y se incubó con el anticuerpo secundario, conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), durante 1 hora en agitación, disuelto en PBS-T, la concentración se indica en la tabla M2.

La inmunodetección se realizó mediante la técnica de la peroxidasa. La detección quimioluminiscente usa una enzima, la peroxidasa, la cual está unida al anticuerpo secundario y cataliza la oxidación de luminol, aportado por el *Kit Immobilon Western*, siendo este compuesto oxidado el que emite luz (Figura M8). La señal luminosa fue captada por Versadoc 400 MP.



**Tabla M2.** Anticuerpos usados en la técnica de *Western-blot*.

Proteína	µg proteína	Concentración anticuerpo primario	Casa comercial anticuerpo 1 <sup>ario</sup> / referencia	Anticuerpo secundario HRP: Concentración, Casa comercial (referencia)
α-Actina	5	1:20.000	Sigma (A5228)	Anti-ratón 1:40.000, Amersham GE Healthcare (NA931)
SM22α	5	1:10.000	Santacruz (sc-18513)	Anti-cabra 1:25.000, Invitrogen (811620)
α-Tubulina	5	1:5.000	Sigma (T5168)	Anti-ratón 1:15.000, Amersham GE Healthcare (NA931)
Lámina A/C	10	1:10.000	Santacruz (sc-6215)	Anti-cabra 1:40.000, Invitrogen (811620)

Phospho P38	10	1:1.000	Sigma (P1491)	Anti-conejo 1:10.000, Sigma (A0545)
$\beta$ -Actina	5	1:20.000	Sigma (A1978)	Anti-ratón 1:40.000, Amersham GE Healthcare (NA931)
p21	10	1:500	Sigma (P1484)	Anti-ratón 1:10.000, Amersham GE Healthcare (NA931)

### 11. 2. 6. Tinciones asociadas a la técnica de *Western-blot*

PONCEAU-S: esta tinción se usó en membranas de PVDF para comprobar que la transferencia había sido correcta y/o para cortar la membrana para poder incubar una parte con el anticuerpo frente a la proteína de estudio y otra frente al *house-keeping* (proteínas que se expresan de manera constitutiva y sirven para normalizar la carga de proteína). La solución de tinción se preparó disolviendo 0,5 g de Ponceau-S en 1 ml de ácido acético, para llevarlo a 100 ml de agua. Se tiñó la membrana durante 5 minutos y se destiñó para ver únicamente las bandas de proteína, lavándola durante 2 minutos con agua. Una vez cortada se lavó durante 10 minutos con agua para eliminar totalmente la tinción (es una tinción reversible que no inutiliza la membrana). A continuación se incubó con la solución de bloqueo.

COOMASSIE: esta tinción se usó tanto en geles (para comprobar que la transferencia había sido completa) como en la membrana de PVDF (para verificar cualitativamente la carga de proteína equitativa entre pocillos). Se tiñeron membranas y/o geles con 0,1 % de Coomassie azul brillante R en 50 % de metanol durante 5 minutos. La destinción para visualizar únicamente las bandas de proteína se realizó mediante dos lavados con una disolución de 50 % metanol y 10 % ácido acético durante 5 minutos. Se trata de una tinción irreversible por lo que se realizó una vez se había dado uso a gel o membrana y ya podían ser desechados.

## **12. ELISA (ANÁLISIS INMUNOADSORBENTE UNIDO A ENZIMA)**

La técnica de ELISA permite la cuantificación de un determinado antígeno (proteína de interés) en una muestra, a través de una reacción colorimétrica por la unión del antígeno a un anticuerpo primario y la unión de este último a un anticuerpo secundario conjugado con una enzima que cataliza una reacción, dando como resultado un producto final coloreado,

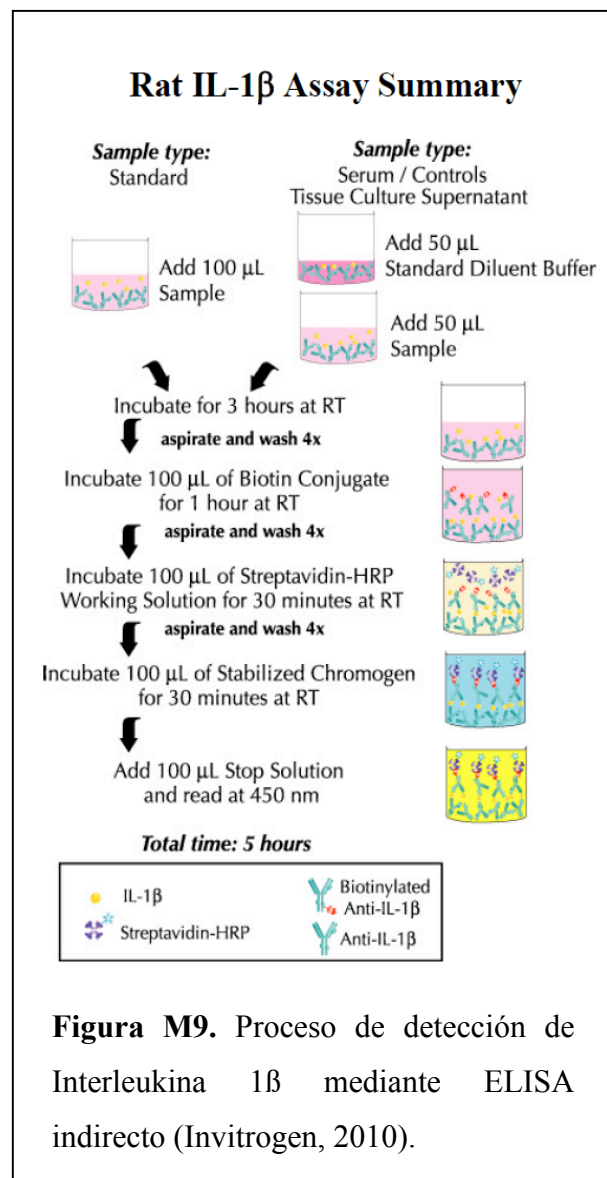
cuya intensidad se determinará por colorimetría, siendo su señal proporcional a la concentración de la proteína. En estos estudios se utilizó la técnica de ELISA sándwich para la cuantificación de interleukina 1 $\beta$  y la técnica de ELISA directa para estudiar el estrés oxidativo.

## 12. 1. MATERIALES, REACTIVOS Y APARATOS

- *Rat IL-1 $\beta$  kit* de Invitrogen (Ref. KRC0011).
- *OxyELISA Oxidized Protein Quantitation Kit* de Millipore (Ref. S7250).
- Espectrofotómetro.

## 12. 2. ELISA SANDWICH: CUANTIFICACIÓN DE INTERLEUKINA 1 $\beta$

La interleukina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) es un mediador de la respuesta inflamatoria. La cuantificación de IL-1 $\beta$  se realizó en el sobrenadante de las células en tratamiento. Se usó el kit de Invitrogen *Rat IL-1 $\beta$*  (Ref. KRC0011). Esta técnica de ELISA sándwich partió de un anticuerpo anti-interleukina 1 $\beta$  inmovilizado (unido al pocillo), sobre el que se añadió la muestra, uniéndose de este modo la IL-1 $\beta$  al anticuerpo inmovilizado. A continuación se añadió un segundo anticuerpo anti-IL-1 $\beta$  unido a biotina, la cual presenta afinidad por la estreptavidina. En un siguiente paso se adicionó una enzima peroxidasa (HRP) unida a estreptavidina, uniéndose ésta a la biotina. En el paso final se añadió un cromóforo, el cual reaccionó con la enzima inmovilizada, dando una coloración proporcional a la presencia de IL-1  $\beta$  (Figura M9).



### 12. 3. ELISA DIRECTO: CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS OXIDADAS (ESTRÉS OXIDATIVO)

Las proteínas pueden ser modificadas por radicales libres de oxígeno y otras especies reactivas, los cuales son producidos con el metabolismo normal de las células durante el transporte electrónico en la mitocondria, en el sistema redox celular, metabolismo de xenobióticos, y con la respuesta inflamatoria (Dalle-Donne y cols., 2006; Weizman y cols., 1990; Babior y cols. 1990; Camello-Almaraz y cols., 2006). La oxidación de las proteínas modifica las cadenas laterales de metionina, histidina y tirosina, formándose enlaces disulfuro con cisteína (Davies y cols., 1987; Uchida y cols., 1990; Heinecke y cols., 1993; Farber y cols., 1983). La oxidación de proteínas catalizada con metales introduce grupos carbonilos (aldehídos y cetonas) en lisina, arginina, prolina o treonina de manera específica (Dalle-Donne y cols., 2006; Davies y cols., 1987; Climent y cols., 1989; Levine, 1983; Oliver, 1987).

Para la detección de estas proteínas oxidadas a partir de proteínas aisladas de VSMC tras su tratamiento correspondiente, se usó el kit *OxyELISA Oxidized Protein Quantitation Kit* de Millipore (Ref. S7250).

La muestra de proteína se inmovilizó en un pocillo por absorción pasiva. Los grupos carbonilos de las cadenas laterales de la proteína fueron derivatizados a 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP-hidrazona) mediante una reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Las proteínas derivatizadas-DNP fueron entonces incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-ratón conjugado con HRP específico para la fracción DNP. Seguidamente se procedió a realizar una incubación con la enzima y el sustrato 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) lo que produjo un producto coloreado, el cual fue cuantificado usando un espectrofotómetro a 450 nm. La cantidad de producto formado es una medida de la actividad peroxidasa dependiente del grado de oxidación proteica.

### **13. PURIFICACIÓN DE RNA**

Para la extracción de RNA total se usaron dos métodos diferentes, en función de la cantidad de RNA que se pretendió conseguir. Los métodos utilizados se basaron en filtrado

con columnas (*GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit* de Sigma (Ref. RTN10)) y en el uso de bolas magnéticas (*ChargeSwitch Total RNA Cell Kit* de Invitrogen (Ref. CS14010)).

Cuando las células se sembraron en placas de 56,7 cm<sup>2</sup> se utilizó el método de filtrado con columnas, mientras cuando se usaron placas de 9,6 cm<sup>2</sup> se utilizó el método de bolas magnéticas.

Para recoger la muestra se procedió a la tripsinización de la placa y recolección de las células en tripsina. A continuación se lavó la placa dos veces con PBS y se añadió a la muestra recogida en tripsina, para recoger las células que no se habían recolectado con la tripsina y a su vez para diluir a esta última. Seguidamente se centrifugaron los tubos en una microcentrífuga a 4 °C durante 10 minutos a 200 g. Se eliminó el sobrenadante y se congeló el pellet a -80 °C hasta su uso. Tras la extracción fue necesario el tratamiento con DNasa para eliminar el DNA, para ello se usó DNasa I recombinante libre de actividad RNasa, adquirida a Roche (Ref. 04 716 728 001).

Cuando la muestra procedió de células sometidas a tratamiento calcificante se procedió directamente al raspado de la placa usando el buffer de lisis del kit de bolas magnéticas. El lisado se congeló a -80 °C hasta su uso. El tratamiento con DNasa está incluido en el proceso de extracción del RNA por lo que no fue necesario el tratamiento post-extracción.

### 13. 1. MÉTODO DE FILTRADO CON COLUMNAS

#### 13. 1. 1. Materiales, reactivos y aparatos

- *GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit*.
- Microcentrífuga a 4 °C.
- Etanol al 70 %.
- DNasa I.

#### 13. 1. 2. Procedimiento

EXTRACCIÓN: Las células fueron lisadas y homogeneizadas en un tampón que contenía isotiocianato de guanidina para asegurar la desnaturalización de macromoléculas e inactivar RNasas. La adición de etanol y la centrifugación de la mezcla causó la unión del



RNA a una membrana de sílice, unida al tubo de centrifuga. El lavado eliminó los contaminantes y el RNA fue eluído.

ELIMINACIÓN DEL DNA CON DNasa I: La DNasa I recombinante procede de páncreas bovino y es expresada en *Pichia pastoris*. Esta DNasa es una endonucleasa específica que hidroliza las uniones fosfodiéster de doble hebra o DNA monohebra, en presencia de cationes divalentes para obtener su máxima actividad. Para eliminar las trazas de DNA presente en la muestra fue necesario el tratamiento posterior con DNasa I, durante 15 minutos a temperatura ambiente, tras esta incubación se adicionó EDTA (concentración final 2,5 mM) e incubó durante 10 minutos a 75 °C y se mantuvo a 4 °C hasta su uso o congelada a -80 °C para su almacenamiento. En cada reacción se trató 1 µg de RNA.

## 13. 2. MÉTODO DE BOLAS MAGNÉTICAS

### 13. 2. 1. Materiales, reactivos y aparatos

- *ChargeSwitch Total RNA Cell Kit* de Invitrogen (Ref. CS14010).
- MagnaRack.
- Baño de agua a 60-70 °C.

### 13. 2. 2. Procedimiento

Este método se basa en el uso de una superficie de carga dependiente del pH del tampón.

A las células lisadas recogidas en el tampón de lisis se le adicionaron bolas magnéticas y tampón de unión a las mismas en condiciones de bajo pH, lo que da a las bolas magnéticas carga positiva. Ello provoca la unión de los ácidos nucleicos cargados negativamente. Las proteínas u otros contaminantes no se unieron y se lavaron con tampones acuosos. Para eluir los ácidos nucleicos la carga de la superficie fue neutralizada al aumentar el pH por encima de 8,5 usando un tampón de baja concentración salina. Durante el procedimiento se realizó el tratamiento con DNasa para eliminar el DNA. La muestra se mantuvo a 4 °C hasta su uso o congelada a -80 °C para su almacenamiento.

## **14. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN Y CALIDAD DEL RNA EXTRAÍDO**

La concentración del RNA total fue determinada espectrofotométricamente, la calidad fue determinada espectrofotométricamente y mediante el uso de geles de agarosa.

### 14. 1. CUANTIFICACIÓN DE RNA

El DNA extraído se diluyó 1:20 en agua DEPC y se midió su absorbancia a 260 y 280 nm usando cubetas de cuarzo.

Una absorbancia de 1,0 a 260 nm corresponde a aproximadamente 40 µg/ml de RNA. El ratio de absorbancias entre 260 y 280 nm debe encontrarse entre 1,8 y 2,1.

### 14. 2. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DEL RNA

Se usó un gel de agarosa al 1 %, en presencia de MOPS 1 X y formaldehído al 1,85 %. Las muestras se preparan en MOPS al 0,5 %, formaldehido al 6 % y formamida al 10 %. Se calentaron durante 10 minutos a 65 °C y posteriormente se añadió el tampón de carga (concentración final 10 %). El tampón de carga se preparó con MOPS a 1 X.

La electroforesis se llevó a cabo a 70-100 voltios constantes durante 1 hora y 30 minutos. Tras la electroforesis se realizaron dos lavados de 10 minutos cada uno para eliminar el formaldehído, el cual provoca fluorescencia. A continuación se incubó con bromuro de etidio durante 10 minutos y seguidamente se visualizó con luz ultravioleta con un GelDoc 1000.

## **15. RETROTRANSCRIPCIÓN DEL RNA EXTRAÍDO**

El RNA total extraído fue retrotranscrito para obtener cDNA, el cual se cuantificó mediante PCR en tiempo real.

Para retrotranscribir el RNA se usó el kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* de Roche (Ref. 04 379 012 001).

Se usó el cebador *Anchored*-oligo(dT)<sub>18</sub>, el cual es específico de RNA poli(A)<sup>+</sup> y recomendado para el posterior análisis por PCR en tiempo real.

#### 15. 1. PROCEDIMIENTO

La mezcla de la reacción consistió en: tampón, inhibidor de RNasas, mezcla de dNTPs, agua para biología molecular, Oligo(dT)<sub>18</sub> y RTasa (enzima que lleva a cabo la retrotranscripción). Las concentraciones usadas fueron las indicadas por la casa comercial.

Los parámetros a los que fue sometida cada muestra en el termociclador fueron: 30 minutos a 55 °C, 5 minutos a 85 °C y mantenimiento a 4 °C hasta su uso (o congelación a -20 °C para su almacenamiento).

### **16. CUANTIFICACIÓN DEL cDNA MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL**

Para cuantificar el cDNA obtenido por retrotranscripción se usó el kit *LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I* de Roche (Ref. 12 239 264 001).

Este kit lleva a cabo una PCR *hot start* en capilares de 20 µl, la cual mejora la especificidad y sensibilidad de la PCR (Chou y cols., 1992; Kellogg y cols., 1994) minimizando la formación de productos de amplificación no-específicos en el comienzo de la reacción, en el periodo de calentamiento del termociclador, al pasar por la temperatura de anillamiento. En la PCR *hot-start* la reacción comienza cuando se alcanzan 95 °C, debido a que antes no se encuentran presentes la polimerasa o el cloruro de magnesio, lo que se puede conseguir mediante varias técnicas, en este caso mediante el uso de anticuerpos anti-polimerasa. Al alcanzar los 95 °C los anticuerpos anti-polimerasa se inactivan por desnaturalización y la polimerasa puede actuar.

La *FastStart* Taq DNA polimerasa es una forma modificada químicamente de la Taq DNA polimerasa recombinante termoestable, inactiva a menos de 75 °C. La enzima es completamente activa a 95 °C al eliminar los grupos bloqueantes en un paso de pre-incubación.

La señal detectable por el termociclador es la fluorescencia obtenida al intercalarse el *SYBR Green I* en la doble hélice de DNA. El incremento de la fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de doble hebra DNA generada.

#### 16. 1. PROCEDIMIENTO

La mezcla de la reacción consistió en: agua para biología molecular,  $MgCl_2$  a concentración final 3 mM, cebadores a concentración final 0,5  $\mu M$  y *SYBR Green* (conteniendo Taq DNA polimerasa) y 2  $\mu l$  de cDNA procedente de la retrotranscripción (la cual partía de 1  $\mu g$  de RNA).

Los parámetros utilizados fueron los siguientes:

- Pre-incubación: 1 ciclo
  - 95 °C, 15 s, 20 °C/s (*Ramp Rate*)
- Amplificación: 40 ciclos
  - 95 °C, 10 s, 20 °C/s
  - 55 °C, 5 s, 20 °C/s
  - 72 °C, 10 s, 20 °C/s, modo de adquisición *single*
- Curva de fusión (*melting curve*): 1 ciclo
  - 95 °C, 0 s, 20 °C/s
  - 65 °C, 15 s, 20 °C/s
  - 95 °C, 0 s, 20 °C/s, modo de adquisición continuo
- Enfriamiento: 1 ciclo
  - 40 °C, 30 s, 20 °C/s

Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

- ARP:  
5'-CACCTTCCCCTGGCTGAA-3', 5'-CCTCCGACTCTTCCTTTGC-3'
- GADPH:  
5'-TCCAGTATGACTCTACCCACG-3', 5'-CACGACATACTCAGCACCAG-3'
- SM22a:

5'-CAGACTGTTGACCTCTTTGAAG-3', 5'-TCTTATGGTCCTGGGCTTC-3'

- Calponina:

5'-TCCGCACACTTTAACCGAG-3' 5'-ATCCATGAAGTTGCTCCCG-3'

- MGP:

5'-AACACCTTTATATCCCCTCAGC-3', 5'-GCGTTGTACCCGTAGATCAG-3'

- BMP2:

5'-GTTCTGTCCCTACTGATGAG-3', 5'-ATTCGGTGCTGGAAACTAC-3'

- CBFA1:

5'-GTCCAAGTGTAGGTGTGTTTAC-3',

5'-AATCAGAAGCAAGTACACCAATC-3'

- Msx2:

5'-TGAACCTTACAGAAACCCAGG-3', 5'-GTTGATAGGGAAGGGCAGAC-3'

## **17. CUANTIFICACIÓN DE LA CALCIFICACIÓN**

Para cuantificar el grado de calcificación, tanto de VSMCs como de las aortas de las ratas en tratamiento, se usó el kit *Calcium Assay Kit* de Abnova (Ref. KA1644). Se basó en la tinción con fenolsulfoneptaleína, la cual forma específicamente un complejo muy estable con calcio libre dando color azul. La intensidad del color medida a 612 nm es directamente proporcional a la concentración de calcio en la muestra.

La extracción del calcio dependió de la muestra a analizar:

- Cultivo celular: las células se lavaron dos veces con PBS y a continuación se adicionaron 150 µl de HCl 0,6 N por pocillo y se incubaron durante 12-16 horas a 4 °C. Tras esta incubación se recogió la muestra en un tubo eppendorf, por raspado de la placa, y se centrifugó a 12.000 g durante 5 minutos.
- Aorta: se extrajo la aorta y se fijó con paraformaldehído al 4 % en PBS a 4 °C durante 2 horas. Tras la fijación se lavó con PBS y se secó (ligero secado colocándola sobre papel de

filtro). A continuación se introdujo en un tubo eppendorf de 1,5 ml con 0,5 ml de HCl 0,6 N y se incubó durante 24 horas a 37 °C. Tras esta incubación el tubo se sometió a vorteador y se centrifugó a 12.000 g durante 5 minutos.

La cuantificación se llevó a cabo por medición de la absorbancia utilizando para ello microplacas de 96 pocillos. En cada pocillo se depositaron 2,5 µl de la muestra (duplicados) y a ésta se le adicionaron 100 µl de la mezcla de la reacción (obtenida por mezcla 1:1 de los reactivos A y B). Se incubó la mezcla durante 3 minutos y se procedió a su medida espectrofotométricamente a 612 nm. Para la cuantificación del calcio fue necesaria la preparación de una recta de calibrado con calcio estándar. A cada uno de los estándar se les sustrajo el valor de absorbancia del blanco y se obtuvo la recta enfrentando la absorbancia (A) contra la concentración de Ca<sup>+2</sup>. La pendiente de la recta se obtuvo por regresión lineal y la concentración de calcio de la muestra fue calculada como:

$$\frac{A_{muestra} - A_{blanco}}{pendiente} = \frac{mg}{dl}$$

## **18. TINCIONES ASOCIADAS A CALCIFICACIÓN**

Se usaron dos tinciones diferentes para las muestras calcificadas, tinción de von Kossa para aortas y rojo de Alizarina tanto para aortas como para VSMCs.

### 18. 1. TINCIÓN DE VON KOSSA

Este método fue desarrollado por von Kossa, 1901. La muestra es tratada con nitrato de plata, el fosfato se reduce y bajo luz fuerte es reemplazado por depósitos de plata, visualizados como depósitos de color negro.

#### 18. 1. 1. Materiales, reactivos y aparatos

- Formaldehído al 4 %.
- Nitrato de plata al 5 %, adquirido a Sigma (Ref. 209139).
- Sodio tiosulfato al 5 %, adquirido a Sigma (Ref. 72049).

- Rojo nuclear rápido, adquirido a Sigma (Ref. N3020).
- Microscopio.

### 18. 1. 2. Procedimiento

La aorta se fijó durante 2 horas con paraformaldehído al 4 % y se congeló hasta su uso. Previamente a su uso se embebió en OCT y se realizaron cortes con un grosor de 7  $\mu\text{m}$  a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , los cortes se adhirieron a portaobjetos tratados con silano.

Los cortes se incubaron con nitrato de plata al 5 % durante 1 hora bajo una lámpara de 60 vatios. El portaobjetos se colocó sobre papel de aluminio para que reflejara la luz. Finalizada la incubación se procedió a realizar tres lavados de los cortes con agua destilada y seguidamente se incubaron con tiosulfato de sodio al 5 % durante 5 minutos para reducir la plata no unida. Para eliminar la disolución se lavó con agua destilada y se tiñeron durante 5 minutos con rojo nuclear rápido. Finalizada la incubación se lavó con agua y se procedió al montaje, con medio de montaje adecuado para tejidos.

## 18. 2. TINCIÓN DE ROJO DE ALIZARINA

El rojo de alizarina se une al calcio formando un compuesto de color rojo fuerte.

### 18. 2. 1. Materiales, reactivos y aparatos

- Rojo de Alizarina, adquirido a Fluka (Ref. 05600).
- Metanol al 100 %.
- $\text{NH}_3$  (ajuste del pH).
- pHmetro.
- Microscopio.

### 18. 2. 2. Procedimiento

En el caso de las células, éstas fueron fijadas con metanol al 100 % durante 30 minutos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En el caso de la aorta, se fijó y preparó para la tinción como en el caso de la tinción de von Kossa.

A continuación se procedió al lavado con agua y se añadió la solución de tinción, rojo de alizarina al 0,5 % a pH 4,1-4,3, con la que se incubó durante 15 minutos. Finalizada la

incubación se lavó con agua para eliminar los restos de tinción.

La tinción celular se observó al microscopio sin procesamiento posterior, las aortas adheridas a portaobjetos se montaron con medio de montaje adecuado para tejidos y se observaron al microscopio.

## **19. ANÁLISIS CRISTALOGRÁFICO**

La composición y estructura de los depósitos correspondientes a la calcificación de VSMCs fue caracterizada con un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM, MERLIN™ de Carl Zeiss) equipado con un sistema de espectroscopia de energía dispersiva (EDS) INCA-350 (Oxford Instruments) y mediante un microscopio electrónico de transmisión (TEM, JEOL 2000FXII) equipado con un sistema de microanálisis INCA-200 (Oxford Instruments).

El análisis de los depósitos mediante SEM se realizó en fragmentos del fondo de los pocillos cubiertos con platino. Estos fragmentos fueron adheridos al soporte del microscopio usando cintas de carbono. Se utilizaron dos tipos de detectores: 1) InLens, el cual capta electrones secundarios y da una buena resolución topográfica de la superficie; y 2) AsB, el cual capta electrones retrodispersados y que ofrece una buena imagen de la composición y de la orientación cristalina.

En el análisis realizado con TEM, cada muestra se preparó por raspado del fondo del pocillo, picado y dispersión con etanol en un mortero. Sobre rejillas recubiertas de carbono, se colocó una gota de la muestra y se dejó evaporar.

## **20. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis de datos se realizó con el programa informático GraphPad Prism 5. La significación de las diferencias se estableció mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía, y el post-test de Tukey para comparaciones múltiples. El grado de significancia fue de  $\alpha=0,05$  (95 % intervalos de confianza).





## **IV. RESULTADOS**

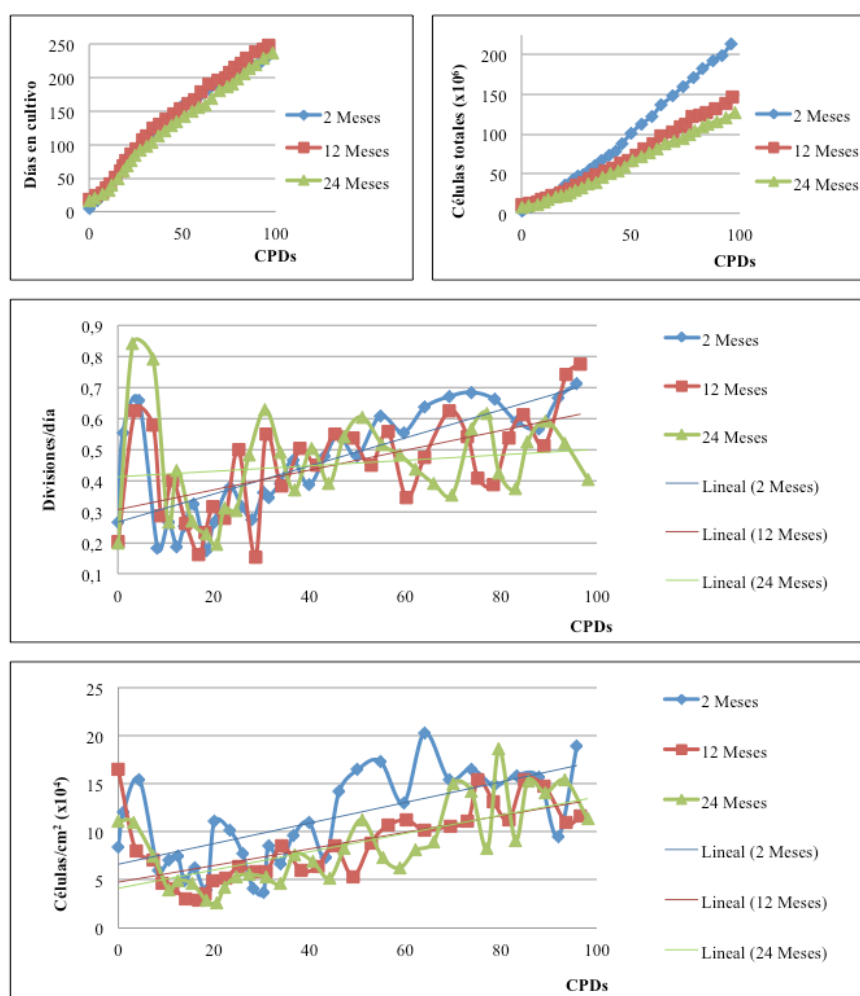


## PARTE I. ENVEJECIMIENTO DE LAS VSMCs

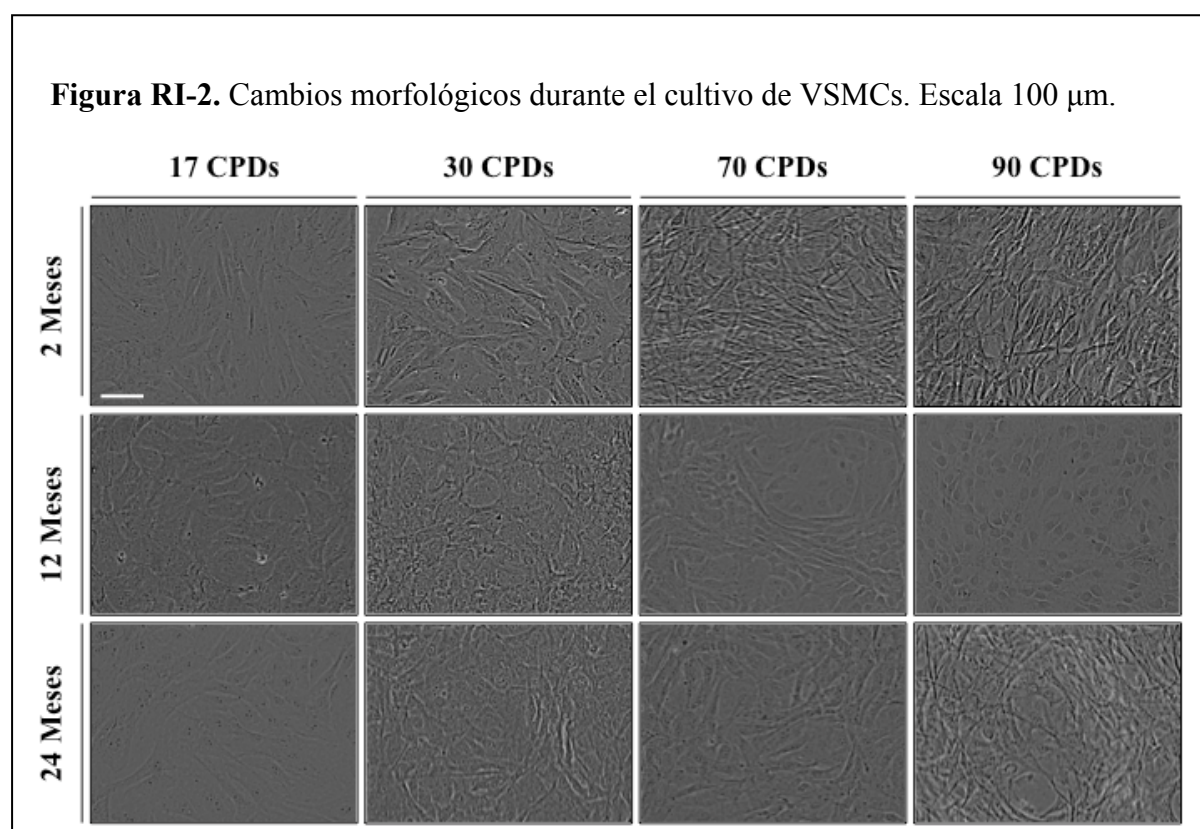
### I. A. ENVEJECIMIENTO CELULAR Y DESDIFERENCIACIÓN DE VSMCs

1. Evolución de los cultivos primarios.- En este estudio por el momento todavía no se ha llegado al cese total de la multiplicación de VSMCs para ninguna de las tres líneas. Cabe destacar que no hay ninguna referencia bibliográfica sobre el número de CPDs a las que las VSMCs de rata cesan su multiplicación. Como se observa en la figura RI-1, durante 250 días en cultivo, e independientemente de la edad del animal donante, se alcanzó el mismo número de divisiones acumuladas (CPDs-*cumulative population doublings*). El número de células totales acumuladas en ese periodo fue menor conforme aumentó la edad del animal donante. Lo mismo ocurrió con el número de divisiones por día y las células/cm<sup>2</sup>.

**Figura RI-1.** Gráficas de crecimiento de VSMCs durante el cultivo.



2. Indicadores de envejecimiento de las células en cultivo.- Un indicador de senescencia es la **morfología**. Como se puede observar en la figura RI-2, en el caso de las células de donantes de 2 y 24 meses, a medida que las células acumularon divisiones predominaron las células con apariencia fibroblástica, principalmente a partir de 70 CPDs. En las VSMCs extraídas de donantes de 12 meses a 17 y 30 CPDs la apariencia fue similar a las extraídas de donantes de 2 y 24 meses, sin embargo a 70 CPDs en las VSMCs extraídas de donantes de 12 meses se observaron dos poblaciones celulares claramente diferenciadas, una población de apariencia fibroblástica y otra con cierto parecido a las células endoteliales (morfología de estos tipos celulares en la figura RI-3), no apareciendo estas últimas en las otras líneas, para finalmente desaparecer por completo la población de morfología fibroblástica a 90 CPDs.



**Figura RI-3.**

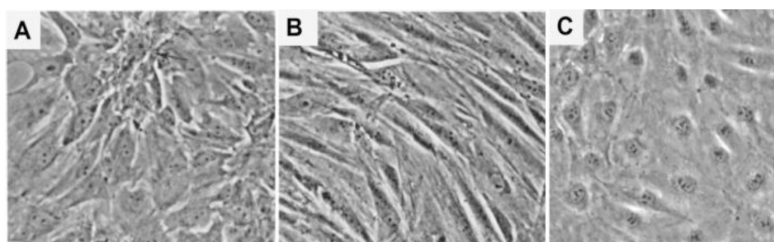
**A. VSMCs.**

**B. Fibroblastos.**

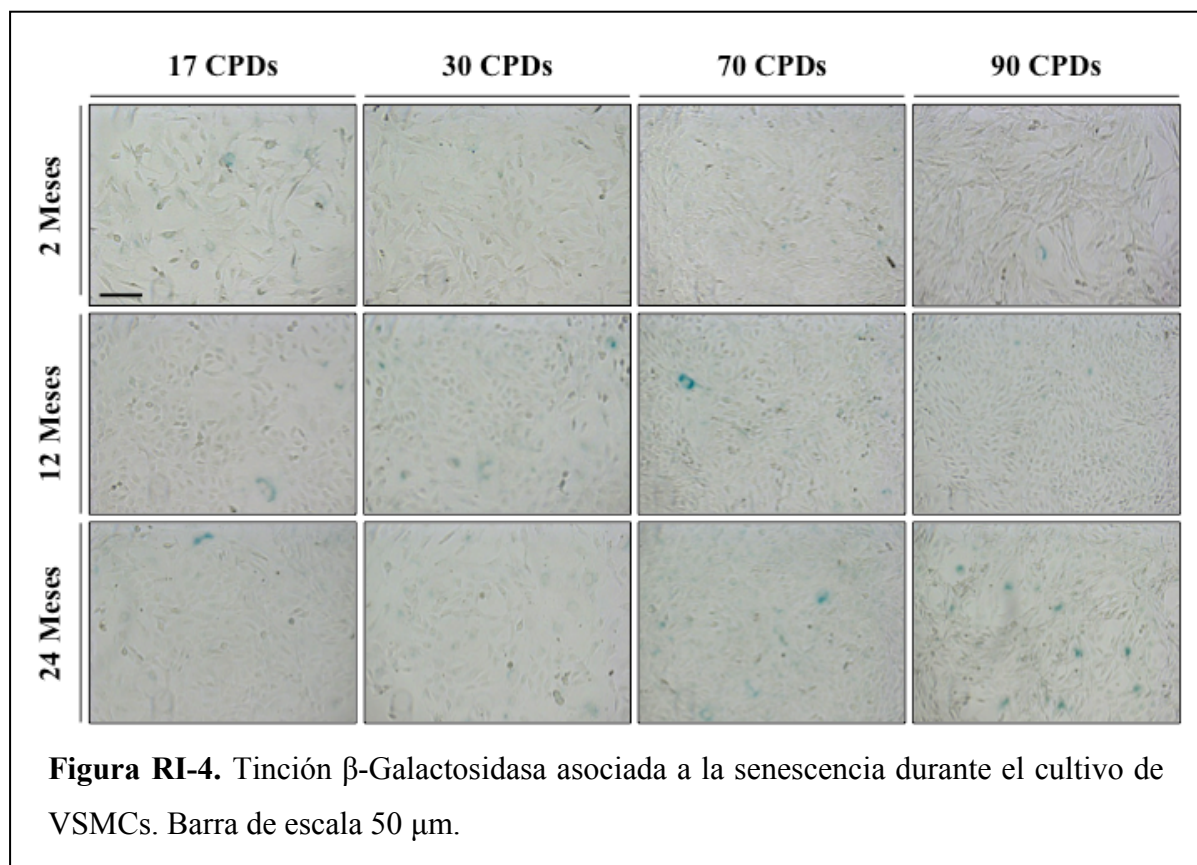
(Ross y col., 1980).

**C. Células endoteliales**

(Innoprot, 2012).

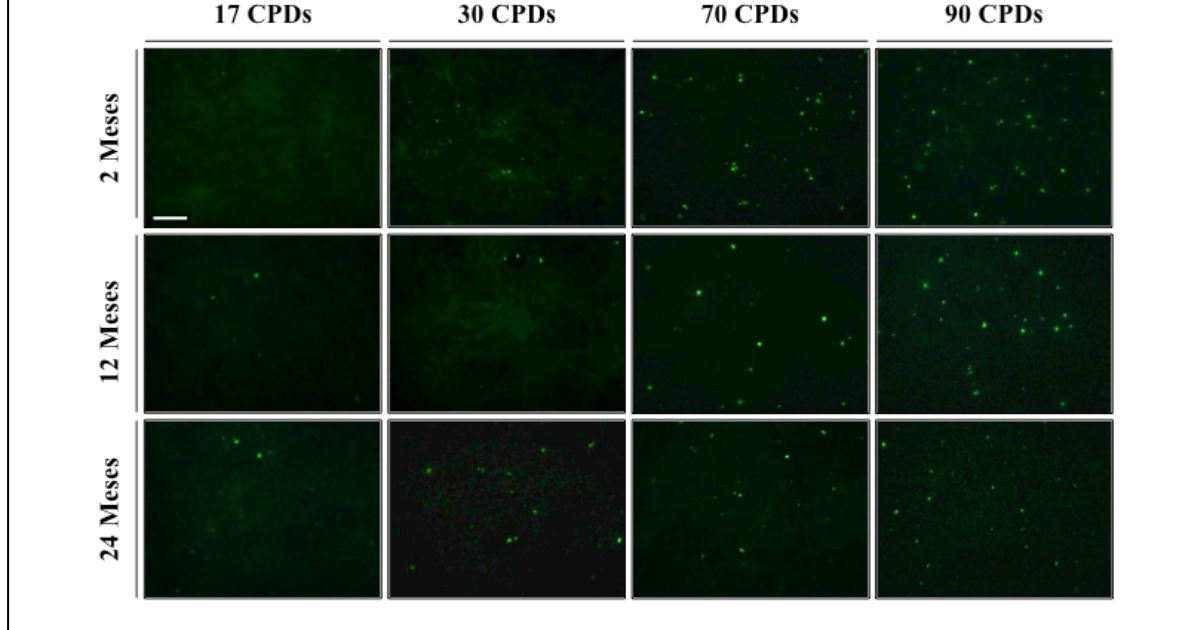


Otro bioindicador de senescencia es la actividad  $\beta$ -galactosidasa (ver Material y Métodos). En células extraídas de ratas de 24 meses con 90 CPDs apareció una leve tinción positiva para  $\beta$ -galactosidasa a pH 6, lo cual es indicativo del inicio del proceso de senescencia (Figura RI-4).

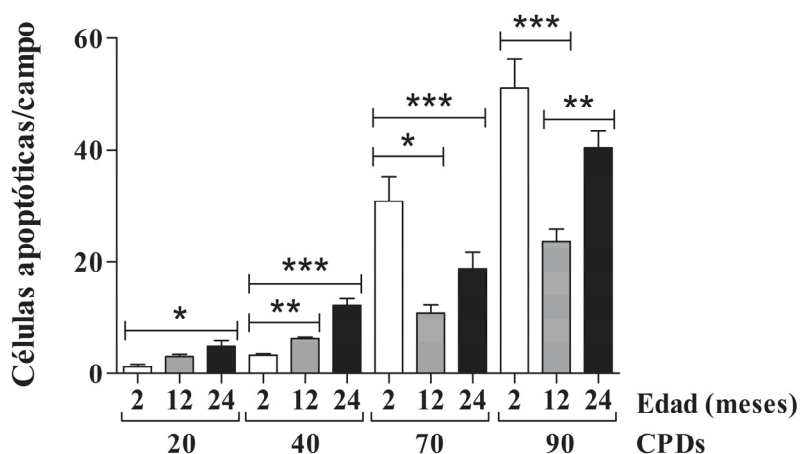


Otra característica de envejecimiento es el incremento de la apoptosis con la edad. Para determinar el grado de apoptosis se utilizó la técnica fluorescente de TUNEL (Figura RI-5). A divisiones tempranas, 17 y 30 CPDs, la apoptosis fue mayor en las células extraídas de animales de 12 y 24 meses frente a las de animales de 2 meses (Figura RI-5), aunque únicamente apareció una diferencia significativa entre células extraídas de animales de 2 y 24 meses (Figura RI-6). En todos los casos, para estas divisiones, el número de células apoptóticas se mantuvo en valores mínimos. A partir de 70 CPDs (Figura RI-5 y 6) las células de animales de 2 meses presentaron mayor apoptosis que las de 12 y 24 meses. En el caso de células extraídas de animales de 12 y 24 meses, sin embargo, se siguió manteniendo el incremento de apoptosis con la edad del donante y las divisiones dentro de su propia línea.

**Figura RI-5.** Imágenes representativas de apoptosis (técnica de TUNEL) durante el cultivo de VSMCs. Barra de escala 100  $\mu$ m.



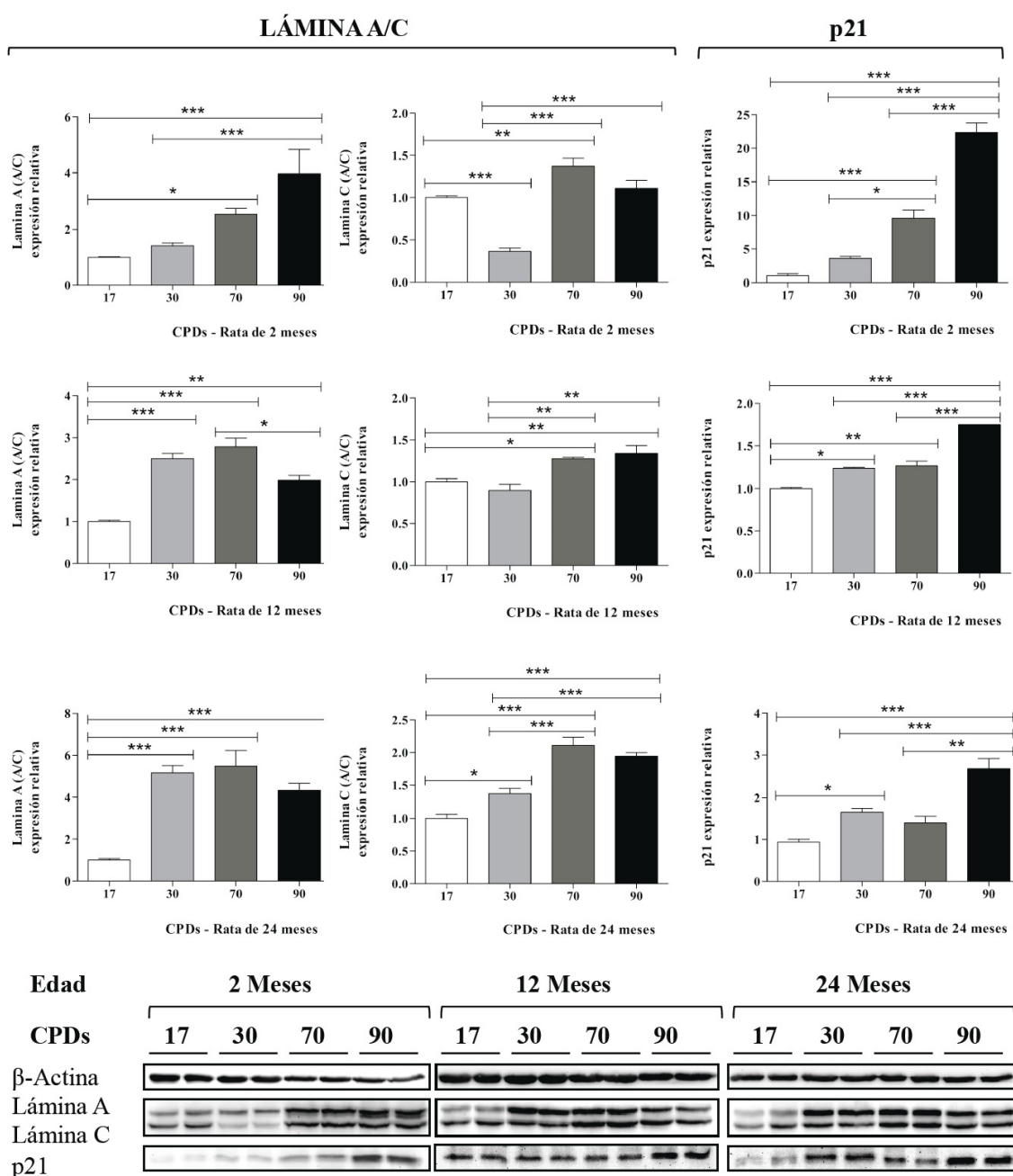
**Figura RI-6.** Cuantificación de células apoptóticas (técnica de TUNEL) durante el cultivo de VSMCs.



Para determinar el grado de envejecimiento de las células a lo largo del cultivo, además de la tinción de  $\beta$ -galactosidasa, se cuantificó la expresión de otros marcadores de senescencia, como lámina A/C y p21, para los donantes de diferentes edades.

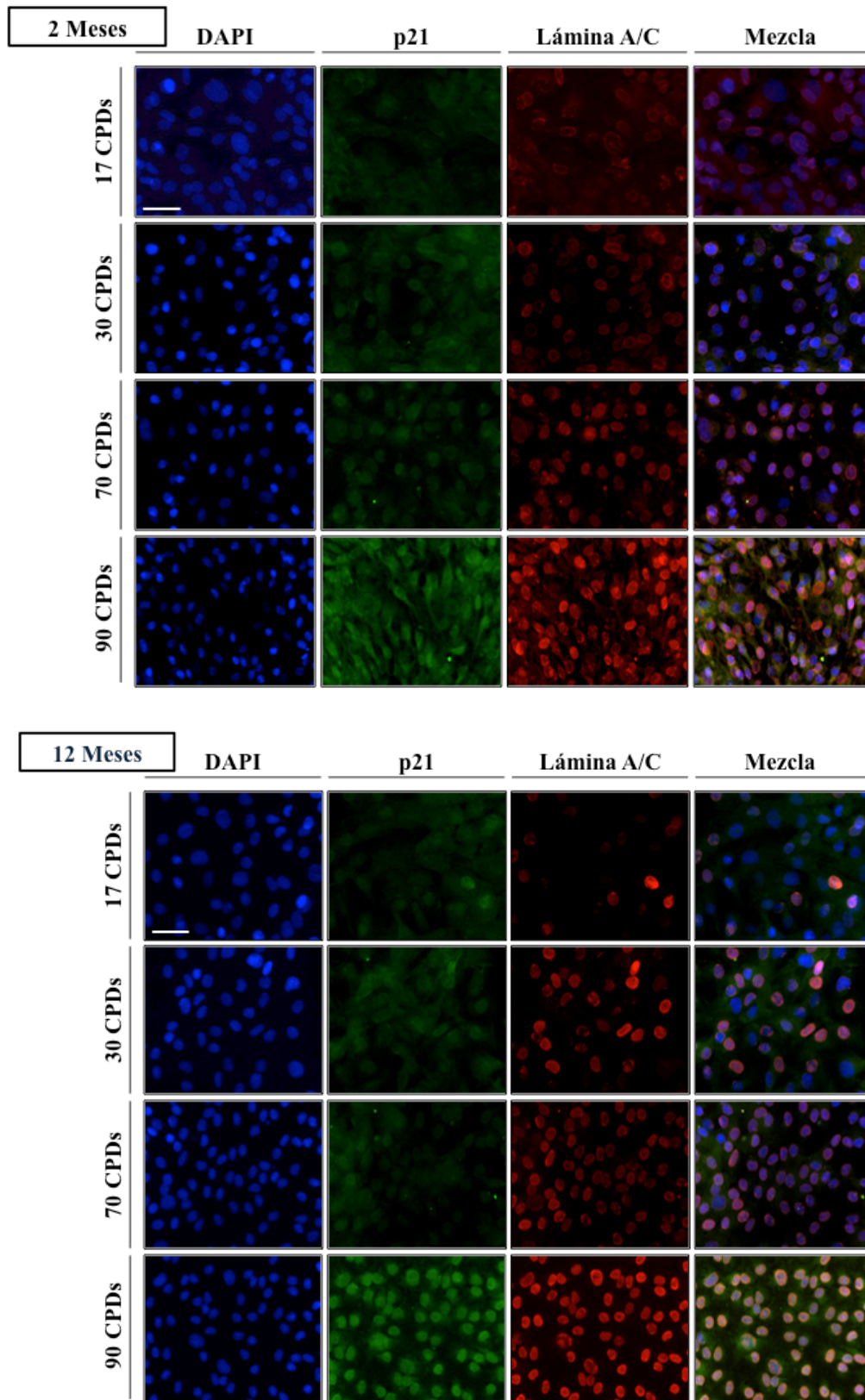
Para todas las VSMCs extraídas de donantes de distintas edades se incrementó la expresión de lámina A/C y p21 de forma significativa, a medida que las células acumularon divisiones. Esto se observó con las dos técnicas utilizadas, *western-blot* (Figura RI-7) y microscopía inmunofluorescente (Figura RI-8 A y B). Se observaron diferencias significativas prácticamente entre todas las divisiones, en todas las edades de donante estudiadas.

**Figura RI-7.** Expresión de marcadores de senescencia (Lámina A/C y p21) durante el cultivo de VSMCs en función de las divisiones acumuladas.

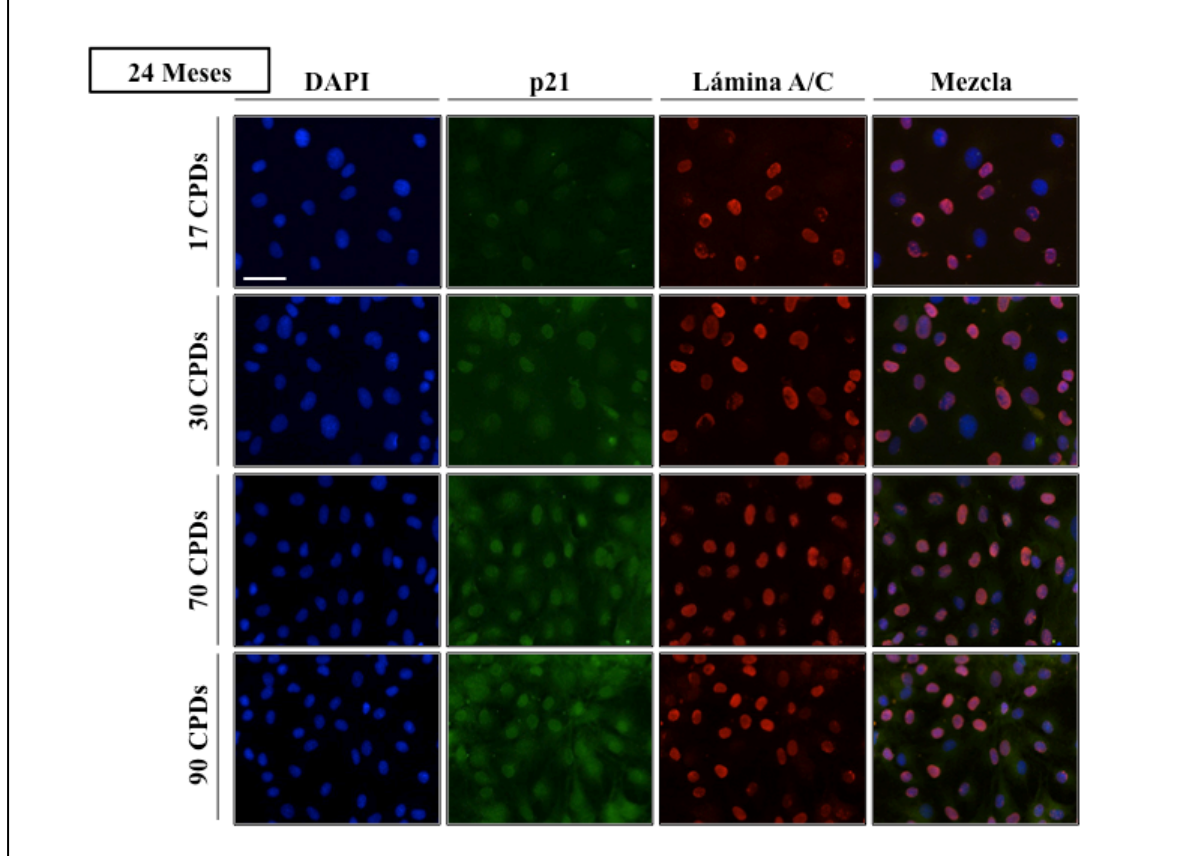




**Figura RI-8A.** Inmunofluorescencia de marcadores de senescencia (Lámina A/C y p21) durante el cultivo de VSMCs de donantes de 2 y 12 meses de edad en función de las divisiones acumuladas. Barra de escala 50  $\mu$ m.



**Figura RI-8B.** Inmunofluorescencia de marcadores de senescencia (Lámina A/C y p21) durante el cultivo de VSMCs de donantes de 24 meses de edad en función de las divisiones acumuladas. Barra de escala 50  $\mu$ m.

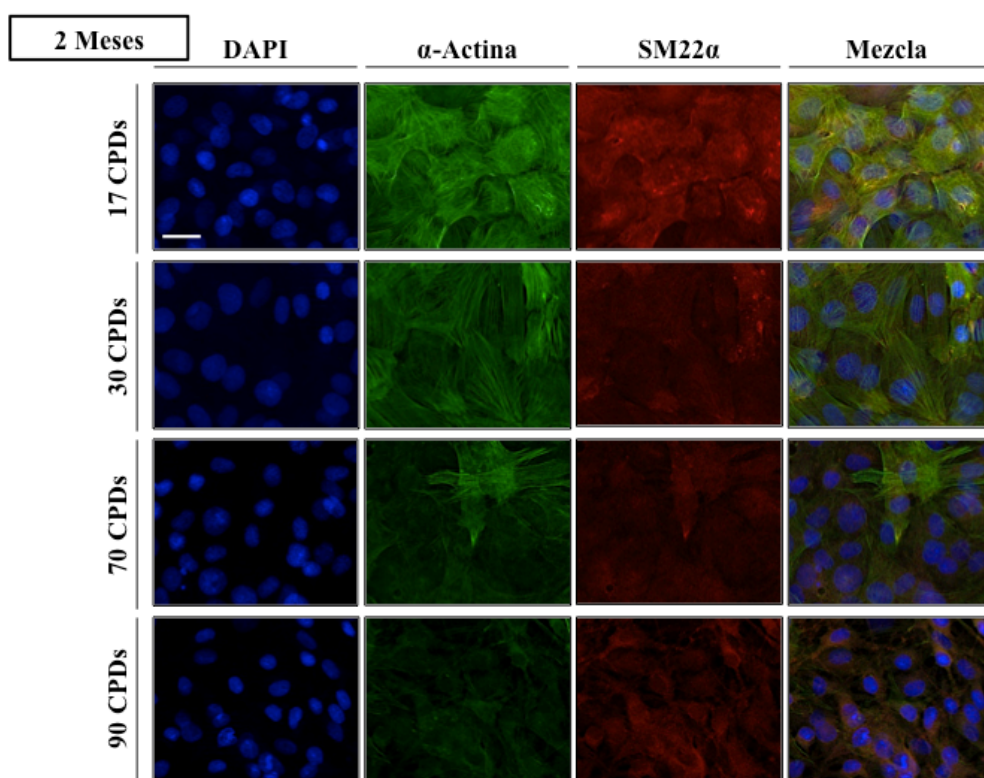


3. Cambios en la expresión de indicadores de células de musculatura lisa vascular.- Se ha observado como las VSMCs en cultivo reflejan cambios fenotípicos a lo largo del cultivo (entre otros, Shanahan y cols., 1993 y Nakano-Kurimoto y cols., 2009).

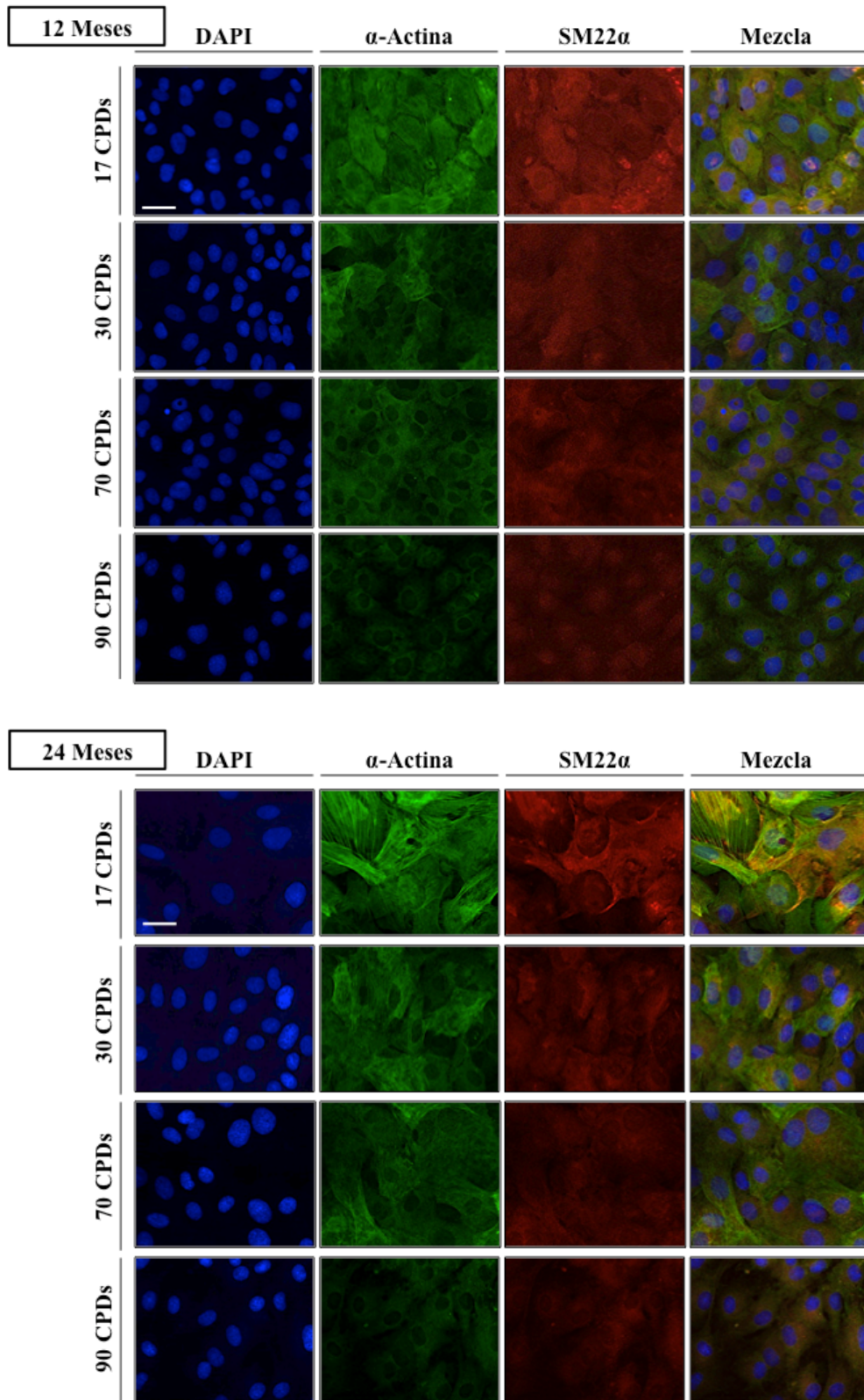
En la figura RI-10 se puede observar como, con respecto a la expresión de los marcadores  $\alpha$ -actina y SM22 $\alpha$ , las VSMCs de donantes de 2, 12 y 24 meses mostraron diferencias significativas entre todas las CPDs. Una excepción fue el donante de 12 meses entre 17 y 30 CPDs para  $\alpha$ -actina, y en expresión de RNA de SM22 $\alpha$  entre 20 y 40 CPDs de donantes de 12 y 24 meses. En el caso de RNA, esto podría ser debido a que la expresión del RNA específico no se vea disminuida, pero sí la de la proteína, por ejemplo por una traducción reducida o que la proteína tenga una vida media menor.

Estos resultados a su vez se corresponden con lo observado por inmunofluorescencia (Figura RI-9 A y B).

**Figura RI-9 A.** Inmunofluorescencia de marcadores de músculo liso ( $\alpha$ -actina y SM22 $\alpha$ ) durante el cultivo de VSMCs de donantes de 2 meses de edad en función de las divisiones acumuladas. Barra de escala 25  $\mu$ m.

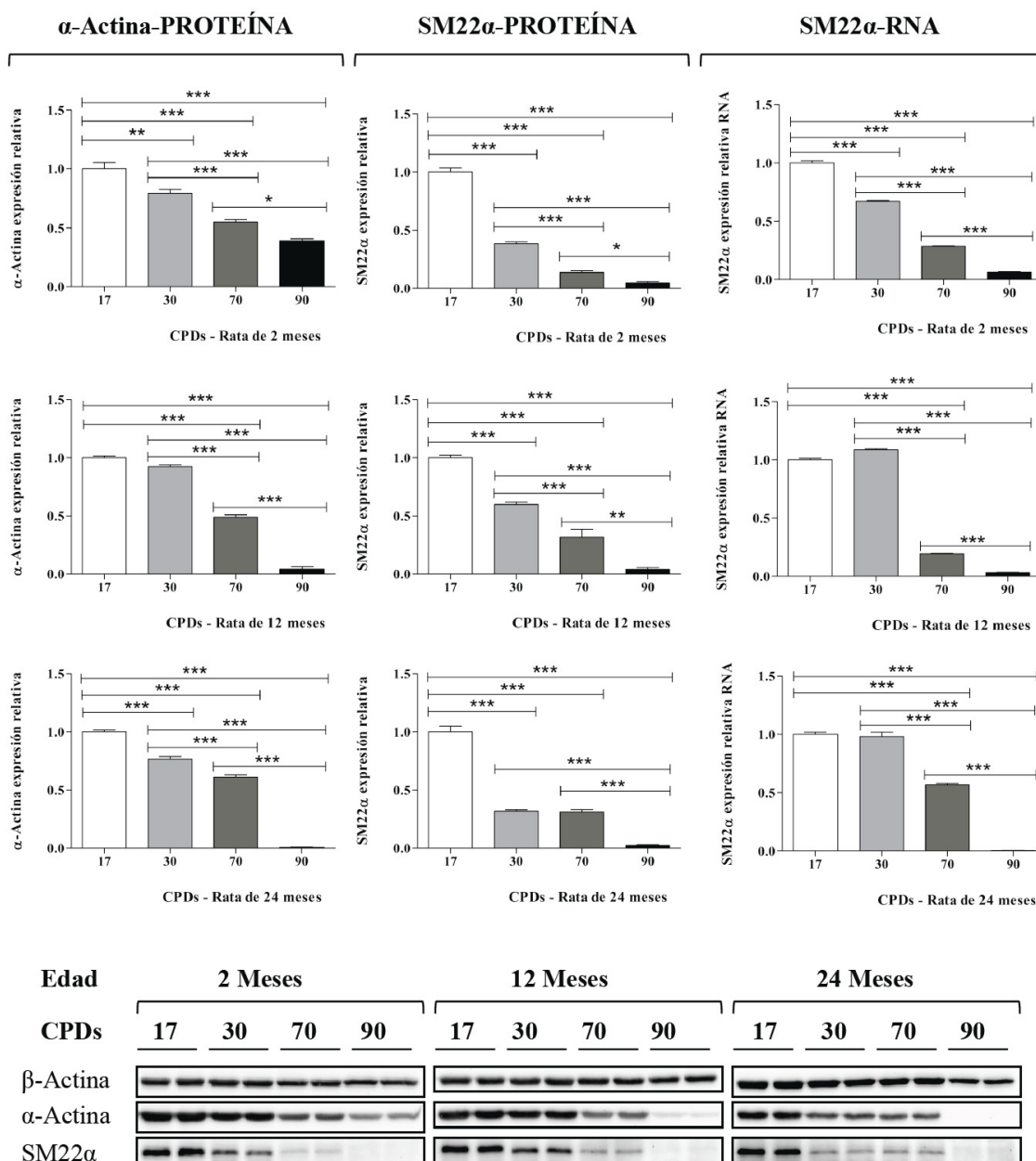


**Figura RI-9 B.** Inmunofluorescencia de marcadores de músculo liso ( $\alpha$ -actina y SM22 $\alpha$ ) durante el cultivo de VSMCs de donantes de 12 y 24 meses de edad en función de las divisiones acumuladas. Barra de escala 25  $\mu$ m.





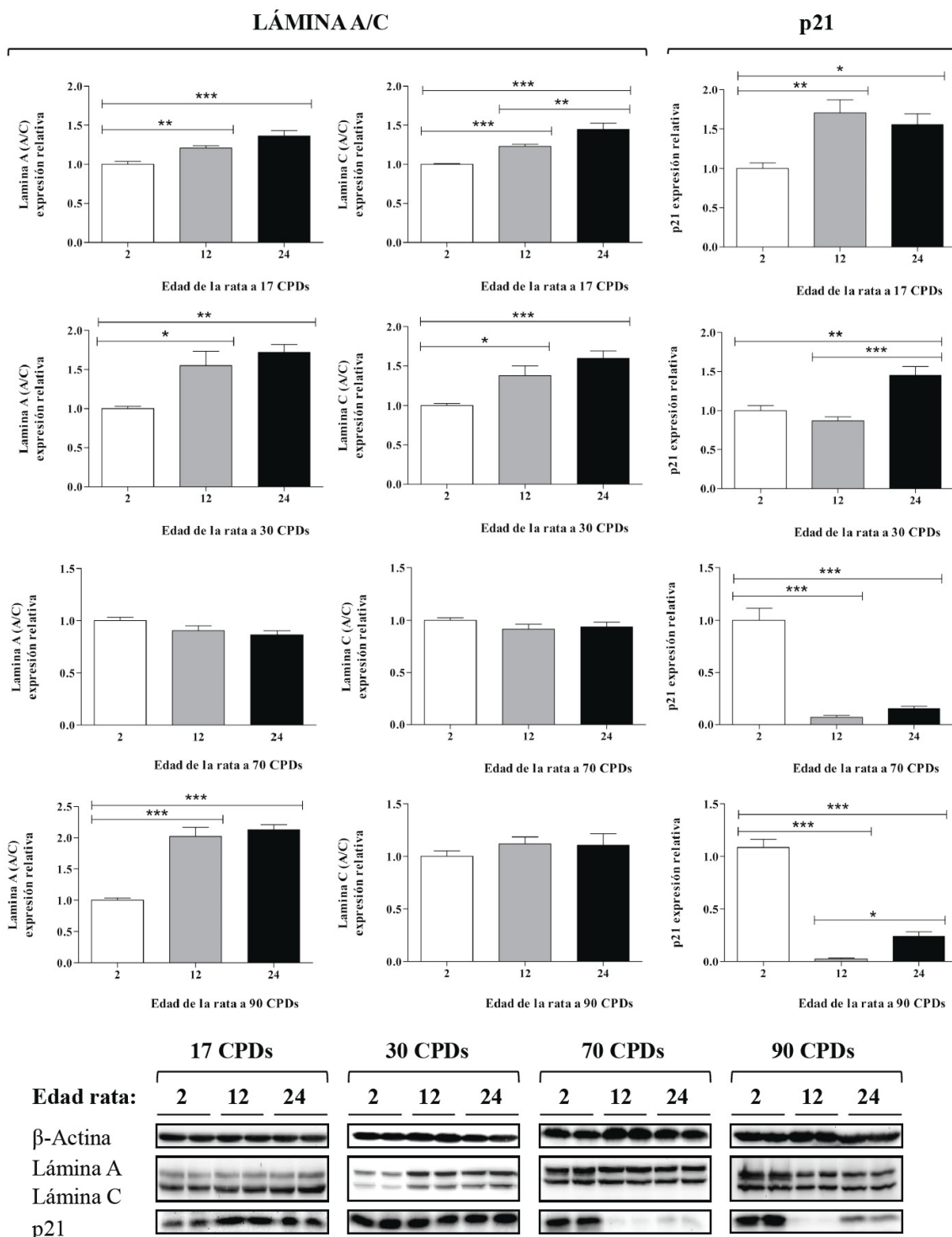
**Figura RI-10.** Expresión de marcadores de músculo liso ( $\alpha$ -actina y SM22 $\alpha$ ) durante el cultivo de VSMCs en función de la edad del donante: hay diferencias significativas entre todas las divisiones con excepción de donante de 12 meses entre 17 y 30 CPDs para  $\alpha$ -actina y en expresión de RNA de SM22 $\alpha$  entre 20 y 40 CPDs de donantes de 12 y 24 meses.



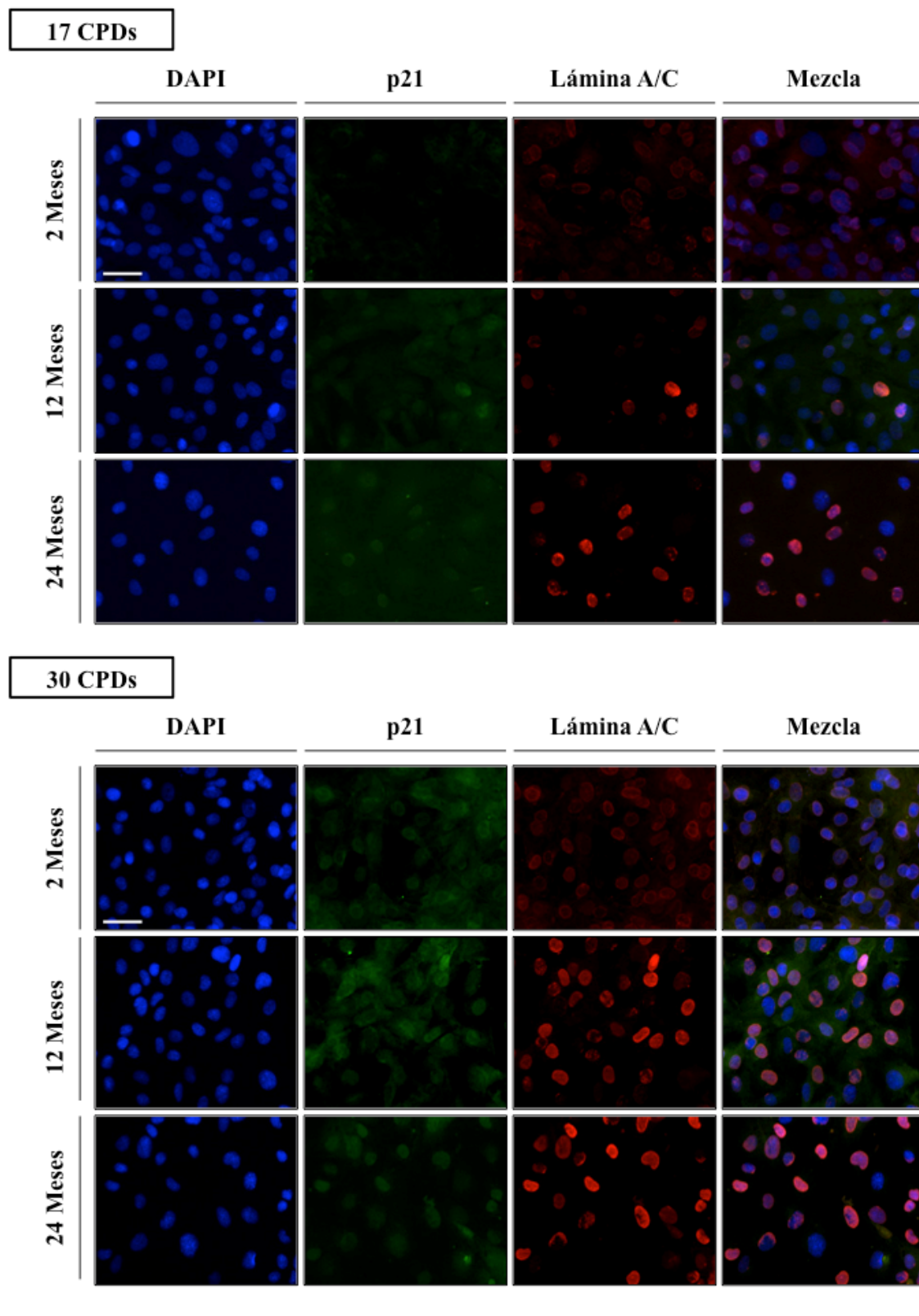
Esta parte del estudio se había realizado para comprobar el comportamiento de las VSMCs a lo largo del cultivo, relacionándolo con el proceso de senescencia.

4. Expresión de indicadores de envejecimiento en función de la edad del animal.- Mediante *western-blot* (Figura RI-11) e inmunofluorescencia (Figura RI-12) se confirmó que en todas las CPDs estudiadas la expresión de lámina A/C se incrementó conforme aumentó la edad del donante. Lo mismo ocurrió con la expresión de p21 con 17 y 30 CPDs. En el caso de 70 y 90 CPDs, sin embargo, la expresión de p21 fue mayor en las VSMCs de donantes de 2 meses que en las de 12 y 24 meses. Cabe destacar que la diferencia de expresión de lámina A/C con las edades de donantes como marcador de senescencia disminuyó conforme se incrementaron las divisiones en cultivo.

**Figura RI-11.** Expresión proteica de marcadores de senescencia (Lámina A/C y p21) durante el cultivo de VSMCs en función de la edad del donante y las divisiones acumuladas.

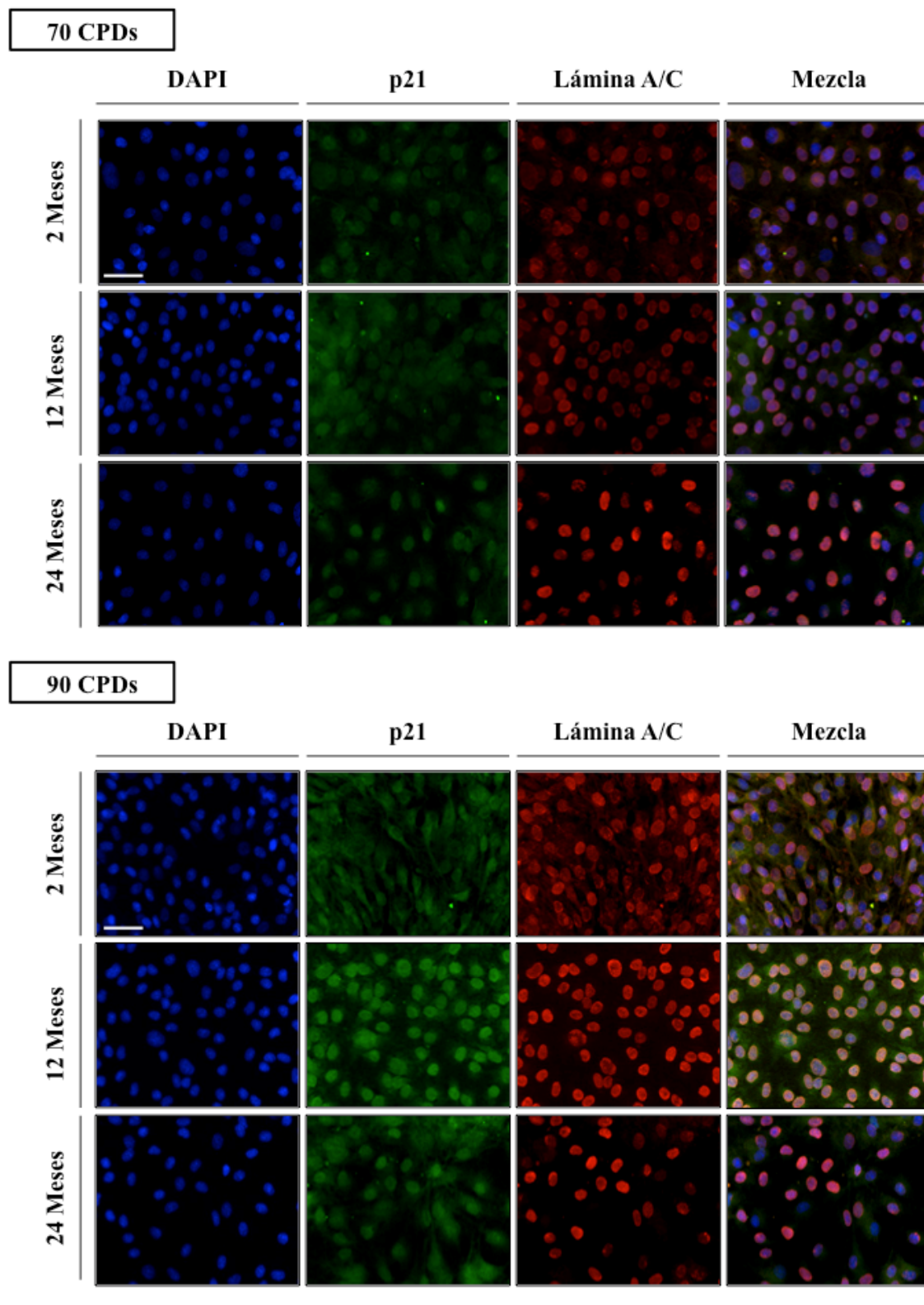


**Figura RI-12 A.** Inmunofluorescencia de marcadores de senescencia (Lámina A/C y p21) durante el cultivo de VSMCs en función de la edad del donante y las divisiones acumuladas: 17 y 30 CPDs. Barra de escala 50  $\mu$ m.





**Figura RI-12 B.** Inmunofluorescencia de marcadores de senescencia (Lámina A/C y p21) durante el cultivo de VSMCs en función de la edad del donante y las divisiones acumuladas: 70 y 90 CPDs. Barra de escala 50  $\mu$ m.

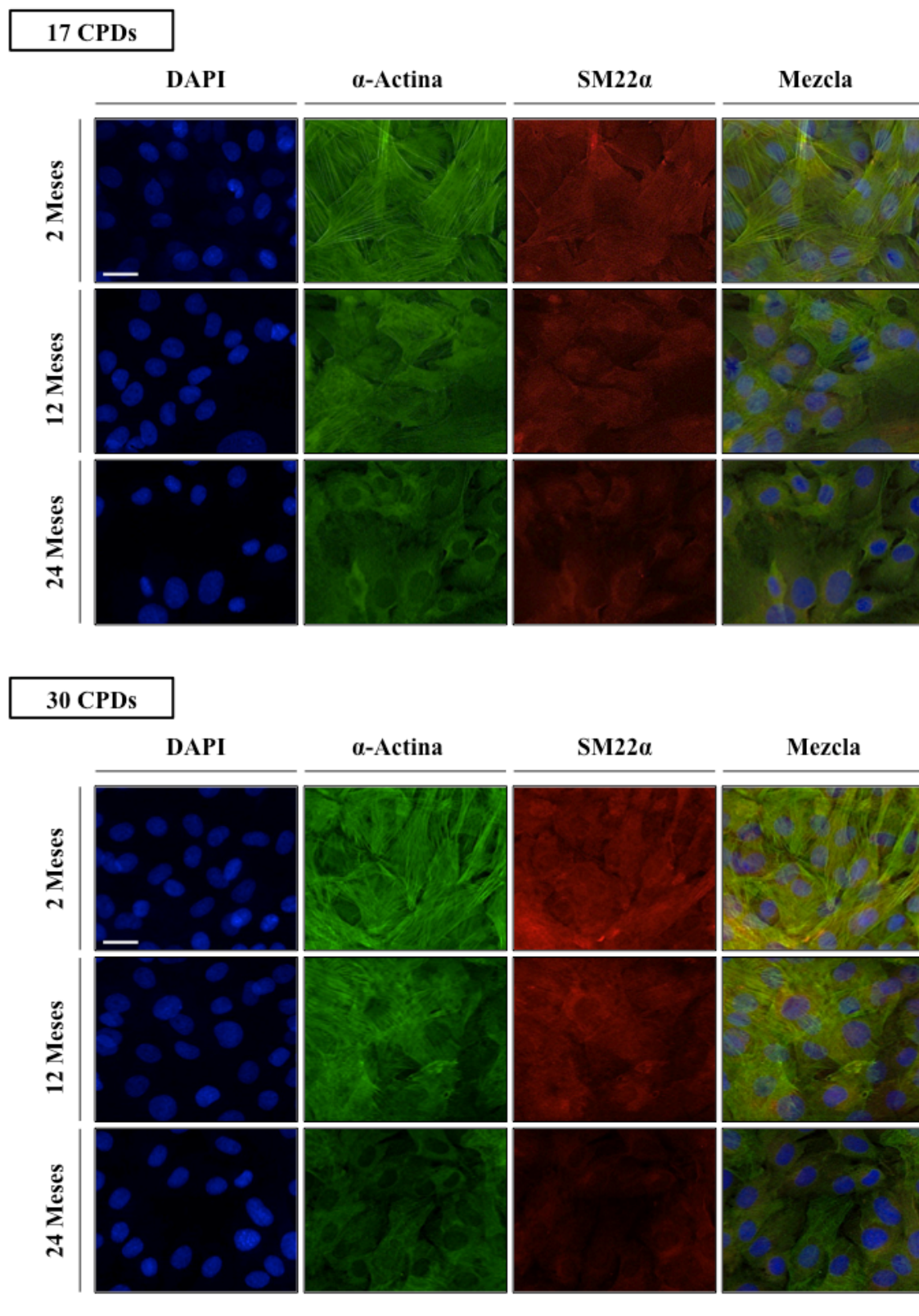


##### 5. Expresión de indicadores de musculatura lisa vascular en función de la edad del animal.-

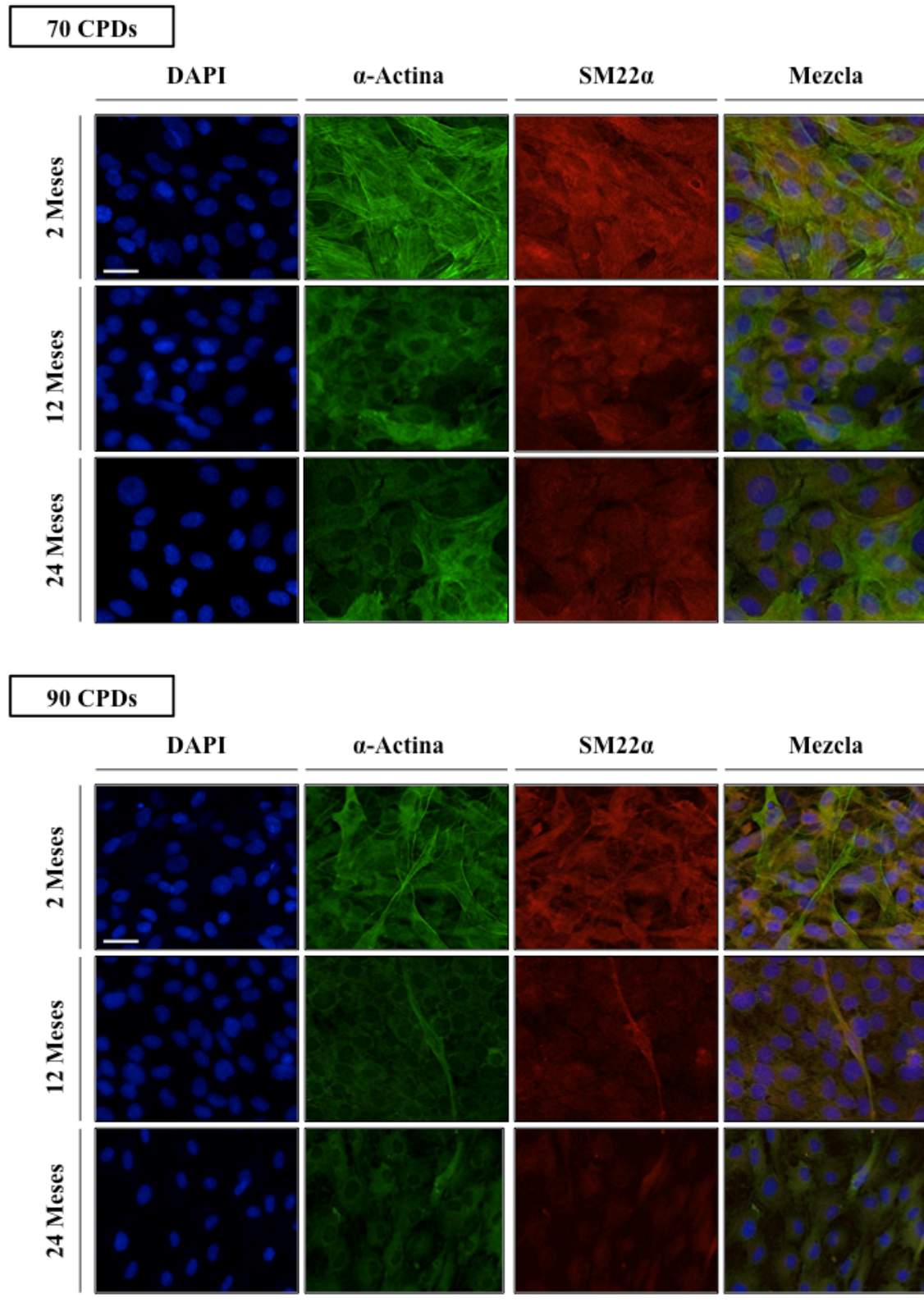
Para confirmar la pérdida de marcadores de VSMC con la edad del donante, se cuantificó la expresión de SM22 $\alpha$  y  $\alpha$ -actina a diferentes edades, en función de las CPDs, mediante inmunofluorescencia (Figura RI-13), *western-blot* y PCR a tiempo real (Figura RI-14). En las primeras divisiones, tanto para RNA como para proteína de estos dos marcadores, no se observaron diferencias entre VSMCs de donantes de 2 y 12 meses. Sin embargo, la diferencia fue significativa entre VSMCs de donantes de 2 meses frente a 24 meses, y lo mismo ocurrió entre donantes de 12 y 24 meses.

Las diferencias de expresión de SM22 $\alpha$  y  $\alpha$ -actina entre VSMCs de donantes 2 y 12 meses se incrementaron significativamente a partir de 70 CPDs, respecto a lo que ocurrió con pocas CPDs. Entre VSMCs de donantes de 2 y 24 meses las diferencias ya eran significativas a divisiones tempranas; haciéndose todavía más marcadas con divisiones más avanzadas, 70 y 90 CPDs. Por otro lado, a divisiones avanzadas disminuyó la diferencia de expresión entre VSMCs de donantes de 12 y 24 meses. Cabe destacar que a 70 CPDs se invierte el patrón de expresión, ya que a éstas CPDs fue menor la expresión de SM22 $\alpha$  y  $\alpha$ -actina para VSMCs de donantes de 12 meses que para donantes de 24 meses. A 90 divisiones se vuelve a invertir el patrón, las células de donantes de 24 meses presentan una menor expresión de marcadores de VSMCs frente a las extraídas de animales de 12 meses.

**Figura RI-13 A.** Inmunofluorescencia de marcadores de músculo liso ( $\alpha$ -actina y SM22 $\alpha$ ) durante el cultivo de VSMCs en función de la edad del donante y las divisiones acumuladas: 17 y 30 CPDs. Barra de escala 25  $\mu$ m.

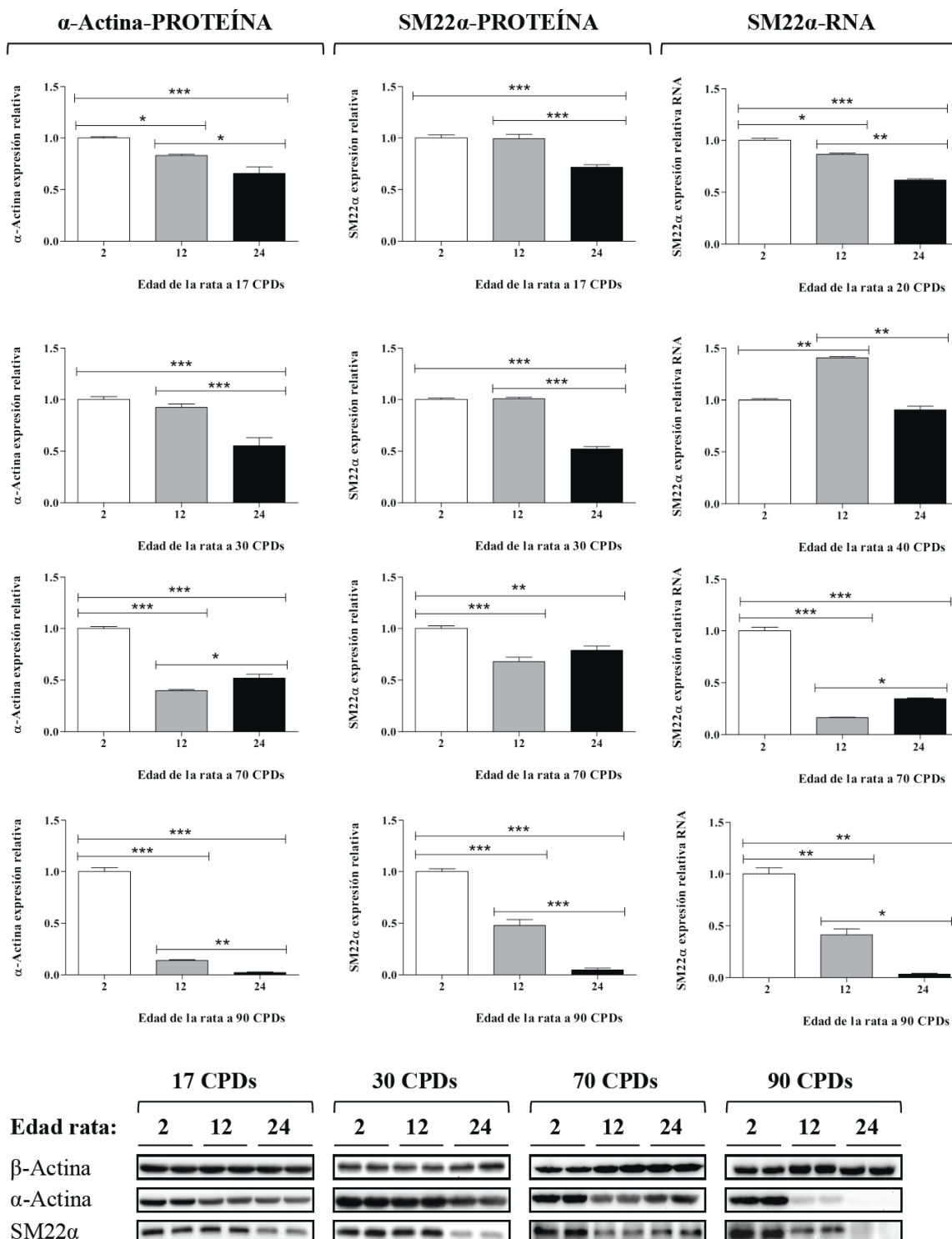


**Figura RI-13 B.** Inmunofluorescencia de marcadores de músculo liso ( $\alpha$ -actina y SM22 $\alpha$ ) durante el cultivo de VSMCs en función de la edad del donante y las divisiones acumuladas: 70 y 90 CPDs. Barra de escala 25  $\mu$ m.



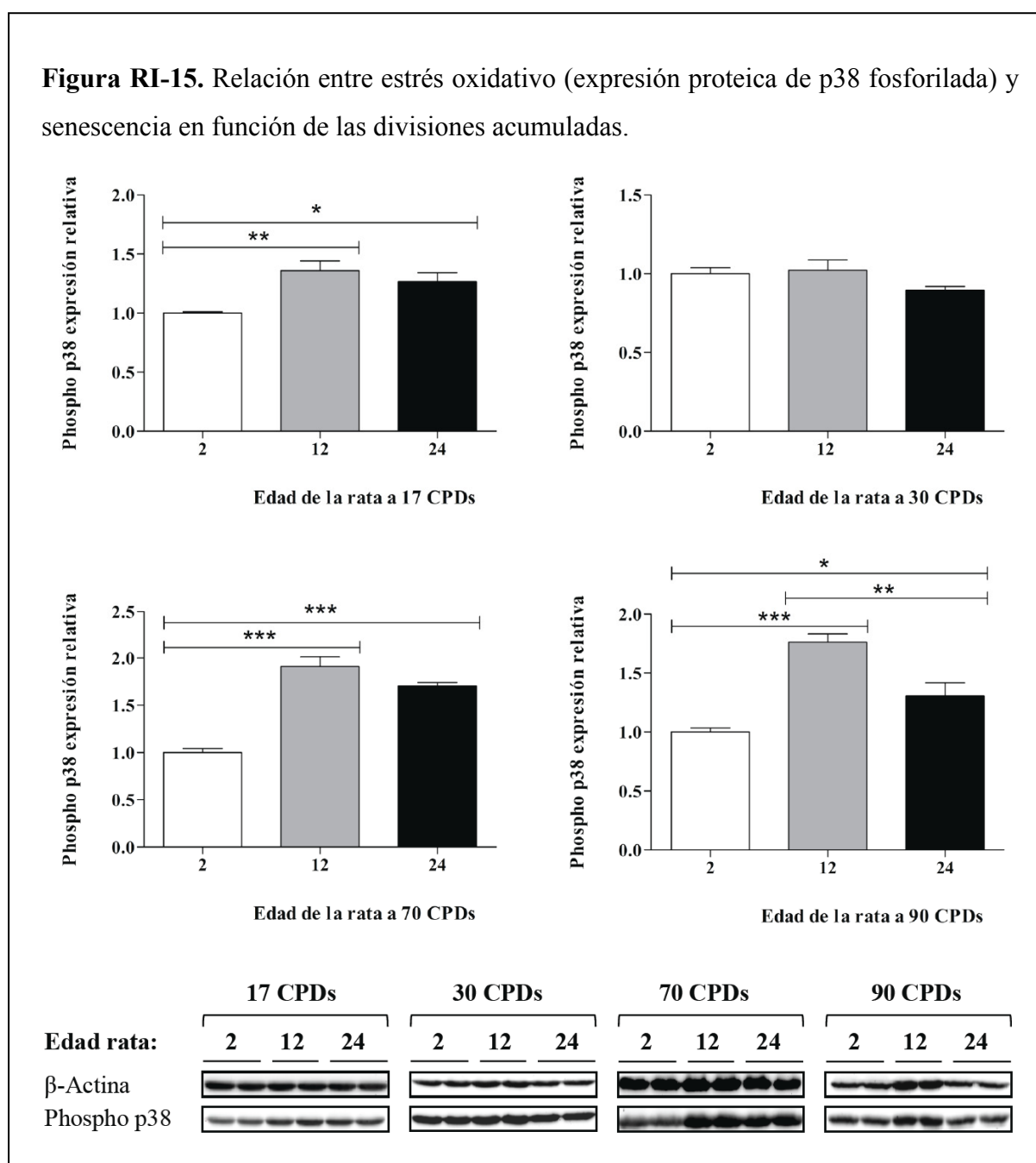


**Figura RI-14.** Expresión de marcadores de músculo liso ( $\alpha$ -actina y SM22 $\alpha$ ) durante el cultivo de VSMCs en función de la edad del donante y las divisiones acumuladas.



I. B. FACTORES IMPLICADOS EN LA SENESCENCIA DE VSMCs

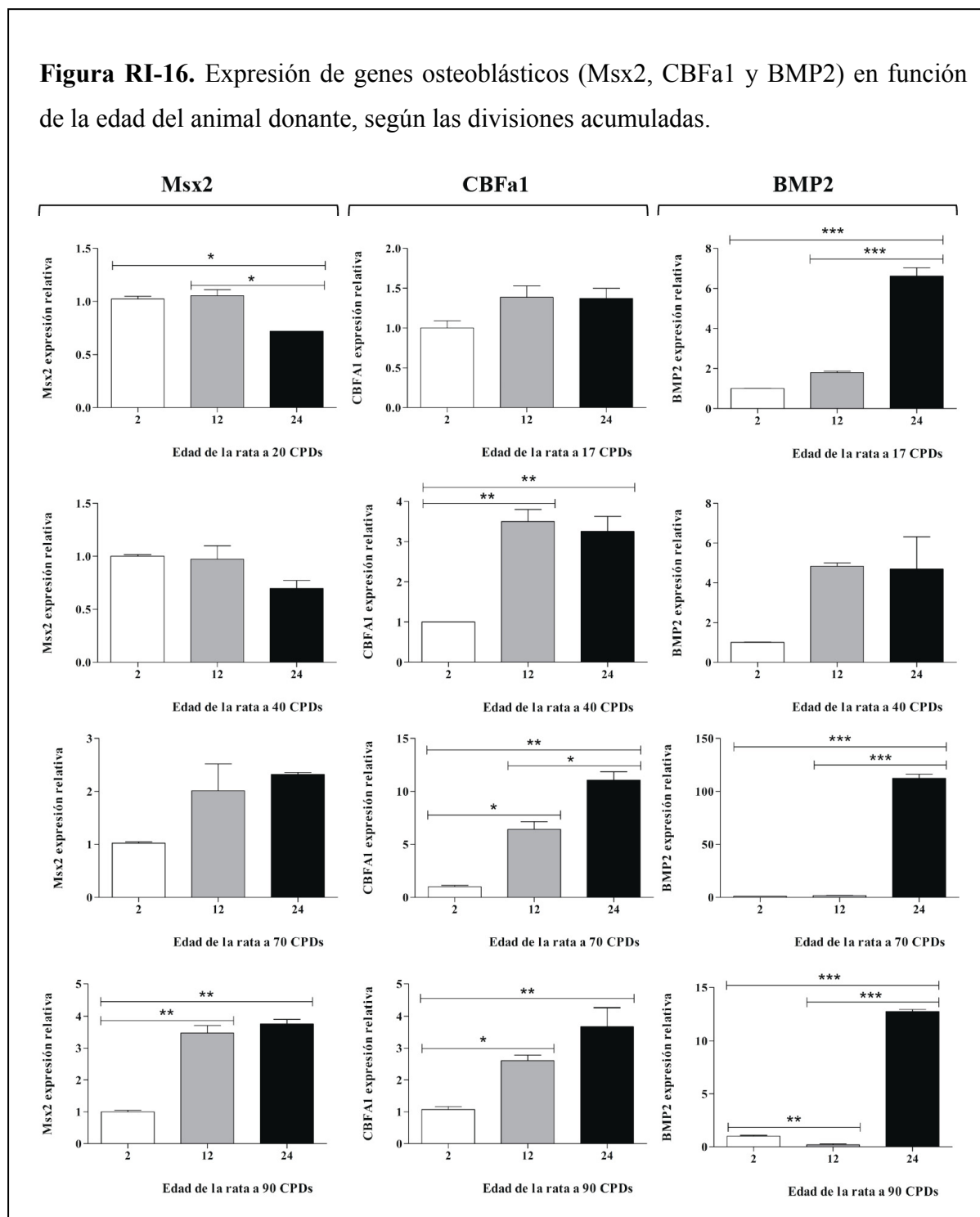
Entre los factores que se piensa que pueden estar involucrados en el proceso de senescencia se encuentra el estrés oxidativo. Para determinar la implicación del mismo se analizó la expresión por *western-blot* de la proteína p38 fosforilada. Como se puede observar en la figura RI-15, las VSMCs extraídas de animales de 12 y 24 meses mostraron mayor expresión de este indicador de estrés oxidativo que las extraídas de animales de 2 meses, tanto a 17 como a 70 y 90 CPDs. A 90 CPDs se incrementó la expresión de p38 de las VSMCs de donantes de 12 meses frente a las de donantes de 24 meses.



## I. C. RELACIÓN ENTRE SENESCENCIA Y CALCIFICACIÓN VASCULAR

1. Expresión de indicadores de calcificación.- Resultados de otros autores indican que las células senescentes presentan una mayor expresión de osteogenes por iniciación de la transición osteoblástica (Shanahan y cols., 1999; Tintut y cols., 2003; Tyson y cols., 2003), lo que provocaría un incremento de la calcificación en células senescentes.

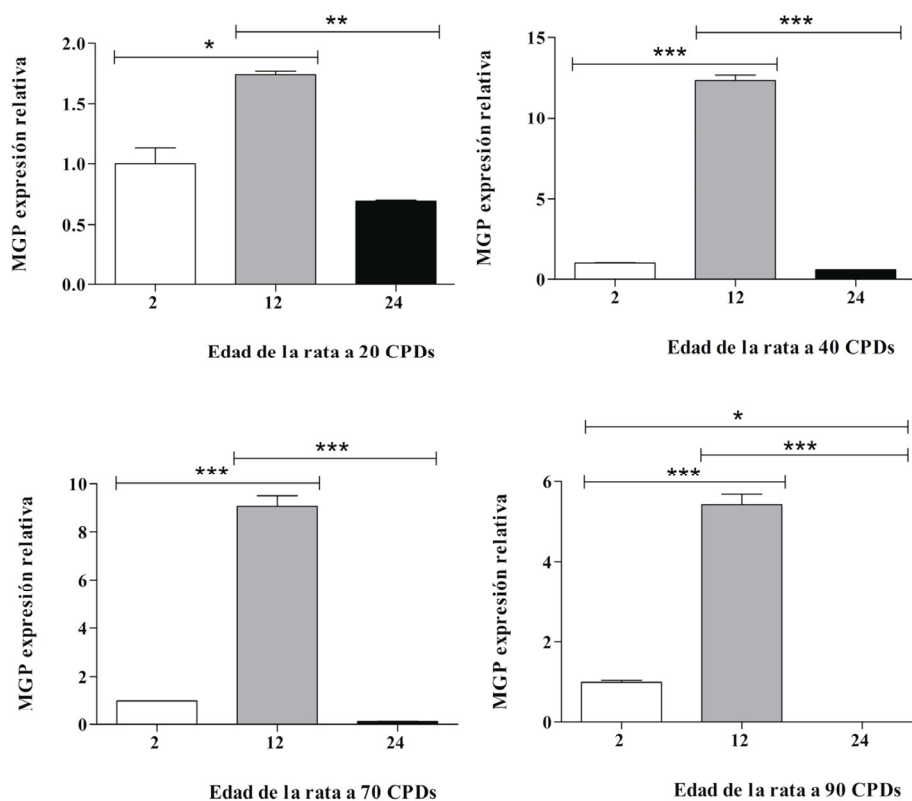
**Figura RI-16.** Expresión de genes osteoblásticos (Msx2, CBFa1 y BMP2) en función de la edad del animal donante, según las divisiones acumuladas.



La Figura RI-16 muestra la existencia de un incremento en la expresión de genes osteoblásticos a medida que se incrementan las CPDs, de forma significativamente superior en las VSMCs extraídas de donantes de 24 y 12 meses frente a las de donantes de 2 meses, tanto para *Msx2* como para *CBFa1*. En el caso de *BMP2*, la expresión fue significativamente superior en las células de donantes de 24 meses frente a las de donantes de 2 y 12 meses desde el principio del cultivo, incrementándose estas diferencias a medida que las células acumularon divisiones en cultivo.

Debido a esta transición osteoblástica sería esperable que las células senescentes tuvieran una menor expresión de MGP, proteína de matriz Gla anticalcificante. En la figura RI-17 se puede observar que las células de ratas de 24 meses presentaron una menor expresión de MGP que las de animales de 2 meses, para todas las divisiones acumuladas. Esta tendencia no se cumplió para las células de donantes de 12 meses de edad.

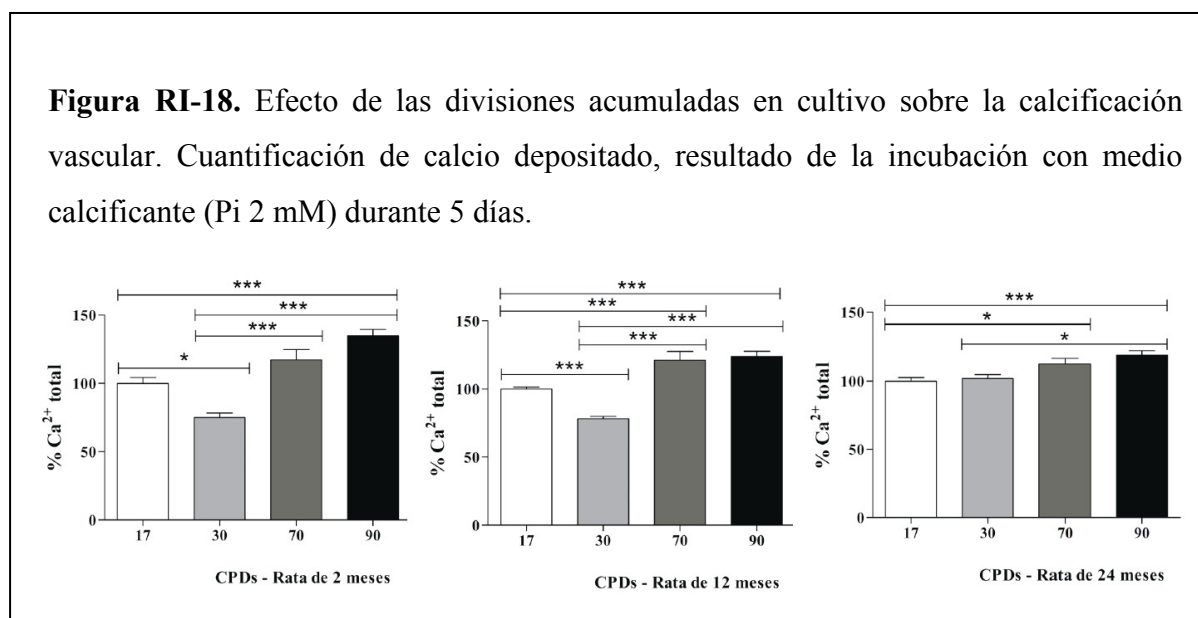
**Figura RI-17.** Expresión de MGP en función de la edad del animal donante, según las divisiones acumuladas.



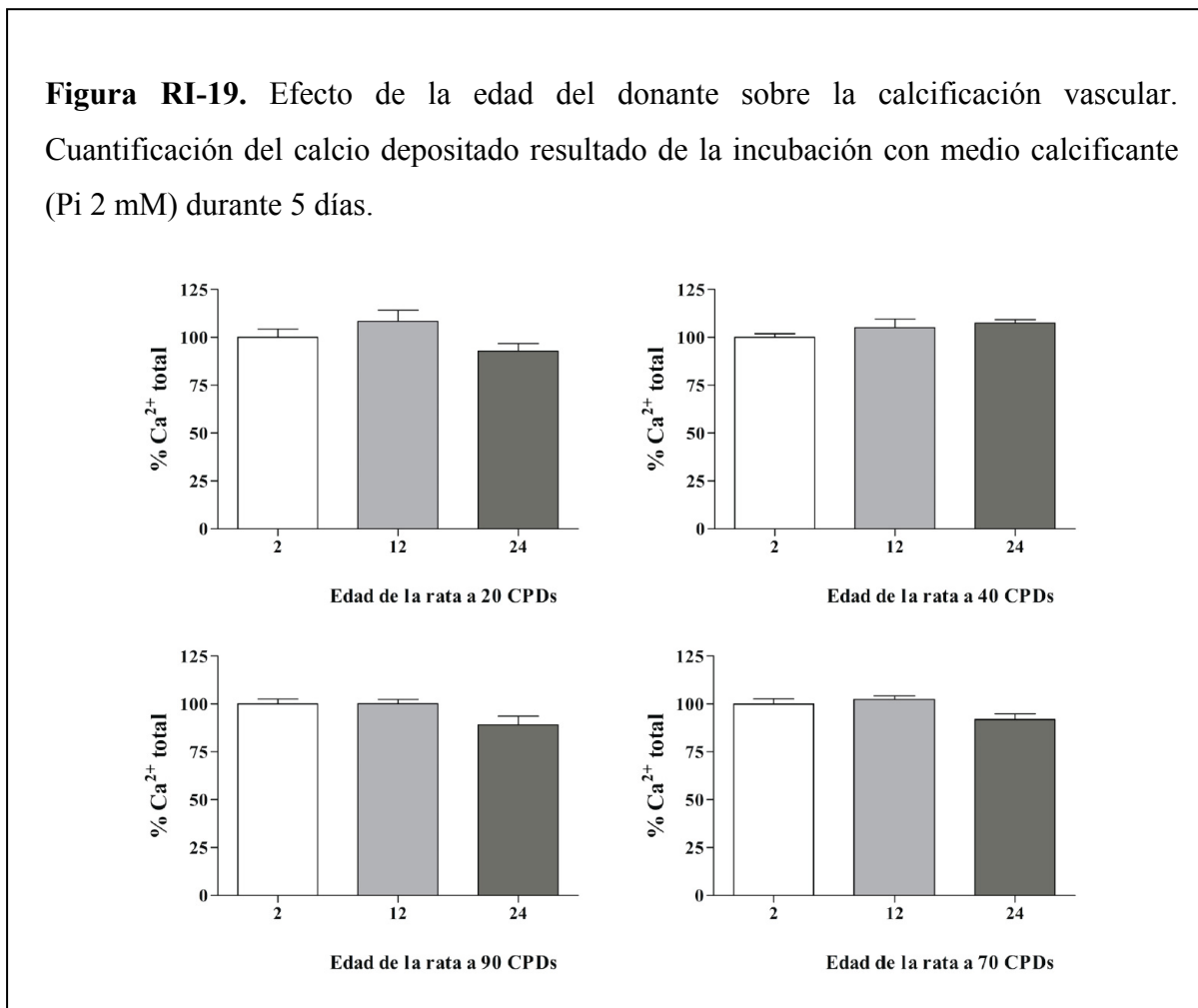


2. Efecto de la senescencia sobre la calcificación vascular.- Para comprobar el incremento en el riesgo de calcificación con la edad, cuando las células de diferentes divisiones y edad de donante alcanzaron la confluencia se incubaron en presencia de un medio de cultivo calcificante (Pi 2 mM) durante 5 días.

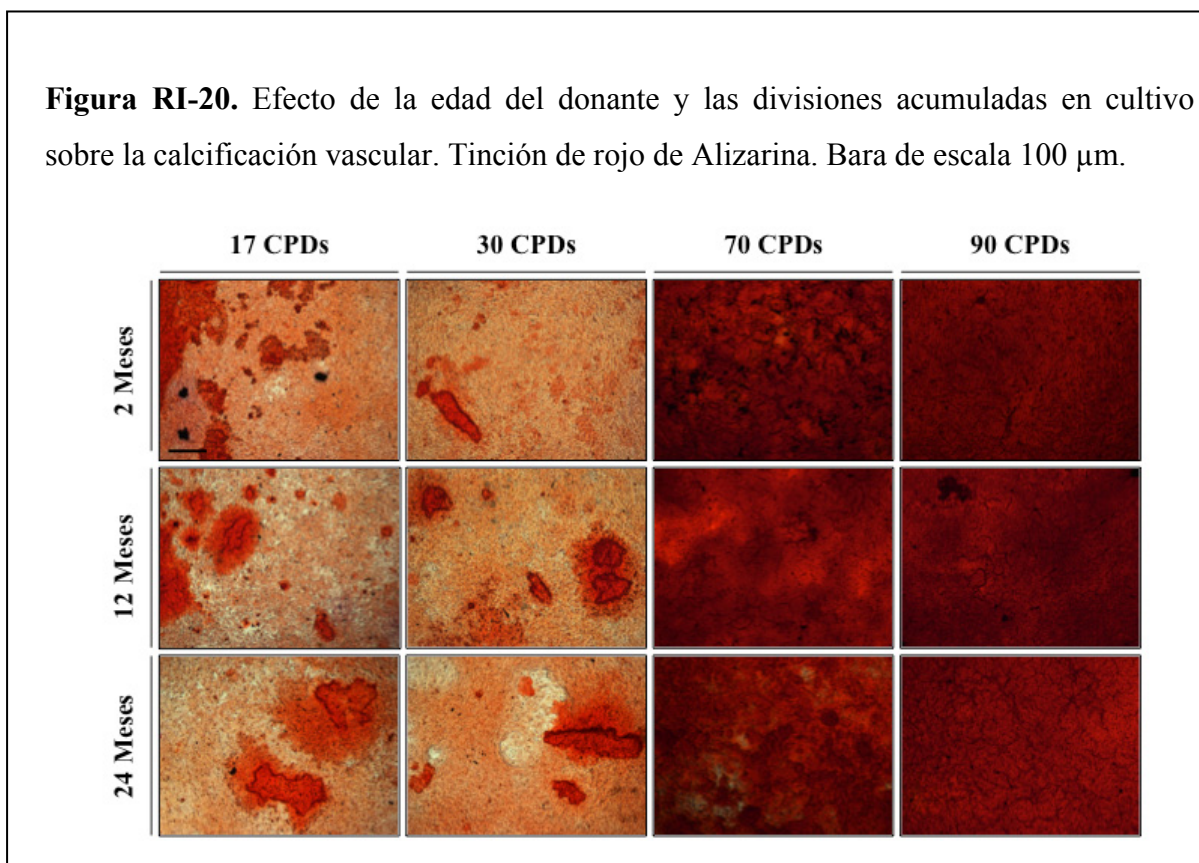
Tras este tratamiento se observó un incremento de los depósitos de calcio con el aumento del número de divisiones para todas las edades estudiadas. Esto es observable macroscópicamente mediante la tinción de alizarina (Figura RI-20), así como mediante la cuantificación del calcio depositado (Figura RI-18). Sin embargo, al comparar el grado de calcificación entre una misma división para las distintas edades no se observaron diferencias, para ninguna de las divisiones estudiadas (Figura RI-19).



**Figura RI-19.** Efecto de la edad del donante sobre la calcificación vascular. Cuantificación del calcio depositado resultado de la incubación con medio calcificante (Pi 2 mM) durante 5 días.



**Figura RI-20.** Efecto de la edad del donante y las divisiones acumuladas en cultivo sobre la calcificación vascular. Tinción de rojo de Alizarina. Barra de escala 100  $\mu$ m.



## PARTE II. INFLUENCIA DEL ARSÉNICO EN LA CALCIFICACIÓN VASCULAR Y SENESCENCIA DE VSMCs

### II. A. CITOTOXICIDAD DE LAS ESPECIES DE ARSÉNICO

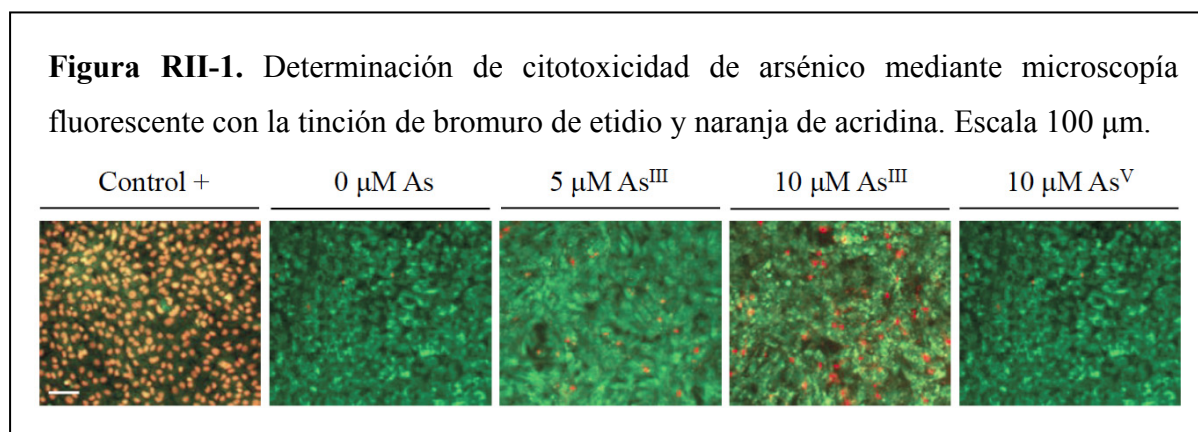
Las VSMCs fueron tratadas con concentraciones crecientes de las diferentes especies de arsénico, siendo las concentraciones usadas 0, 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ , y las especies, arsenito ( $\text{As}^{\text{III}}$ ), arseniato ( $\text{As}^{\text{V}}$ ), ácido monometilarsénico (MMA) y ácido dimetilarsénico (DMA).

La citotoxicidad se determinó usando dos métodos diferentes.

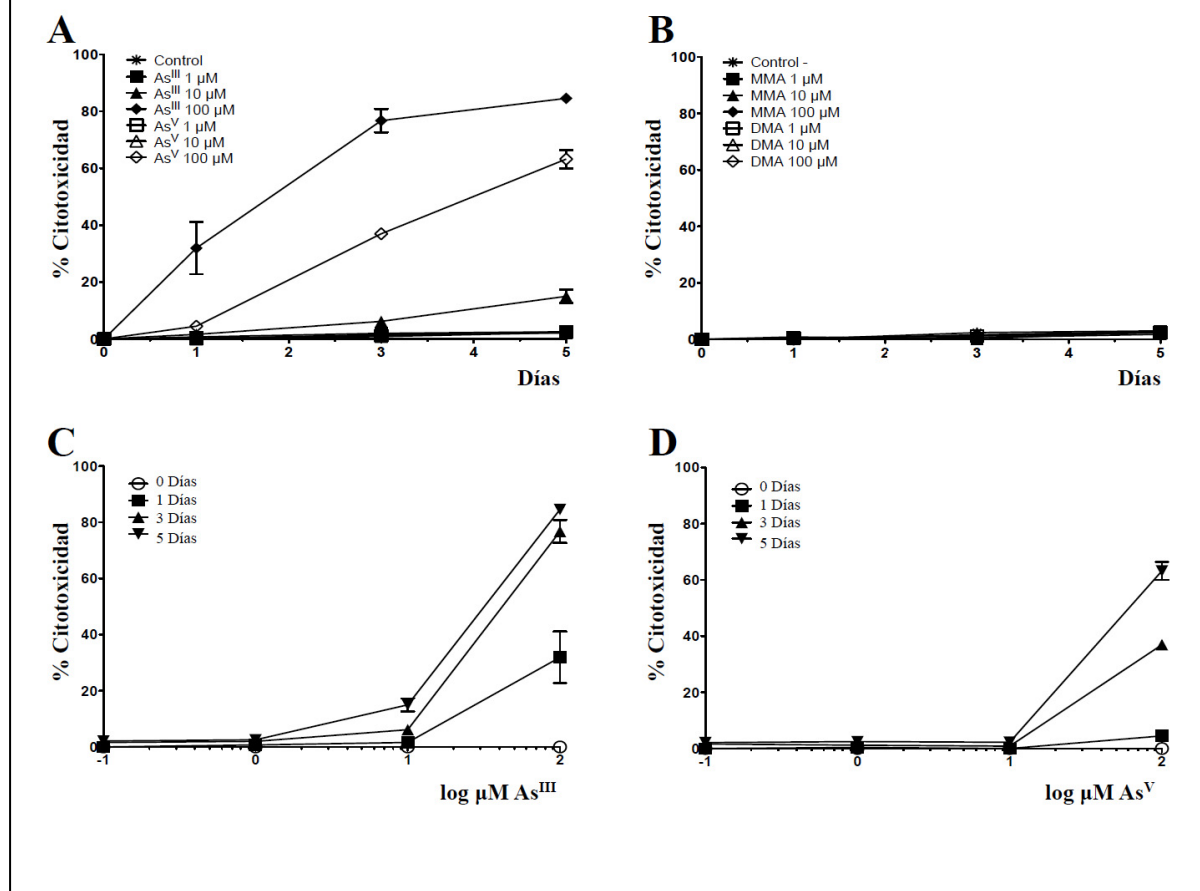
En primer lugar se cuantificó la liberación de LDH por las células en tratamiento (Figura RII-2). La toxicidad fue significativa después de 1 día de tratamiento a 100  $\mu\text{M}$  para  $\text{As}^{\text{III}}$  y después de 5 días a 10  $\mu\text{M}$ . La citotoxicidad fue solo evidente después de 3 días a 100  $\mu\text{M}$  para  $\text{As}^{\text{V}}$ . DMA y MMA no fueron citotóxicos incluso después de 5 días de tratamiento a 100  $\mu\text{M}$ . Para descartar falsos negativos como consecuencia de la inhibición de la actividad enzimática de la LDH por las diferentes formas de arsénico, se incubó el control positivo (células lisadas con Tritón X-100 al 2 %) con cada una de las formas a las concentraciones utilizadas en el estudio de citotoxicidad y no se observó disminución de la actividad enzimática respecto al control positivo (datos no mostrados).

Para corroborar estos resultados se llevó a cabo la doble tinción fluorescente con naranja de acridina y bromuro de etidio, como se puede observar en la figura RII-1.

A partir de estos resultados se eligieron las concentraciones no citotóxicas a usar para llevar a cabo el resto de estudios.



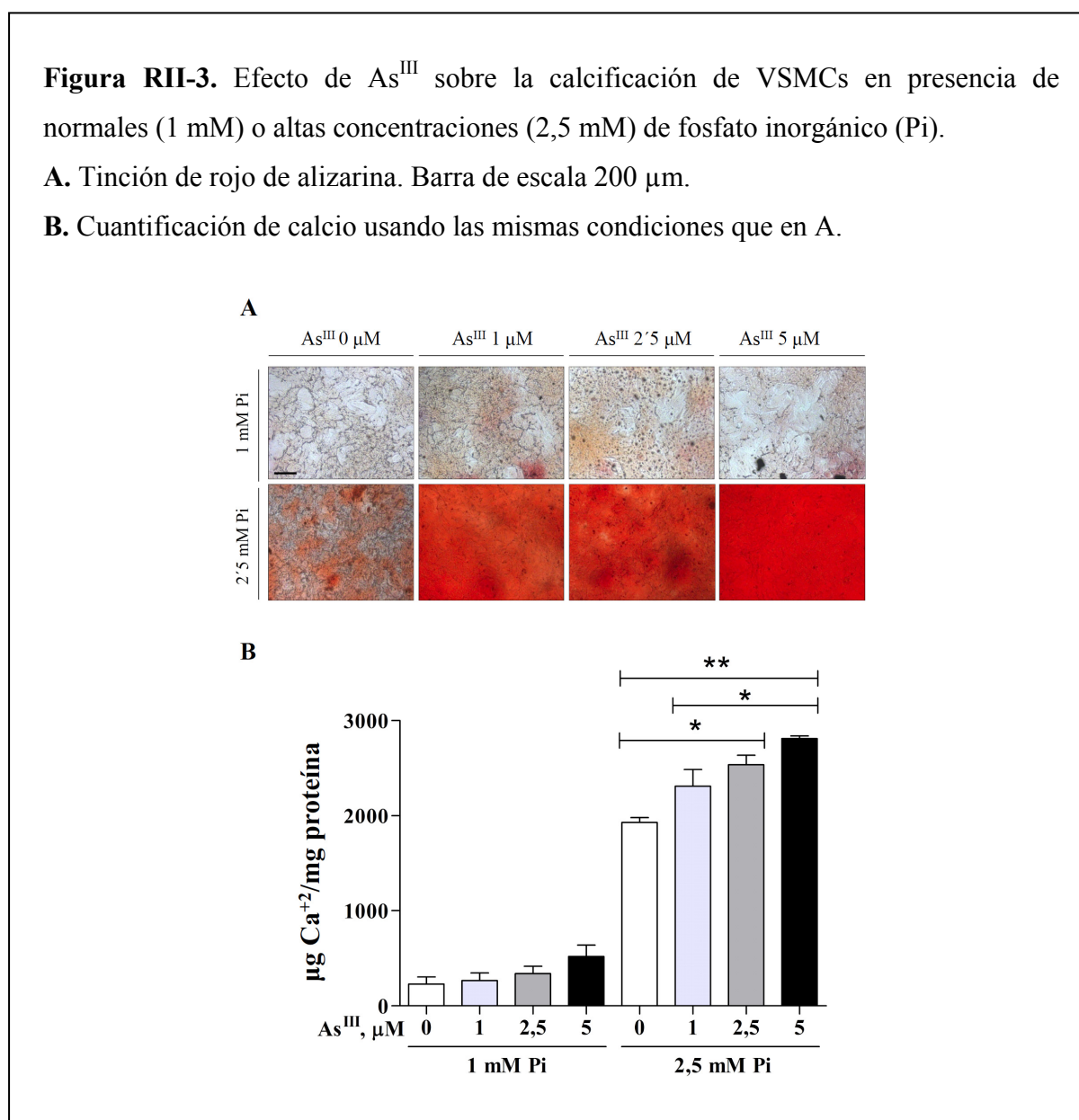
**Figura RII-2.** Citotoxicidad de las especies de arsénico en VSMCs de aorta de rata en función de la actividad LDH citosólica liberada al medio de cultivo. **A** y **B**, muestran los datos en función de los días de incubación. **C** y **D**, citotoxicidad de  $\text{As}^{\text{III}}$  y  $\text{As}^{\text{V}}$  en función de la concentración, a diferentes tiempos de incubación. 100 % de actividad LDH se refiere a la máxima toxicidad obtenida con Tritón X-100 al 2 % durante 1 hora.



## II. B. EFECTO DEL ARSÉNICO EN LA CALCIFICACIÓN “*IN VITRO*”

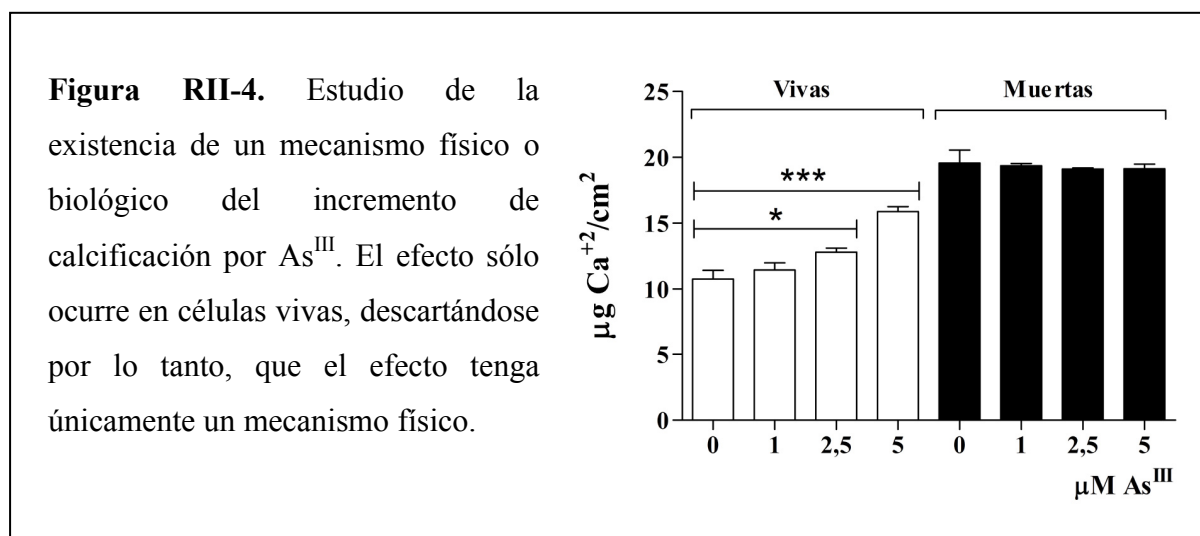
Para determinar si el arsénico es capaz de inducir calcificación en condiciones normales o basales, las VSMCs fueron incubadas en medio MEM sin adicionarle fosfato, es decir con concentración final de fosfato 1 mM, y en presencia de concentraciones no citotóxicas y crecientes de  $\text{As}^{\text{III}}$  durante 5 días.

Bajo estas concentraciones normofosfatémicas  $\text{As}^{\text{III}}$  no incrementó el depósito de calcio en las VSMC, como se observa por la ausencia de tinción con rojo de alizarina en la figura RII-3 A y por los resultados correspondientes a la cuantificación de calcio (Figura RII-3 B). Sin embargo,  $\text{As}^{\text{III}}$  incrementó la calcificación bajo condiciones calcificantes, como se observa en esta misma figura, es decir, en presencia de 2,5 mM de fosfato, equivalente a concentraciones hiperfosfatémicas (Jono y cols., 2000), como las observadas en fallo renal crónico.

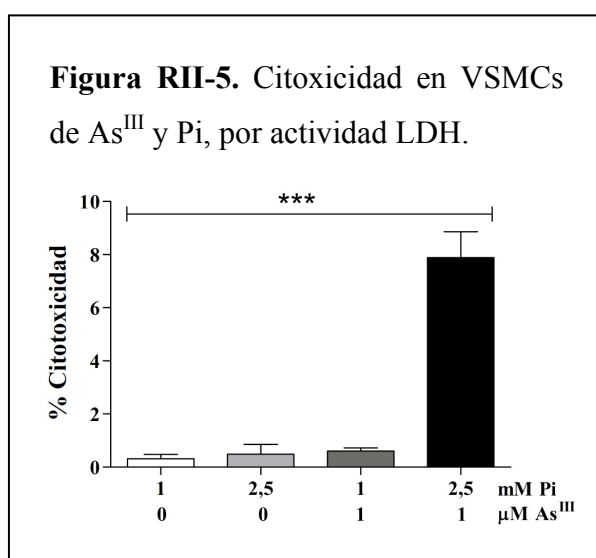


Para determinar si el efecto del arsénico en la calcificación fue mediado por un mecanismo biológico de las células o por un mecanismo físico que afectara a la iniciación de

la calcificación o al depósito de fosfato de calcio, se usó un modo pasivo de calcificación. De este modo, se probó de forma paralela la calcificación en células vivas y en células muertas (fijadas con paraformaldehído al 4 %). Como se esperaba, las células muertas calcificaron con una mayor intensidad y rapidez que las células vivas para todas las concentraciones de  $\text{As}^{\text{III}}$ . Sin embargo, el incremento de la calcificación como consecuencia del efecto del arsénico únicamente fue observado en células vivas (Figura RII-4). Esta dependencia observada en las células vivas descarta la posibilidad de un único efecto físico por arsénico, por ejemplo por incremento de la nucleación.



Aunque las concentraciones usadas de  $\text{As}^{\text{III}}$  a concentraciones normofosfatémicas no son citotóxicas, se observó que la combinación con fosfato a concentraciones hiperfosfatémicas (Pi 2,5 mM) incrementaba los valores de citotoxicidad observados para VSMCs. La figura RII-5 muestra las diferentes combinaciones de concentraciones de Pi y  $\text{As}^{\text{III}}$  y la citotoxicidad observada por el método de cuantificación de LDH extracelular.



Cabe destacar que la expresión de osteogenes no se vio incrementada con el tratamiento con  $As^{III}$  en condiciones normofosfatémicas (datos no mostrados).

Como el único efecto observable del arsénico es su citotoxicidad en presencia de  $P_i$ , ello que indicaría que el incremento de la calcificación generado es consecuencia del efecto citotóxico en condiciones hiperfosfatémicas.

## II. C. EFECTO DEL ARSÉNICO EN LA CALCIFICACIÓN “*IN VIVO*”

Para confirmar que el incremento de la calcificación no era un artefacto del modelo *in vitro*, sino que también ocurría *in vivo*, se usó un modelo animal de calcificación vascular e insuficiencia renal crónica, el cual consistió en ratas sometidas a nefrectomía 5/6 (Shobeiri y cols., 2010).

En primer lugar estos animales son sometidos a la resección de los dos polos del riñón izquierdo y una semana después de esta primera operación se procede a la extirpación completa del riñón derecho. Para este estudio los animales fueron adquiridos sometidos ya a las intervenciones quirúrgicas.

Se usaron tres grupos de animales. Un primer grupo control negativo (control), en el cual los animales no habían sido sometidos a nefrectomía 5/6, un segundo grupo control positivo (Nx) con animales nefrectomizados y un tercer grupo de ratas nefrectomizadas y tratadas  $As^V$  50 ppm en el agua de bebida (Nx+As). En este caso se usó  $As^V$  en lugar de  $As^{III}$  porque  $As^{III}$  es mucho más tóxico que  $As^V$  y además  $As^V$  es reducido a  $As^{III}$  en sangre y tejidos.

Todos los grupos ingirieron una dieta con alta concentración de fosfato ( $P_i$  al 1,2 %) para inducir el proceso de calcificación vascular, a la vez que fueron tratados con una concentración de 80 ng/kg de vitamina  $D_3$  (calcitriol) (Sigma, Ref. D1530) para acelerar este proceso.

Tanto pienso como agua fueron suministrados *ad-libitum*. En la tabla RII-1 se muestran los consumos de agua y pienso durante el tratamiento de los animales y el crecimiento y peso derivado del tratamiento.

**Tabla RII-1.** Consumos y valores de peso y crecimiento durante el tratamiento. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar.

\* Significativamente diferentes con respecto al Control. Agua y pienso se refieren al consumo por animal.

Grupo	Peso final (g)	% Crecimiento	Agua (ml/rata/día)	Pienso (g/rata/día)
Control	510 $\pm$ 10.4	88.2 $\pm$ 3.8	32 $\pm$ 0.5	26 $\pm$ 0.7
Nx	353 $\pm$ 22.4*	3.3 $\pm$ 6.6*	38 $\pm$ 1.5*	16 $\pm$ 2.7*
Nx+As	332 $\pm$ 13.6*	-1.6 $\pm$ 4.0*	23 $\pm$ 1.8*	13 $\pm$ 1.4*

**Tabla RII-2.** Valores de perfil renal en plasma y parámetros relacionados con la calcificación. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar.

\* Significativamente diferentes con respecto al Control. Agua y pienso se refieren al consumo por animal.

Grupo	Urea (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	Ca (mg/dl)	Pi (mg/dl)	As ( $\mu$ g/l)	FE <sub>Pi</sub> (%)
Control	20.7 $\pm$ 1.3	0.5 $\pm$ 0.0	10.4 $\pm$ 0.2	6.7 $\pm$ 0.2	17.0 $\pm$ 9.6	25.4 $\pm$ 3.9
Nx	121.0 $\pm$ 33.8*	1.6 $\pm$ 0.2*	10.1 $\pm$ 0.8	10.0 $\pm$ 1.0	12.7 $\pm$ 4.7	64.0 $\pm$ 6.8*
Nx+As	109.0 $\pm$ 9.1*	1.6 $\pm$ 0.2*	9.6 $\pm$ 0.6	12.3 $\pm$ 2.2	2209 $\pm$ 157*	60.2 $\pm$ 1.2*

Después de un mes de tratamiento, los animales fueron anestesiados y se procedió a la extracción de sangre para realizar los correspondientes análisis para determinar los parámetros de enfermedad renal crónica mostrados en la tabla RII-2, así como se extrajo corazón y aorta. La aorta fue procesada tanto para cuantificar calcio como para histología.

Todas las ratas sometidas a nefrectomía redujeron el porcentaje de crecimiento (es decir, el porcentaje de peso ganado durante el experimento) e incluso perdieron peso, lo que se acompañó de reducción del consumo de pienso y elevación de las concentraciones de urea

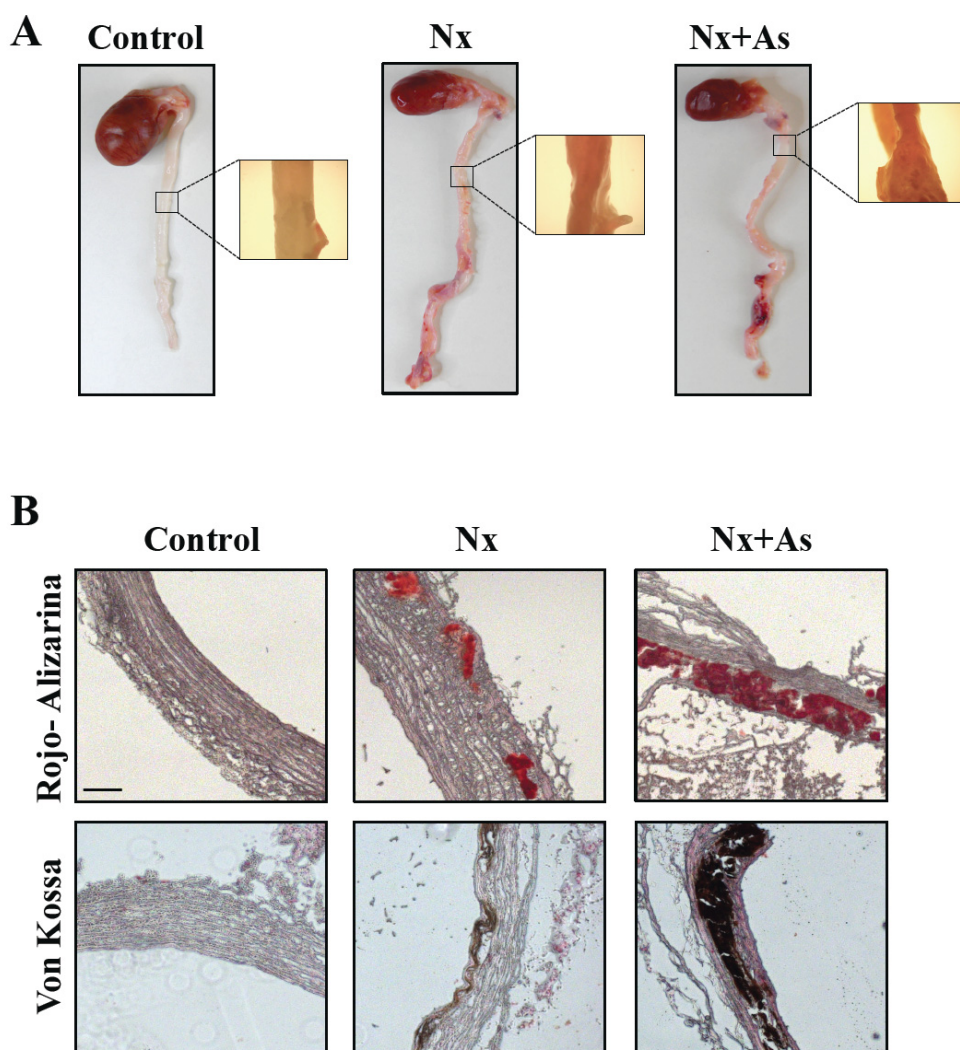


y creatinina en sangre y de la fracción de excreción de Pi en orina. Además, el consumo de agua disminuyó en el caso de las ratas tratadas con arsénico (Tabla RII 1 y 2).

Como se observa en la figura RII-6 A, las aortas del grupo control negativo presentaron una apariencia normal, lisas y elásticas, mientras las aortas de los grupos Nx y Nx+As presentaban una apariencia retorcida y plegada, un hallazgo compatible con esclerosis avanzada como consecuencia de calcificación medial.

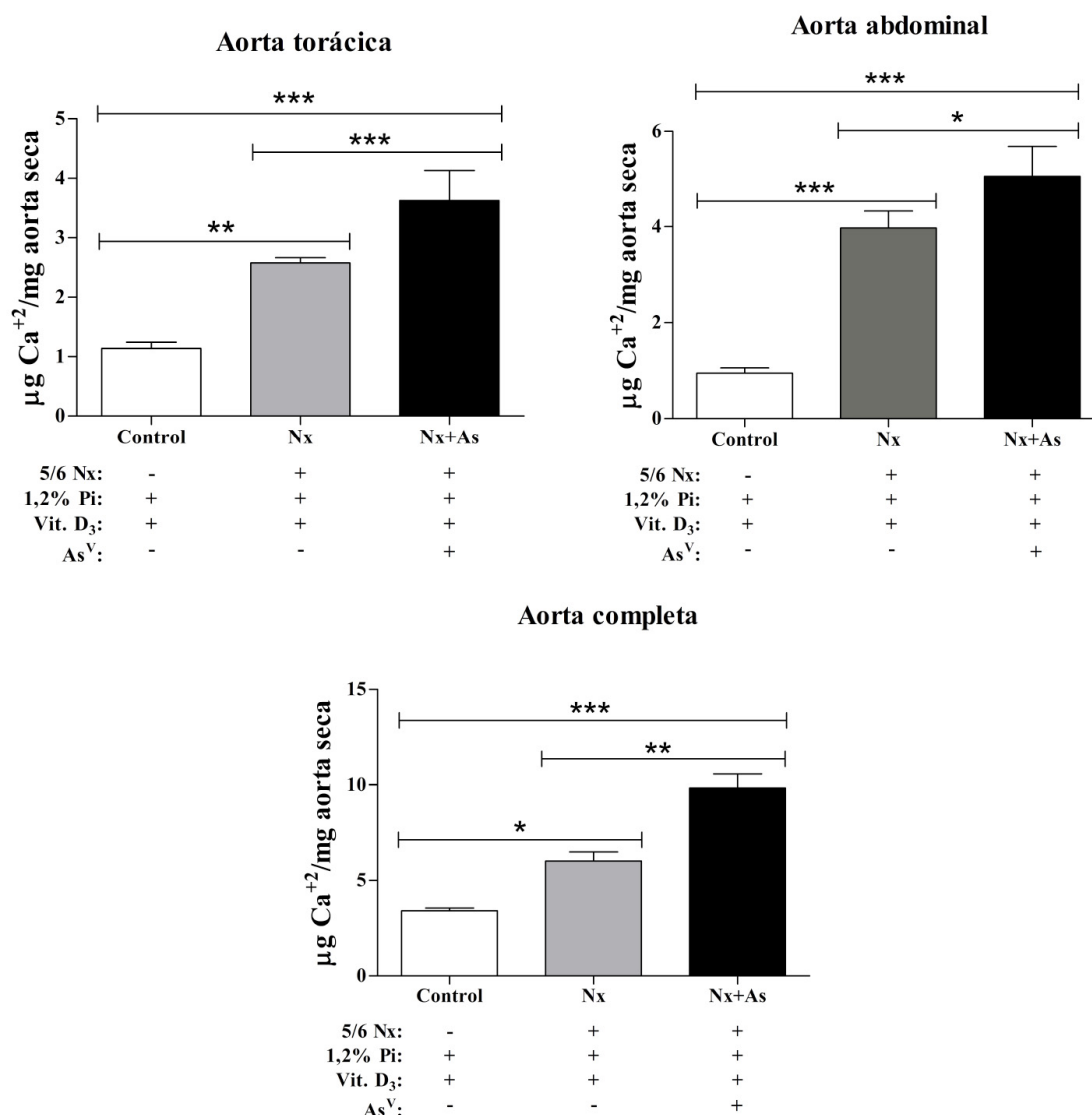
**Figura RII-6.** Efecto de  $As^V$  en la calcificación de la aorta *in vivo*, en animales alimentados con dieta con alto fosfato y vitamina  $D_3$  intraperitoneal durante 1 mes.

**A.** Vista macroscópica de las aortas tras el tratamiento. **B.** Tinción de rojo de alizarina y von Kossa de secciones de las aortas de los animales tratados. Barra de escala 100  $\mu m$ .



Cortes histológicos de las aortas fueron teñidos con tinción de rojo de alizarina frente a calcio, observándose un incremento en los depósitos de calcio que se correspondió con los resultados obtenidos por cuantificación. Se observaron claros depósitos en los animales del grupo Nx, siendo éstos más extensos en los animales del grupo Nx+As. Similares hallazgos se observaron en las tinción de von Kossa frente a los depósitos de fosfato. En ausencia de nefrectomía 5/6 (control negativo) no se observó calcificación, incluso tras el simultáneo tratamiento con Pi al 1,2 % más calcitriol (Figura RII-6 B).

**Figura RII-7.** Efecto de  $As^V$  en la calcificación de la aorta *in vivo*, en animales alimentados con dieta con alto fosfato y vitamina  $D_3$  intraperitoneal durante 1 mes. Cuantificación del calcio depositado en aorta torácica, abdominal y aorta completa.

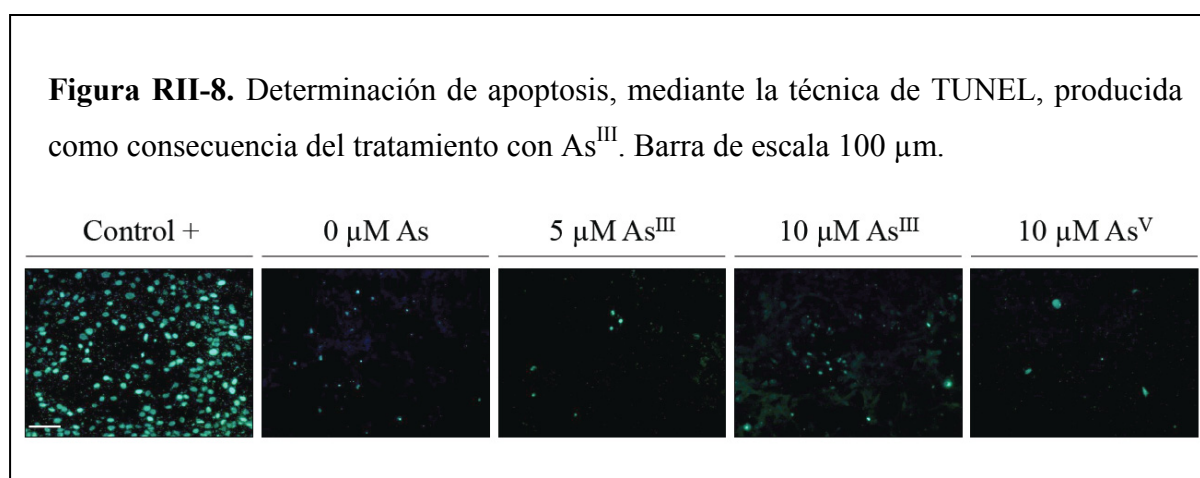


El contenido de calcio en la aorta completa del grupo Nx fue un 76 % mayor que el contenido que presentaba el grupo control negativo y este porcentaje ascendió hasta 187 % en el caso del grupo Nx+As frente al control negativo. A su vez se observó un incremento significativo de la calcificación con el tratamiento de As<sup>V</sup> frente al control positivo (Nx). En la figura RII-7 se observa que este comportamiento se dio tanto en aorta torácica como en aorta abdominal.

## II. D. EXCLUSIÓN DE MECANISMOS DE TOXICIDAD “*IN VITRO*” POR ARSÉNICO

Se testaron diferentes mecanismos de toxicidad en VSMCs, que podrían contribuir o desencadenar el proceso de senescencia por arsénico.

1. Apoptosis.- En primer lugar la inducción de la apoptosis fue determinada mediante el ensayo fluorescente de TUNEL en VSMCs incubadas durante 5 días en presencia de As<sup>III</sup> 0, 5 y 10  $\mu$ M o As<sup>V</sup> 10  $\mu$ M. Como se observa en la figura RII-8 no hubo evidencias de incremento de apoptosis bajo las condiciones utilizadas.



2. Estrés oxidativo.- Para medir el posible daño oxidativo producido por el arsénico se utilizaron varios métodos. Se analizó cualitativamente la producción de especies reactivas de oxígeno usando para ello la tinción verde fluorescente del kit CellROX, la acumulación de grupos carbonilos en proteínas mediante ELISA, y la expresión de proteína fosforilada p38; los resultados se muestran en la figura RII-9. Las VSMCs fueron tratadas como se indica en el test de apoptosis. En ninguna de las tres determinaciones se observaron incrementos significativos de los parámetros medidos de estrés oxidativo con el tratamiento con las

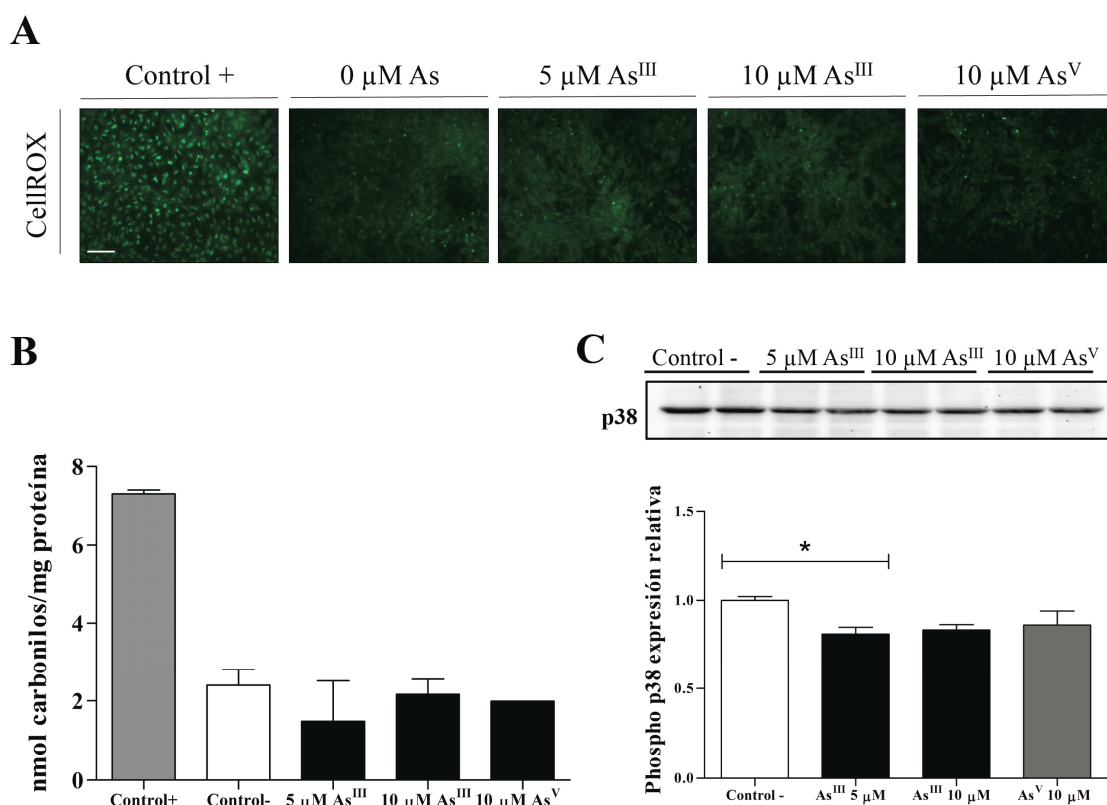
distintas formas y concentraciones de arsénico. Bien al contrario, se observa una disminución del daño, aunque no es significativa en todos los casos, excepto en la determinación del contenido de p38 fosforilada, en la que la diferencia se hace significativa en el tratamiento con  $\text{As}^{\text{III}}$  5  $\mu\text{M}$ .

**Figura RII-9.** Determinación de la producción de estrés oxidativo como consecuencia del tratamiento con  $\text{As}^{\text{III}}$ .

**A.** Determinación de la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante microscopía fluorescente, CellROX. Barra de escala 100  $\mu\text{m}$ .

**B.** Cuantificación de los nmoles de carbonilos por miligramo de proteína.

**C.** Cuantificación de la abundancia de p38 fosforilada (*Phospho p38*). La densidad de las bandas se normalizó con respecto a  $\beta$ -actina, y los ratios fueron expresados de forma relativa frente a la condición control negativo.

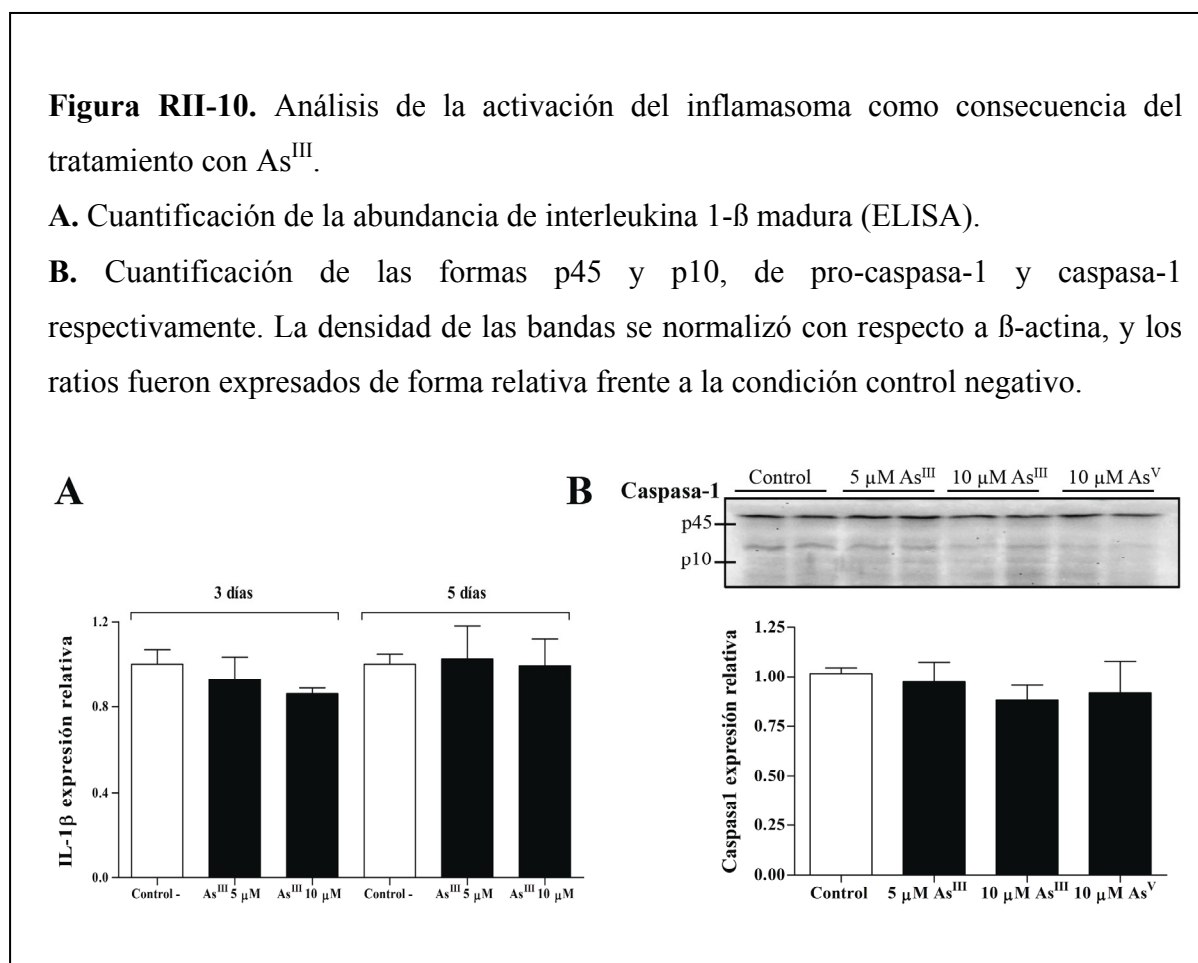


3. Activación de inflamasoma.- En último lugar se analizó la activación del inflamasoma, también usando tres metodologías diferentes: PCR en tiempo real (datos no mostrados) y ELISA para la cuantificación de interleukina 1- $\beta$ , y *western-blot* para la cuantificación de caspasa-1 (forma activa en inflamasoma de procaspasa-1). En el caso de ELISA, se usaron las concentraciones y formas de arsénico indicadas en los experimentos anteriores, y se tomaron muestras al día 3 y 5 de tratamiento. En ningún caso se observaron diferencias en células tratadas y células no tratadas (Figura RII-10). Por ello, la activación del inflamasoma fue descartada como mecanismo de citotoxicidad inducido por arsénico.

**Figura RII-10.** Análisis de la activación del inflamasoma como consecuencia del tratamiento con  $\text{As}^{\text{III}}$ .

**A.** Cuantificación de la abundancia de interleukina 1- $\beta$  madura (ELISA).

**B.** Cuantificación de las formas p45 y p10, de pro-caspasa-1 y caspasa-1 respectivamente. La densidad de las bandas se normalizó con respecto a  $\beta$ -actina, y los ratios fueron expresados de forma relativa frente a la condición control negativo.

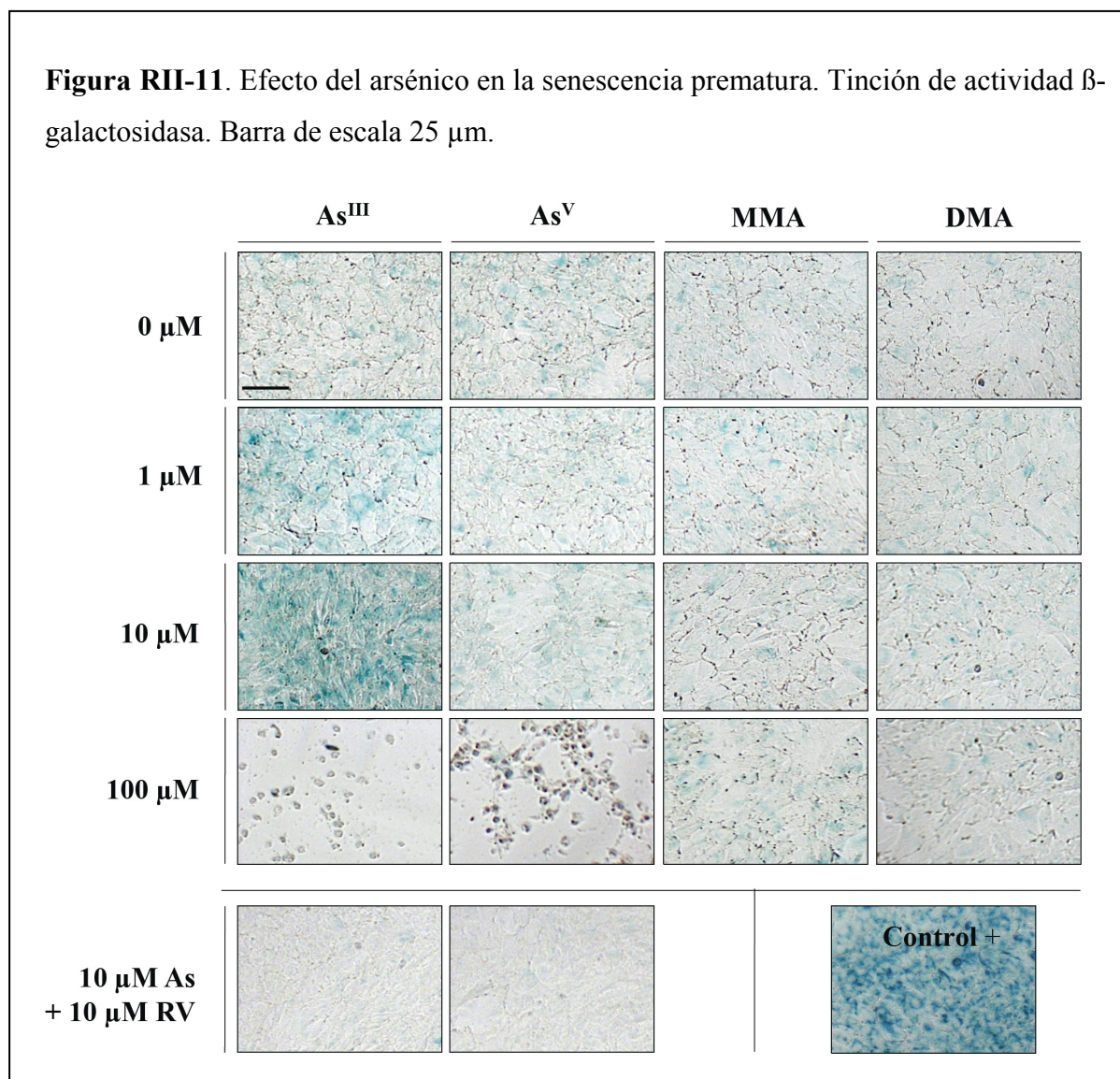


## II. E. SENESCENCIA PREMATURA INDUCIDA POR ESTRÉS (SIPS) “IN VITRO” E “IN VIVO” POR ARSÉNICO

Las VSMCs fueron incubadas con 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$   $\text{As}^{\text{III}}$ ,  $\text{As}^{\text{V}}$ , MMA o DMA durante 5 días. Como se puede ver en los estudios de citotoxicidad a 100  $\mu\text{M}$   $\text{As}^{\text{III}}$  y  $\text{As}^{\text{V}}$  se produjo una elevada mortalidad a los 5 días, por lo que estas concentraciones no se consideraron para



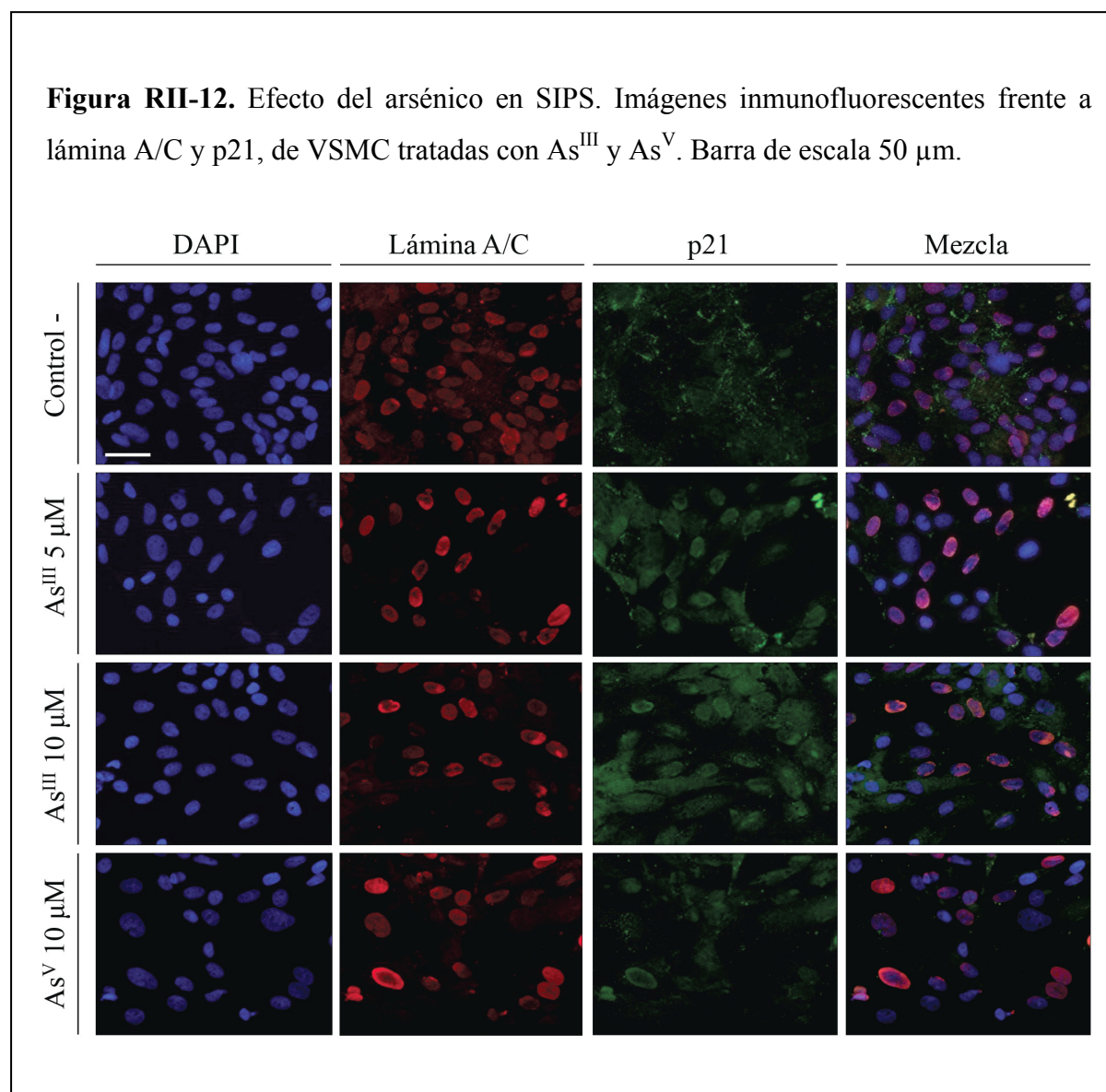
esta determinación, pero sí para MMA y DMA. Al finalizar el tratamiento se analizó la actividad  $\beta$ -galactosidasa a pH 6 y a pH 4 (control positivo). La figura RII-11 muestra el incremento de la actividad de esta enzima lisosomal a  $\text{As}^{\text{III}}$  1  $\mu\text{M}$ , y fue máxima a 10  $\mu\text{M}$ . El resto de formas de arsénico no tuvieron ningún efecto sobre la actividad  $\beta$ -galactosidasa. El incremento de la actividad  $\beta$ -galactosidasa se evitó por la incubación simultánea con resveratrol a concentración 10  $\mu\text{M}$ , como también se observa en la figura RII-11.



El incremento de la actividad  $\beta$ -galactosidasa no fue debido al envejecimiento celular, sino a una forma especializada de senescencia, la cual no está asociada con cambios en la abundancia de proteína nuclear lámina A/C (Figura RII-13 A). El efecto del arsénico en SIPS fue confirmado por la cuantificación del marcador de senescencia p21. La expresión de p21

se incrementó al máximo con el tratamiento con  $\text{As}^{\text{III}}$  y solo mínimamente con  $\text{As}^{\text{V}}$ , aunque el incremento para  $\text{As}^{\text{V}}$  no fue significativo (Figura RII-13 B). Estos resultados se confirmaron por inmunofluorescencia (Figura RII-12). En este caso, el tratamiento con resveratrol a concentración 10  $\mu\text{M}$  no evitó el incremento de la expresión de p21 (Figura RII-13 C).

**Figura RII-12.** Efecto del arsénico en SIPS. Imágenes inmunofluorescentes frente a lámina A/C y p21, de VSMC tratadas con  $\text{As}^{\text{III}}$  y  $\text{As}^{\text{V}}$ . Barra de escala 50  $\mu\text{m}$ .

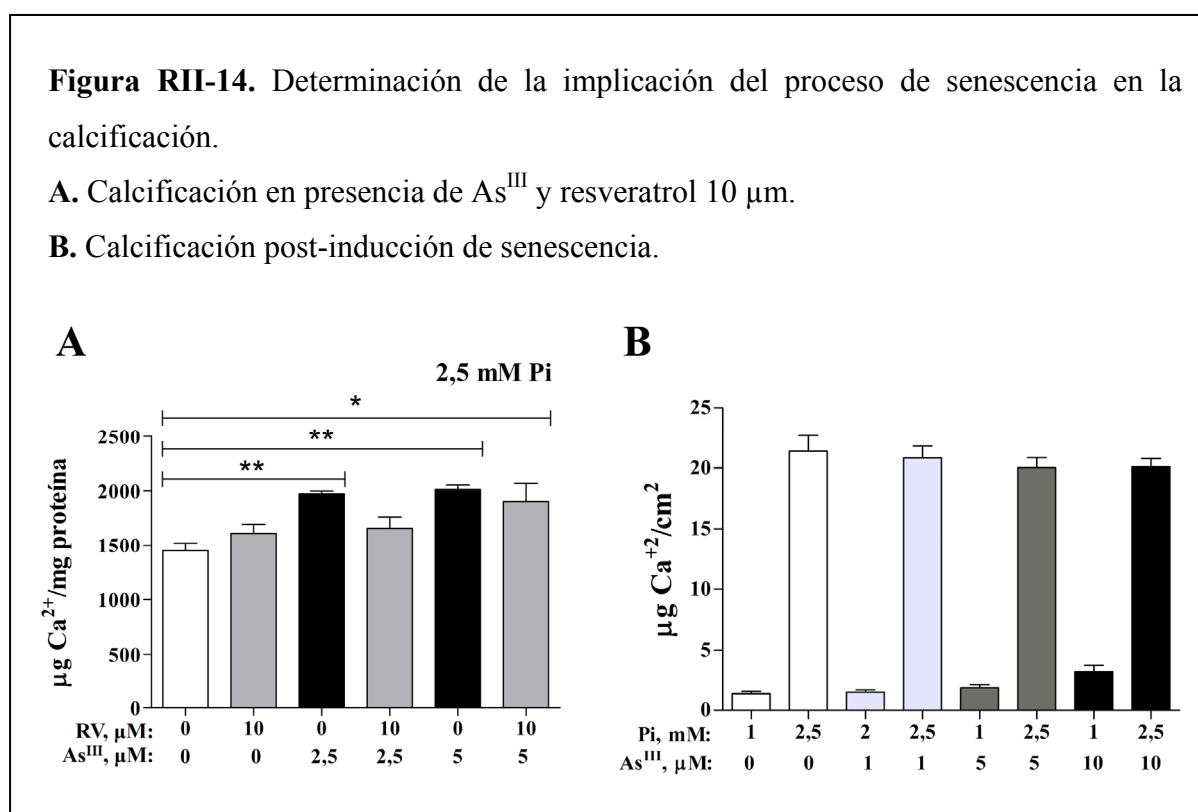






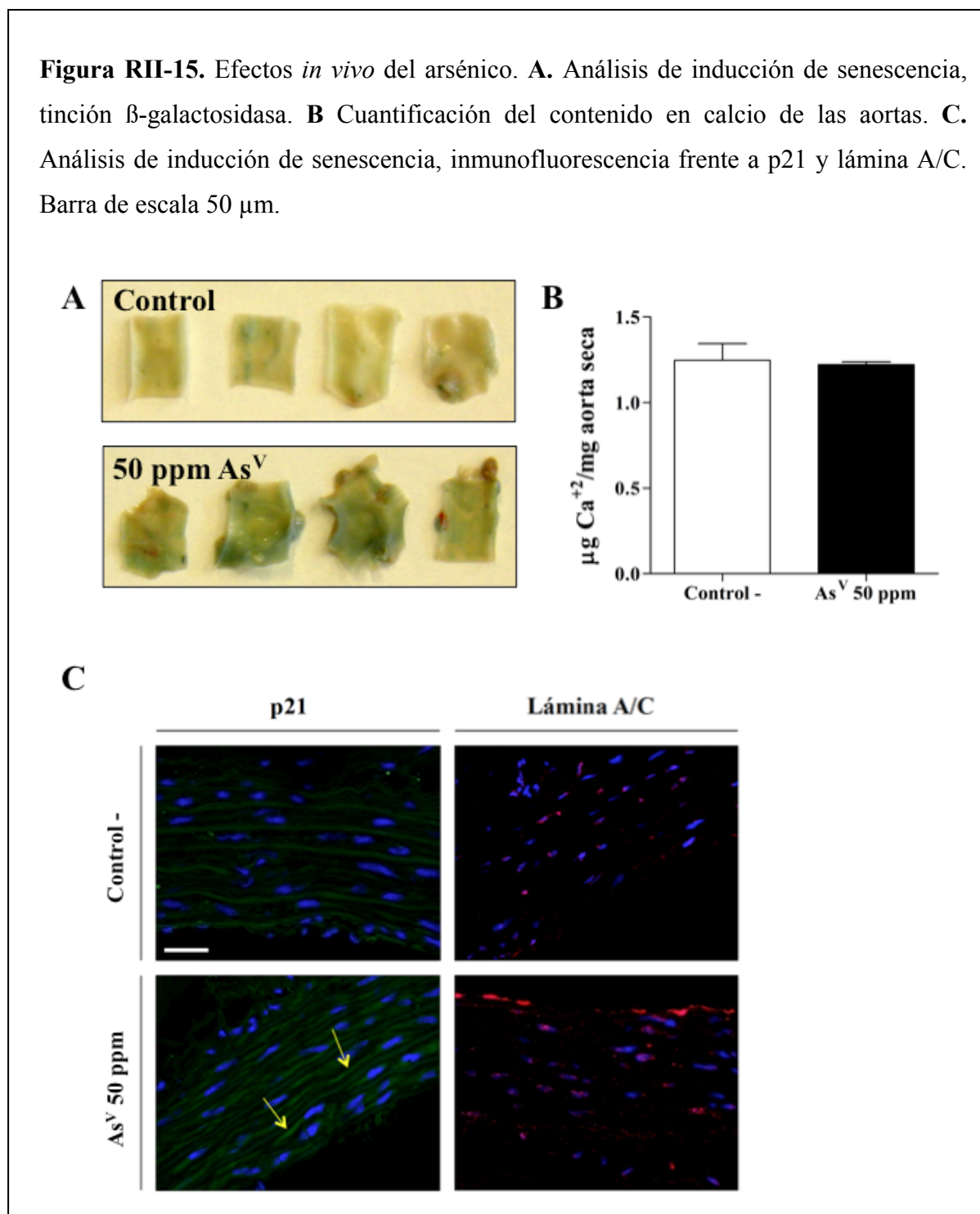
Pi 2,5 mM. La ausencia de efecto del resveratrol en la calcificación sugiere que SIPS no está relacionado con la calcificación, sino que intervienen otros mecanismos.

Para clarificar esta situación, se diseñó un experimento para diferenciar entre el efecto del arsénico en la inducción de SIPS y en la inducción de la calcificación. En primer lugar, se indujo senescencia incubando las VSMCs durante 5 días con  $\text{As}^{\text{III}}$  2,5, 5 y 10  $\mu\text{M}$  en presencia de medio de cultivo con Pi 1 mM. A los 5 días de tratamiento el medio de cultivo fue cambiado y las células fueron incubadas usando un medio calcificante, es decir, con Pi 2,5 mM en ausencia de arsénico, durante otros 5 días. En este caso, no se observó incremento de la calcificación, lo que lleva a concluir que la calcificación no es consecuencia de SIPS. Estos resultados quedan descritos en la figura RII-14 B.



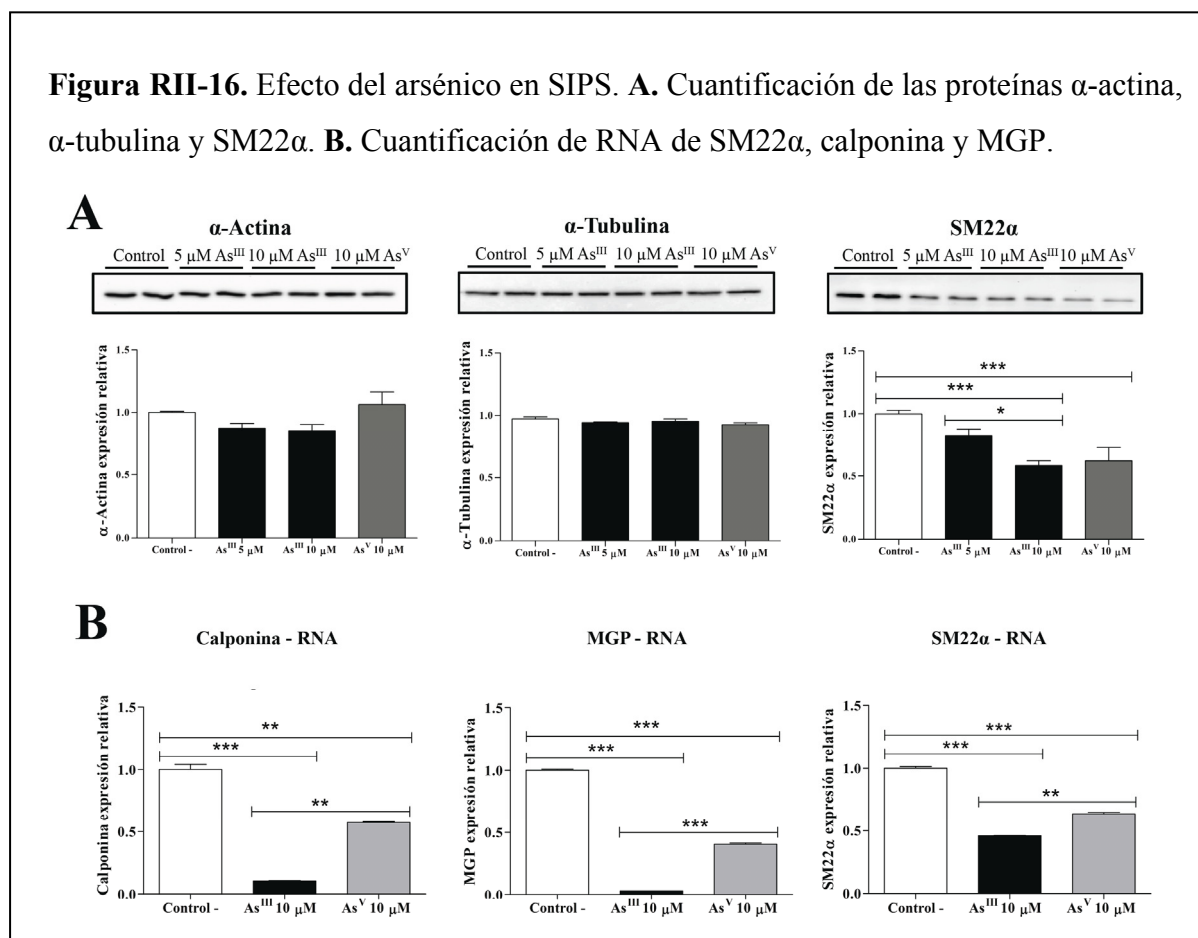
Finalmente, para demostrar que la inducción de SIPS por arsénico no está simplemente relacionada con el modelo celular vascular, sino que también ocurre *in vivo*, se trataron ratas macho Wistar de dos meses de edad durante treinta días con  $\text{As}^{\text{V}}$  a concentración 50 ppm en el agua de bebida. Las aortas completas fueron procesadas para analizar la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Como se observa en la figura RII-15 A el  $\text{As}^{\text{V}}$  claramente incrementa la actividad  $\beta$ -galactosidasa lisosomal, lo cual confirma la existencia

de este mecanismo vasculotóxico de arsénico *in vivo*. Adicionalmente, se cuantificó el contenido en calcio de las aortas de estos animales, y como se esperaba no se observaron cambios debidos al tratamiento (Figura RII-15 B). A su vez, se determinó la expresión de p21 y lámina A/C por inmunofluorescencia en las aortas de estos animales, confirmándose los resultados observados *in vitro*, es decir, no se produjo efecto sobre la expresión de lámina A/C pero sí se incrementó la expresión de p21 (Figura RII-15 C).



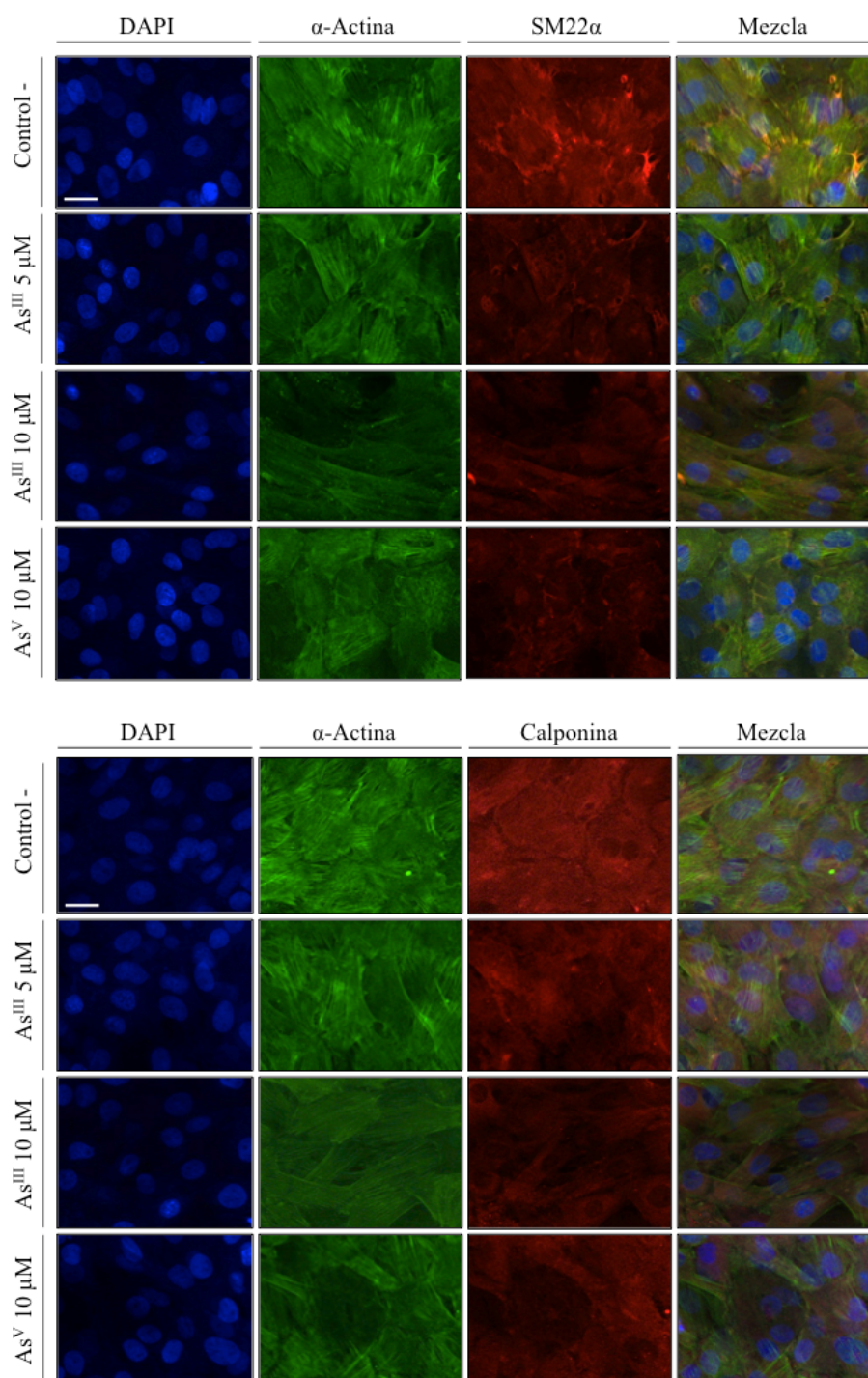
## II. F. ARSÉNICO INDUCE DESDIFERENCIACIÓN DE VSMCs

El origen de VSMCs es mesenquimatoso, pudiendo estas células fácilmente transdiferenciarse *in vitro* e *in vivo* bajo determinadas circunstancias, incluyendo entre ellas las condiciones calcificantes. De este modo, se determinó la expresión de marcadores de VSMC tras la incubación durante 5 días con  $\text{As}^{\text{III}}$  5 y 10  $\mu\text{M}$  y  $\text{As}^{\text{V}}$  10  $\mu\text{M}$ , analizando si diferentes formas de arsénico podían modificar el patrón de expresión génica característica de las células de músculo liso vascular. La expresión de  $\alpha$ -actina y SM22 $\alpha$  fue determinada por *western-blot*, observándose una reducción aproximadamente del 40 % en la expresión de SM22 $\alpha$  para ambas formas de arsénico a 10  $\mu\text{M}$ . Las expresiones de  $\alpha$ -actina y  $\alpha$ -tubulina no se vieron modificadas. La disminución de la expresión de SM22 $\alpha$  fue confirmada por PCR en tiempo real y se extendió a calponina y proteína de matriz Gla (MGP). En estos casos no se analizó la expresión proteica ya que no disponíamos de anticuerpos adecuados para su análisis. En el caso de calponina y MGP el efecto de  $\text{As}^{\text{III}}$  fue mucho mayor, dando lugar a reducciones del 89 % y 97 % respectivamente, en comparación con el control negativo. Con respecto a  $\text{As}^{\text{V}}$ , la inhibición fue menor, 43 % para calponina y 60 % para MGP. Estos resultados se muestran en la figura RII-16.

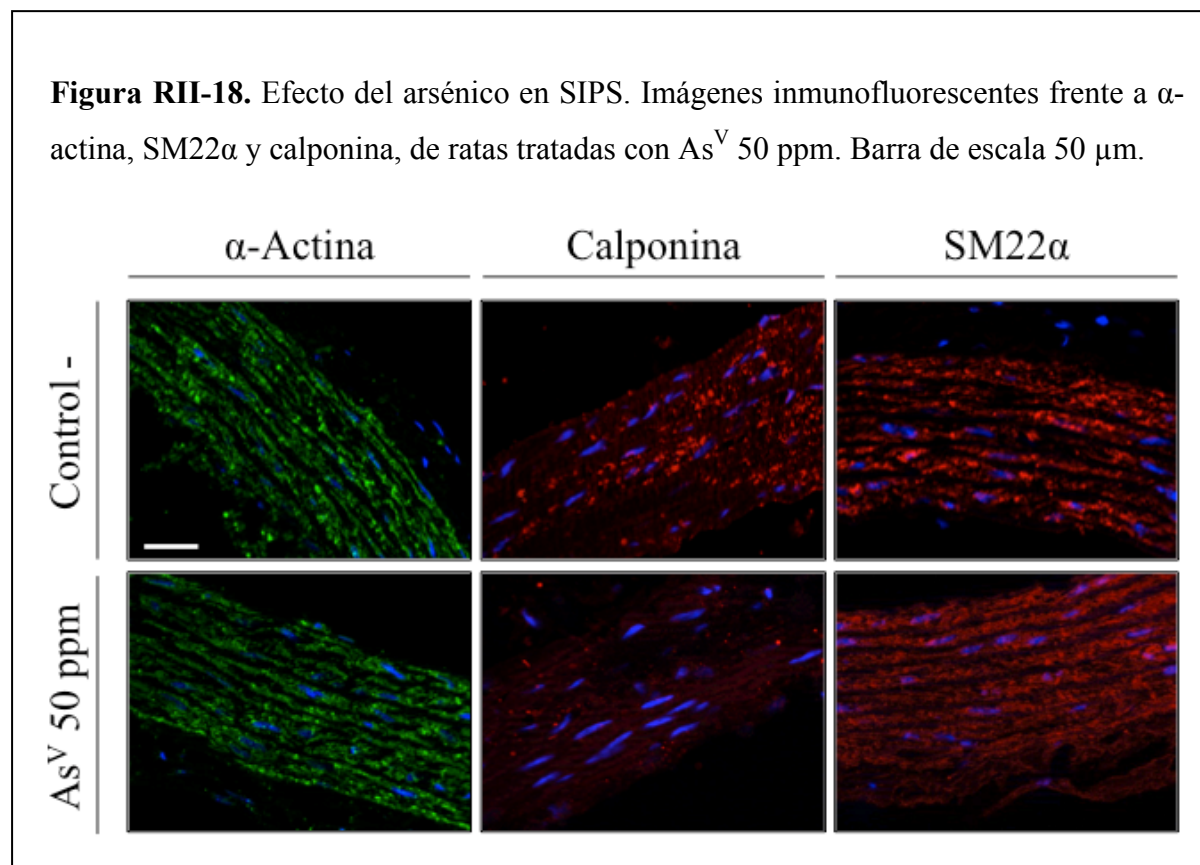


Los resultados para  $\alpha$ -actina, SM22 $\alpha$  y calponina fueron confirmados por microscopía inmunofluorescente, mostrando similares resultados a los observados por *western-blot* y PCR en tiempo real como se muestra en la figura RII-17.

**Figura RII-17.** Efecto del arsénico en SIPS. Imágenes inmunofluorescentes frente a  $\alpha$ -actina, SM22 $\alpha$  y calponina, de VSMC tratadas con As<sup>III</sup> y As<sup>V</sup>. Barra de escala 25  $\mu$ m.



En los estudios *in vivo* la reducción de la expresión de SM22 $\alpha$  y calponina, así como la ausencia de efecto en la expresión de  $\alpha$ -actina, fueron confirmadas por microscopía fluorescente en las aortas de ratas tratadas durante un mes con As<sup>V</sup> 50 ppm en el agua de bebida (Figura RII-18).



## **PARTE III. EFECTO DEL FLÚOR SOBRE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR**

### **III. A. ELECCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE TRATAMIENTO CON FLÚOR**

Como se indica en los objetivos, este estudio busca conocer el efecto del ion fluoruro presente en aguas fluoradas, en el proceso de calcificación vascular. Por ello las concentraciones a usar de ion fluoruro debían ser similares a las presentes en sangre de individuos que consumían aguas fluoradas.

La Organización mundial de la Salud (OMS) fija como límite máximo en aguas fluoradas 1,5 mg F<sup>-</sup>/l. Por lo general la concentración de flúor en aguas fluoradas se encuentra en un rango entre 1 y 1,5 mg/l. En estudios previos realizados por otros grupos, en los que se cuantificó la concentración de flúor iónico en plasma en individuos que consumían aguas fluoradas, se obtuvo un rango entre 1 y 6  $\mu\text{M F}^-$  (Husdan, 1976; Singer, 1979; Kaminsky, 1990).

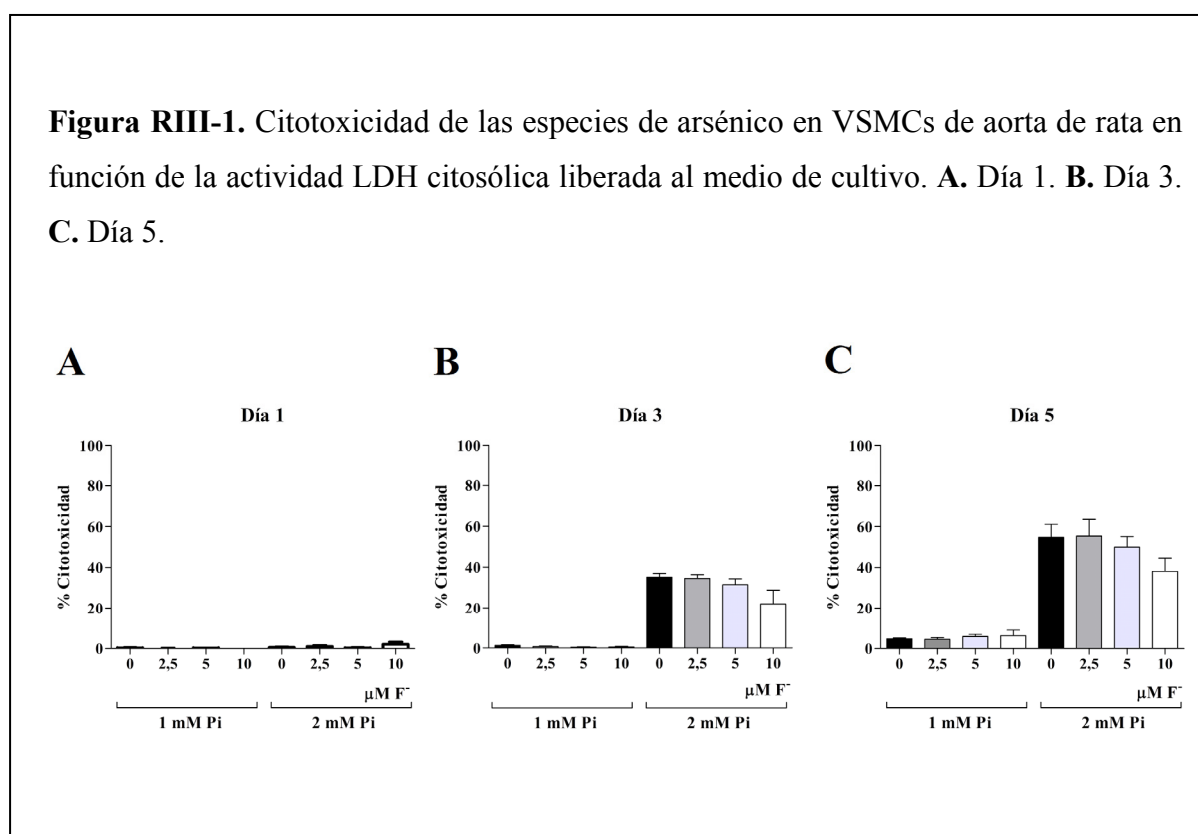
A partir de estos valores se fijaron las concentraciones de tratamiento *in vitro*, 2,5 y 5  $\mu\text{M}$  (como valores que se encuentran dentro del rango de las concentraciones de flúor en personas consumidoras de agua fluorada), y 10  $\mu\text{M}$  como exceso, para forzar la existencia de efectos.

Las concentraciones usadas en los tratamientos *in vivo* con aguas fluoradas fueron 1,5 mg F<sup>-</sup>/l como fija la OMS; y 15 mg F<sup>-</sup>/l, un exceso para, del mismo modo, facilitar la existencia de efectos.

### **III. B. DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD EN EL TRATAMIENTO “*IN VITRO*” CON FLÚOR**

Para determinar si el flúor era citotóxico para las VSMCs, éstas fueron tratadas durante 5 días con concentraciones crecientes de ion fluoruro, 0, 2,5, 5 y 10  $\mu\text{M}$ , tanto en condiciones normofosfatémicas (Pi 1 mM) como hiperfosfatémicas (Pi 2 mM) para inducir el proceso de calcificación. La detección de citotoxicidad se realizó mediante la medición de la actividad LDH en el sobrenadante de las VSMCs en cultivo.

Como se observa en la figura RIII-1, a concentraciones normofosfatémicas el tratamiento no produjo citotoxicidad bajo ninguna de las condiciones probadas durante los 5 días de tratamiento. Bajo condiciones hiperfosfatémicas en presencia de flúor y en su ausencia, la citotoxicidad alcanzó niveles significativos al tercer día de tratamiento, lo cual coincidió con el inicio de la calcificación y ésta se incrementó a la vez que aumentaban los depósitos cálcicos. Sin embargo en las células tratadas con flúor la citotoxicidad fue menor que en las no tratadas, esta menor citotoxicidad fue dosis dependiente.

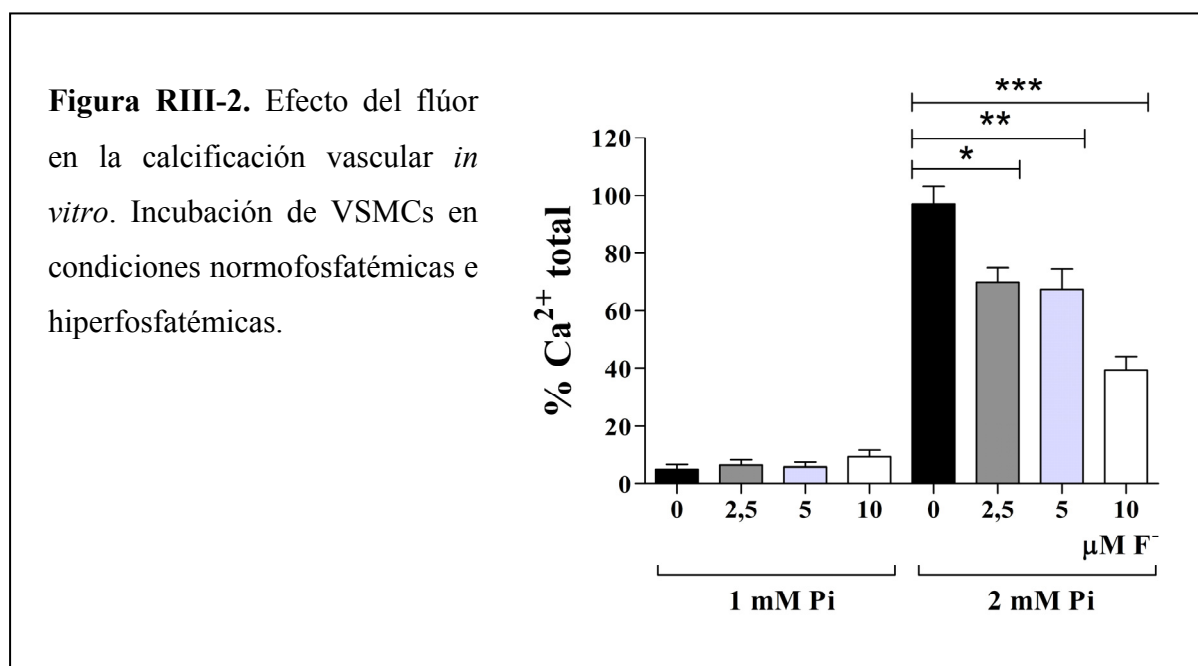


### III. C. EFECTO DEL FLÚOR EN LA CALCIFICACIÓN “*IN VITRO*”

Para determinar el efecto del flúor en el proceso de calcificación las células fueron incubadas bajo condiciones normales en medio MEM (es decir, con una concentración final de fosfato 1 mM), y también en condiciones calcificantes, es decir, con concentración final Pi 2 mM, durante 5 días, con distintas concentraciones de ion fluoruro, 0, 2,5, 5 y 10 μM.



Bajo concentraciones normofosfatémicas no se produjo calcificación, como era esperable. Bajo condiciones calcificantes se produjo calcificación en todas las condiciones, sin embargo el grado de calcificación fue menor en las células que habían sido tratadas con flúor (Figura RIII-2). La reducción de la calcificación fue de aproximadamente un 30, 33 y 60 % con el tratamiento simultáneo de  $F^-$  2,5, 5 y 10  $\mu M$ , respectivamente.



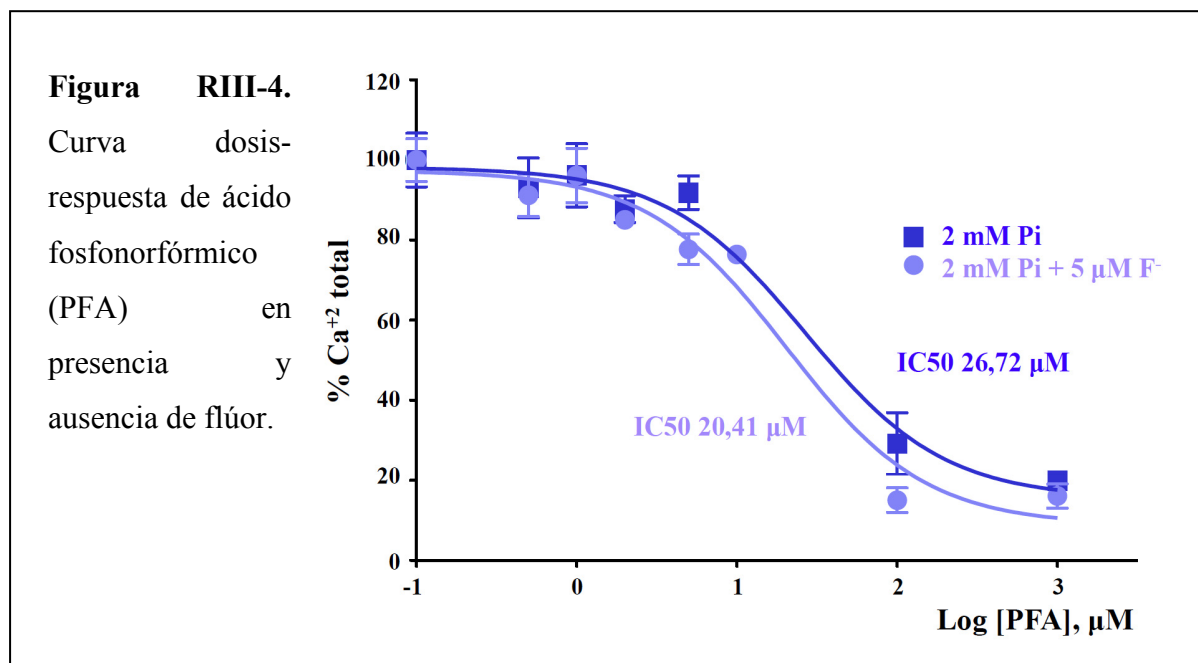
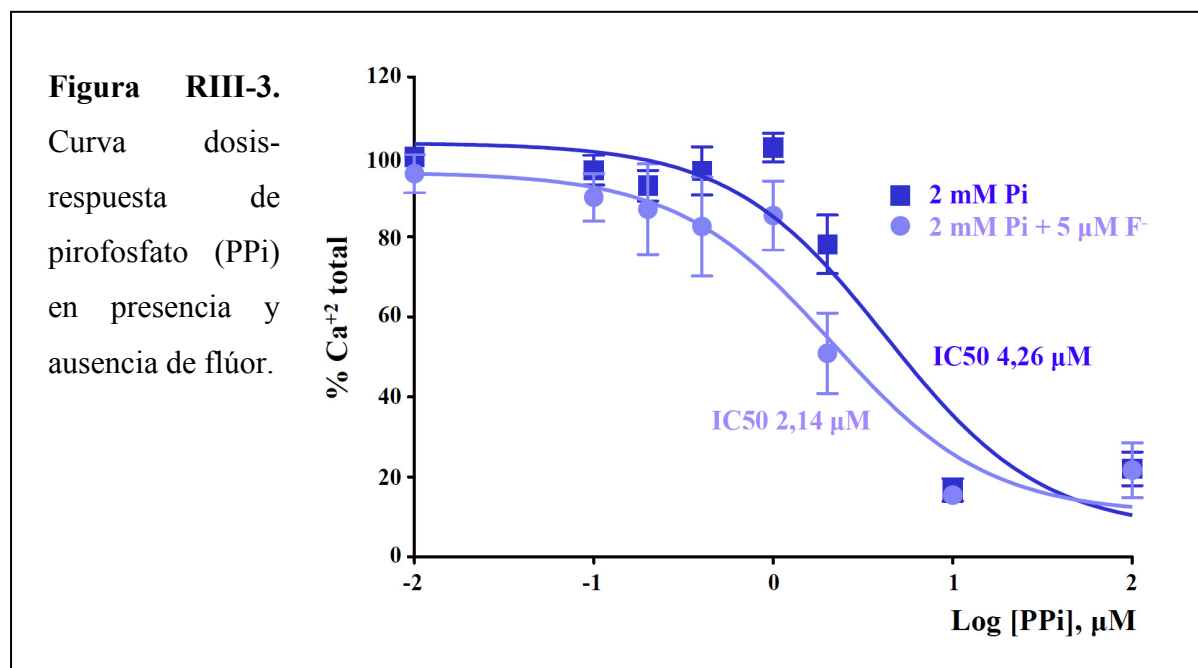
Para confirmar el efecto inhibitorio del flúor en el proceso de calcificación vascular se realizó una curva dosis-respuesta con concentraciones crecientes de un inhibidor de la calcificación. Se incubaron las células bajo condiciones calcificantes junto con pirofosfato o ácido fosfonofórmico, en presencia y en ausencia de  $F^-$  5  $\mu M$ .

En primer lugar la calcificación se llevó a cabo en presencia de pirofosfato (PPi). Como se observa en la figura RIII-3 la concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) fue menor cuando se combinó PPi y  $F^-$  5  $\mu M$ . La concentración necesaria de PPi para reducir el grado de calcificación al 50 % fue 4,26  $\mu M$  en ausencia de  $F^-$ , reduciéndose a 2,14  $\mu M$  al combinar los dos compuestos.

En segundo lugar la calcificación se llevó a cabo en presencia de ácido fosfonofórmico (PFA). Como se observa en la figura RIII-4 la concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) fue, como en el caso de PPi, menor cuando se combinó PPi y  $F^-$  5  $\mu M$ . La



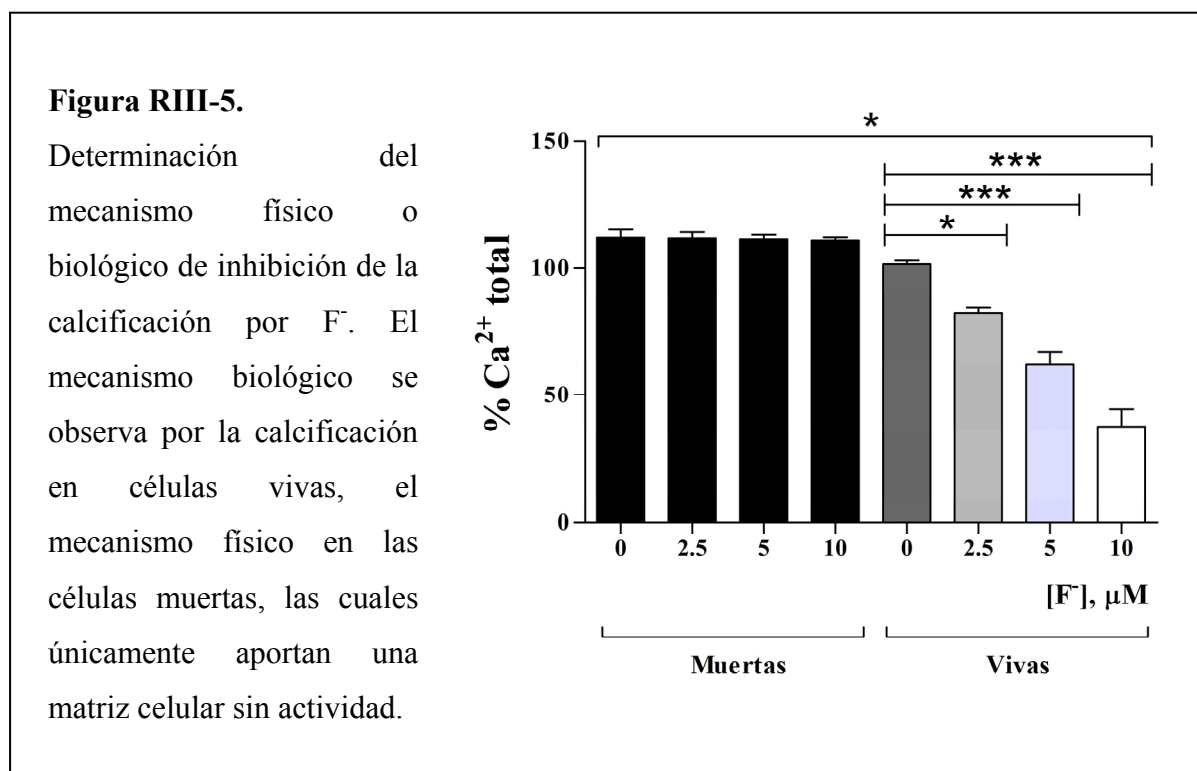
concentración necesaria de PFA para reducir el grado de calcificación al 50 % fue 26,72  $\mu\text{M}$  en ausencia de  $\text{F}^-$ , reduciéndose a 20,41  $\mu\text{M}$  al combinar los dos compuestos.



### III. D. DETERMINACIÓN DEL MECANISMO IMPLICADO EN LA INHIBICIÓN DE LA CALCIFICACIÓN “*IN VITRO*” POR FLÚOR

Se estudió la posibilidad de que el efecto del flúor en la calcificación fuera mediado por un mecanismo biológico de las propias células, o bien por un mecanismo físico que afectara a la iniciación de la calcificación o al depósito de fosfato de calcio. Para ello se usó un modelo pasivo de calcificación (Villa-Bellosta y cols., 2009).

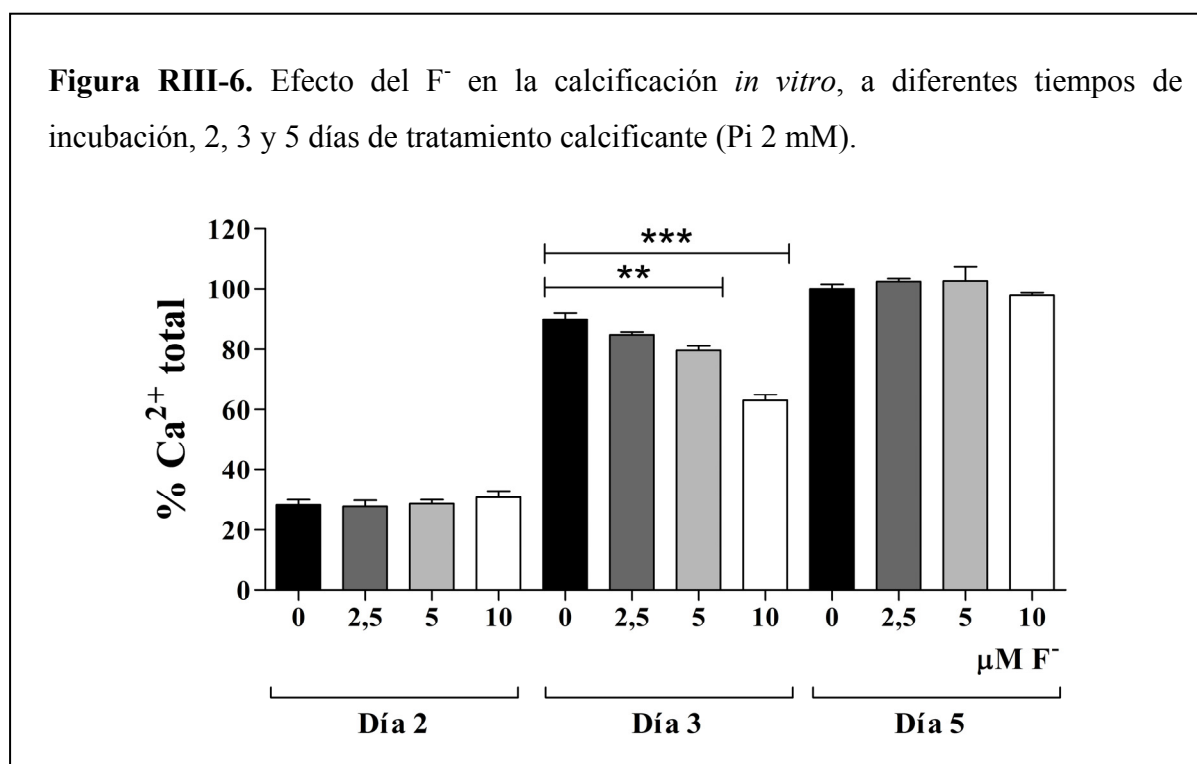
Se incubaron paralelamente células vivas y células muertas (fijadas con paraformaldehído al 4 %) con concentraciones crecientes de flúor. Como se esperaba por la falta de inhibidores de la calcificación, tras cinco días de incubación las células muertas calcificaron con una mayor intensidad que las células vivas para todas las concentraciones de flúor. Sin embargo, la disminución de la calcificación como consecuencia del efecto del flúor únicamente fue observado en células vivas (Figura RIII-5).



La calcificación en células muertas comienza días antes que en células vivas, por ello se planteó un experimento en el que se cuantificó el calcio depositado en células muertas a diferentes días. Así se pudo determinar si la ausencia de inhibición en células muertas se

debía únicamente a un artefacto del modelo *in vitro* prolongado en el tiempo, por saturación del depósito cálcico en el momento de comparación con las células vivas, o a la existencia de un efecto biológico en el proceso de inhibición de la calcificación. Como día de inicio de recolección de muestras se eligió el segundo día de incubación, ya que la calcificación no era todavía visible microscópicamente, empezando a detectarse al tercer día de tratamiento (segundas muestras recogidas). El tratamiento finalizó al quinto día, en el que en el experimento previo se había determinado que no había diferencias de calcificación con las concentraciones crecientes de flúor.

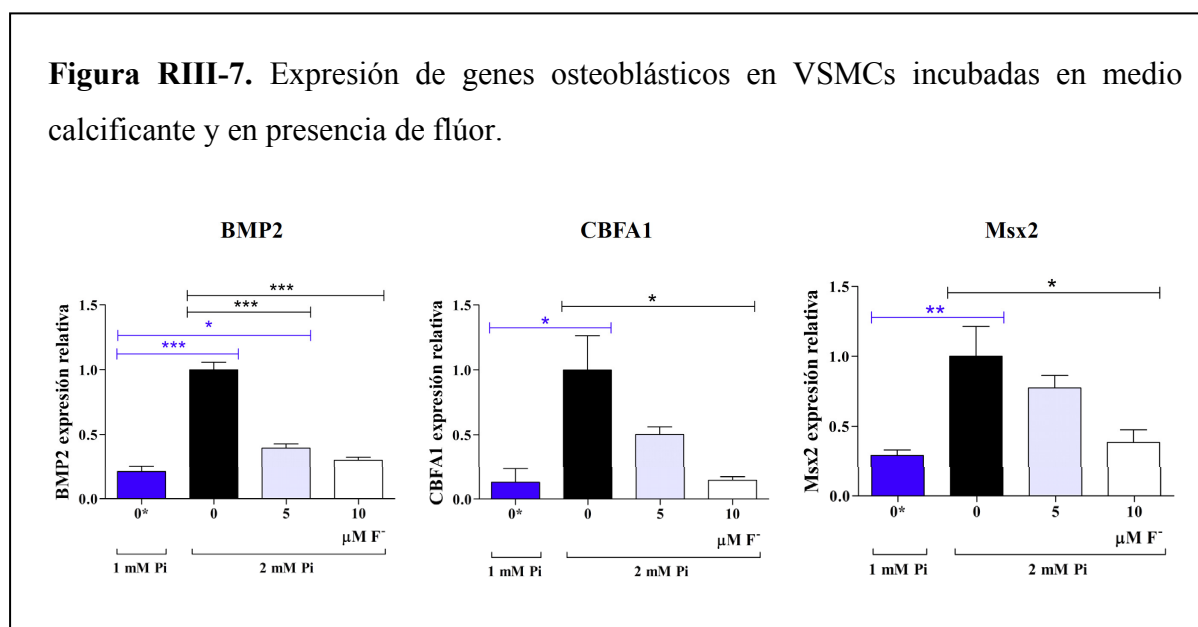
Como se observa en la figura RIII-6, el primer día en el que se detectó calcificación (día 3), el ion fluoruro la inhibió aunque en menor grado que en células vivas. En este caso la reducción de la calcificación fue 5, 11 y 30 % con el tratamiento con flúor a concentración 2,5, 5 y 10  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Sin embargo al prolongar el tratamiento calcificante se perdió la inhibición, lo cual indicaría que el flúor la evita enlenteciendo la calcificación, pero que ante la persistencia de una situación pro-calcificante, la actividad del flúor queda finalmente superada. Por tanto, esta inhibición observada tanto en las células vivas como muertas demuestra la mediación de la calcificación por un proceso físico. No obstante, no es descartable la implicación de un proceso biológico adicional, ya que la inhibición es mayor en células vivas que en muertas.



### III. E. EXPRESIÓN “*IN VITRO*” DE GENES OSTEABLÁSTICOS EN VSMCs TRATADAS CON FLÚOR EN PRESENCIA DE MEDIO CALCIFICANTE

Para determinar si el tratamiento con flúor inhibía la expresión de genes osteoblásticos de un modo similar a la calcificación, las VSMCs fueron incubadas en medio calcificante (Pi 2 mM) durante 5 días en presencia de distintas concentraciones de flúor, 0, 5 y 10  $\mu\text{M}$ . Como control negativo de la expresión de genes osteoblásticos se incubaron paralelamente VSMCs en condiciones normofosfatémicas (Pi 1 mM), en ausencia de flúor.

Como se observa en la figura RIII-7 el tratamiento con flúor inhibió la expresión de genes osteoblásticos en células calcificadas. La de BMP2 fue aproximadamente un 60 y 70 % menor en presencia de  $\text{F}^-$  5 y 10  $\mu\text{M}$ , respectivamente, y la de CBFA1 fue aproximadamente un 50 y 85 % menor con esas mismas concentraciones, de tal modo que la expresión de CBFA1 en células tratadas con  $\text{F}^-$  10  $\mu\text{M}$  fue similar a la expresión en células incubadas en medio normofosfatémico. De un modo similar, la expresión de Msx2 se redujo aproximadamente un 23 y 62 % con el mismo tratamiento tratamiento de  $\text{F}^-$  5 y 10  $\mu\text{M}$ , respectivamente.



### III. F. ANÁLISIS DE LOS DEPÓSITOS CÁLCICOS “IN VITRO” POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) Y DE TRANSMISIÓN (TEM)

#### 1. Estudio comparativo de los depósitos entre VSMCs vivas y muertas.-

A partir de los resultados sobre calcificación *in vitro*, explicados anteriormente, se concluyó que el efecto del flúor estaba provocado por la alteración del mecanismo físico de calcificación, aunque sin descartarse la implicación biológica. Por ello se realizó el estudio mediante microscopía electrónica de los depósitos en VSMCs incubadas en medio MEM en presencia de Pi 2 mM durante 5 días, en dos condiciones experimentales, células vivas y muertas, tratadas con F<sup>-</sup> 0, 2,5, 5 y 10 μM.

#### COMPOSICIÓN DE LOS DEPÓSITOS:

El análisis de los depósitos mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) (Tabla RIII-1) se realizó en fragmentos del fondo de los pocillos cubiertos con platino. Estos fragmentos fueron adheridos al soporte del microscopio usando cintas de carbono.

Se observó una clara diferencia en el ratio Ca/P entre células vivas (como media 1,18) y células muertas (como media 1,38). El ratio de hidroxiapatita es 1,67, para fosfato anhídrido 1,50 y para fosfato monobásico 1,0.

No hay evidencias de que el ion fluoruro tuviera efecto sobre el ratio Ca/P, ya que no hay diferencias significativas dependientes de la concentración de flúor. En el caso de las células muertas los ratios Ca/P fueron 1,32, 1,40, 1,38, 1,40 para F<sup>-</sup> 0, 2,5, 5 y 10 μM respectivamente. En el caso de las células vivas los ratios Ca/P fueron 1,23, 1,22, 1,30, 1,33 para F<sup>-</sup> 0, 2,5, 5 y 10 μM respectivamente.

El oxígeno se vio claramente incrementado en células muertas, lo que se corresponde con un mayor contenido de hidroxilos. Sin embargo se observó una mayor concentración de sales (sodio, potasio y cloro), azufre y nitrógeno en el caso de las células vivas.

**Tabla RIII-1.** Análisis de los depósitos mediante SEM. VSMCs incubadas con medio calcificante (Pi 2 mM) durante 5 días. V (vivas), M (muertas), los dígitos que acompañan a V o M se corresponden con la concentración ( $\mu\text{M}$ ) de flúor presente en el medio de tratamiento.

	V0	V2,5	V5	V10	M0	M2,5	M5	M10
<b>O</b>	15,95	13,01	23,21	19,33	20,83	29,79	23,00	26,03
<b>Ca</b>	1,23	1,22	1,30	1,33	1,32	1,40	1,38	1,40
<b>P</b>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
<b>Mg</b>	0,09	0,08	0,10	0,08	0,09	0,09	0,09	0,12
<b>Na</b>	0,29	0,30	0,40	0,20	0,22	0,24	0,17	0,15
<b>Cl</b>	0,04	0,06	0,06					
<b>K</b>	0,03	0,04	0,05	0,04				
<b>S</b>		0,05	0,06					

En el análisis realizado con el microscopio de transmisión (TEM) (Tabla RIII-2), sobre rejillas recubiertas de carbono, se colocó una gota de la muestra y se dejó evaporar. Cada muestra se preparó por raspado del fondo del pocillo, picado y dispersión con etanol en un mortero. Los resultados revelaron:

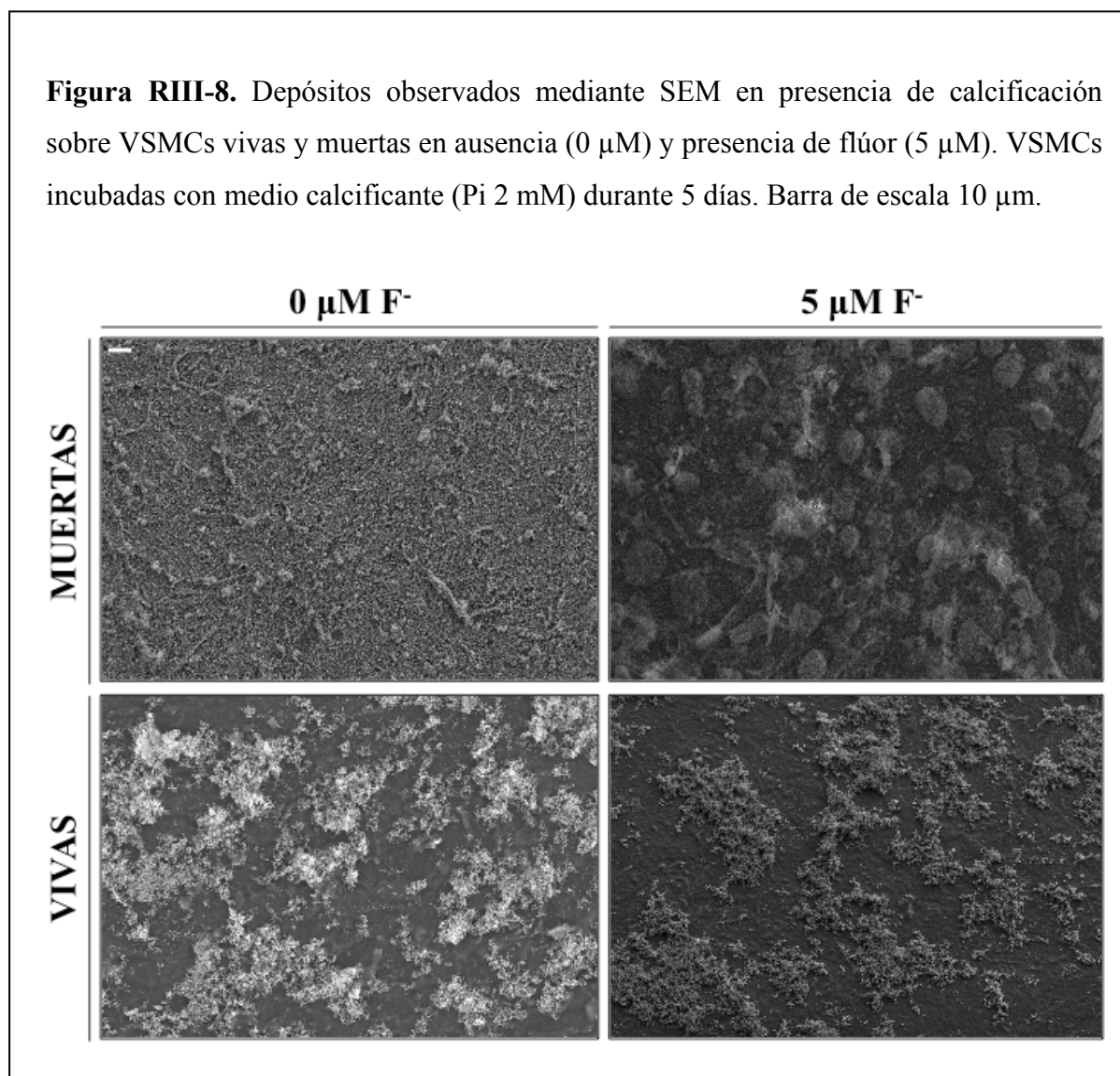
1. Una alta presencia de carbono en los depósitos de células.
2. Mayores ratios Ca/P en depósitos de células muertas que en los depósitos de células vivas.
3. Alta presencia de sales (Na, K, Cl) en células vivas.
4. Poca influencia de la concentración de flúor en la composición de los depósitos.

**Tabla RIII-2.** Análisis de los depósitos mediante TEM. VSMCs incubadas con medio calcificante (Pi 2 mM) durante 5 días. V (vivas), M (muertas), los dígitos que acompañan a V o M se corresponden con la concentración ( $\mu\text{M}$ ) de flúor presente en el medio de tratamiento.

	V0	V2.5	V10	M0	M2.5	M10
<b>C</b>	9,11	9,80	2,38	4,15	1,34	3,57
<b>O</b>	4,31	2,36	3,30	2,73	2,87	3,52
<b>Ca</b>	1,15	1,14	1,02	1,20	1,16	1,34
<b>P</b>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
<b>Mg</b>	0,10	0,07	0,08	0,08	0,05	0,07
<b>Na</b>	0,22	0,06	0,12			0,17
<b>Cl</b>	0,08					0,04
<b>K</b>		0,01				0,03
<b>S</b>		0,02				

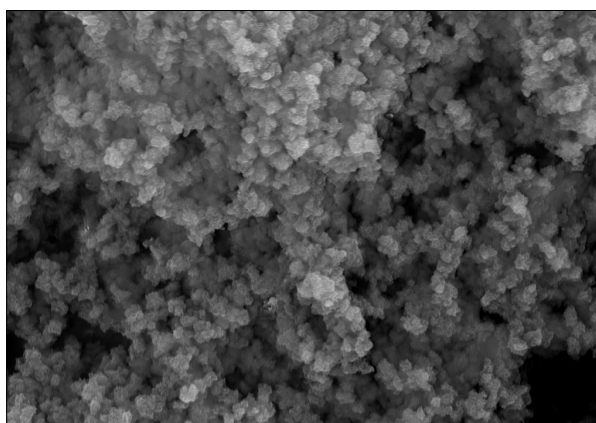
## TEXTURA:

La observación con SEM reveló que las calcificaciones presentes en células muertas fueron masivas y cubrieron la superficie total del pocillo. En ausencia de flúor la superficie mostró una forma aplanada y uniforme, mientras en presencia de éste, aparecieron granos porosos de un tamaño de 10 a 20  $\mu\text{m}$ . En el caso de las células vivas, las calcificaciones formaron islas de crecimiento en altura, las cuales no cubrieron la superficie del pocillo (Figura RIII-8).

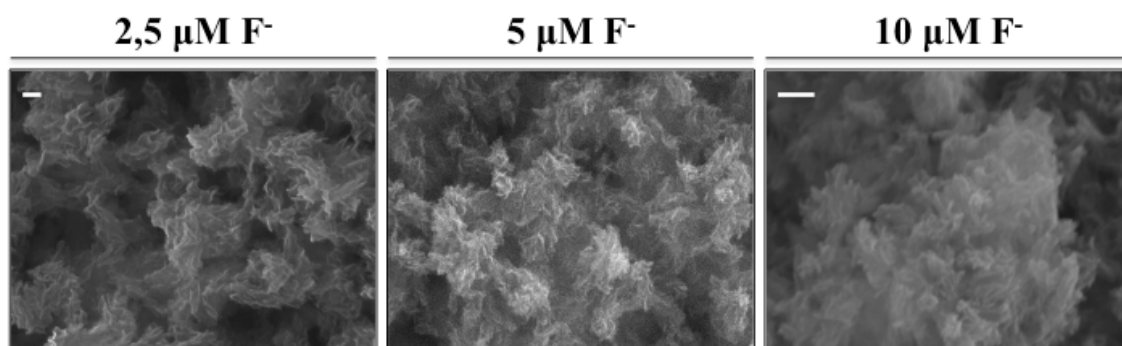


A mayores aumentos los depósitos tomaron forma de cristales laminares con un tamaño de 30-50 nm, que en su conjunto formaban esferolitos de 200 a 600 nm (Figura RIII-9). Se observó como a medida que se incrementaba la concentración de flúor los cristales evolucionaron tomando forma de varilla, observándose agregados más densos. Este patrón se observó tanto en células muertas (Figura RIII-10) como en células vivas (Figura RIII-11).

**Figura RIII-9.** Depósitos observados mediante SEM en forma glomerular (esferolitos) en VSMCs vivas, calcificadas en ausencia de flúor, incubadas con medio calcificante (Pi 2 mM) durante 5 días.

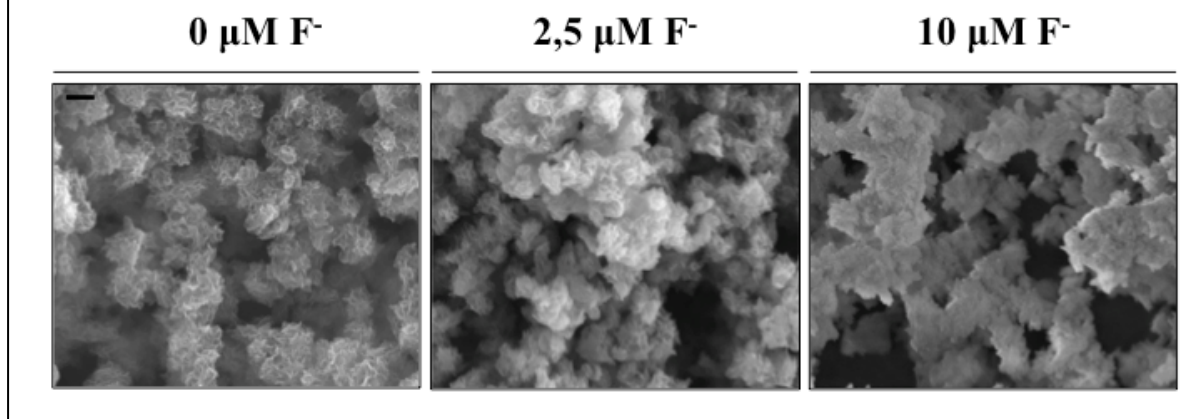


**Figura RIII-10.** Depósitos observados mediante SEM en VSMCs muertas calcificadas, incubadas durante 5 días en medio calcificante (Pi 2 mM) en presencia de flúor. Barra de escala 100 nm.





**Figura RIII-11.** Depósitos observados mediante SEM en VSMCs vivas calcificadas, incubadas durante 5 días en medio calcificante (Pi 2 mM), en ausencia y presencia de flúor. Barra de escala 200 nm.



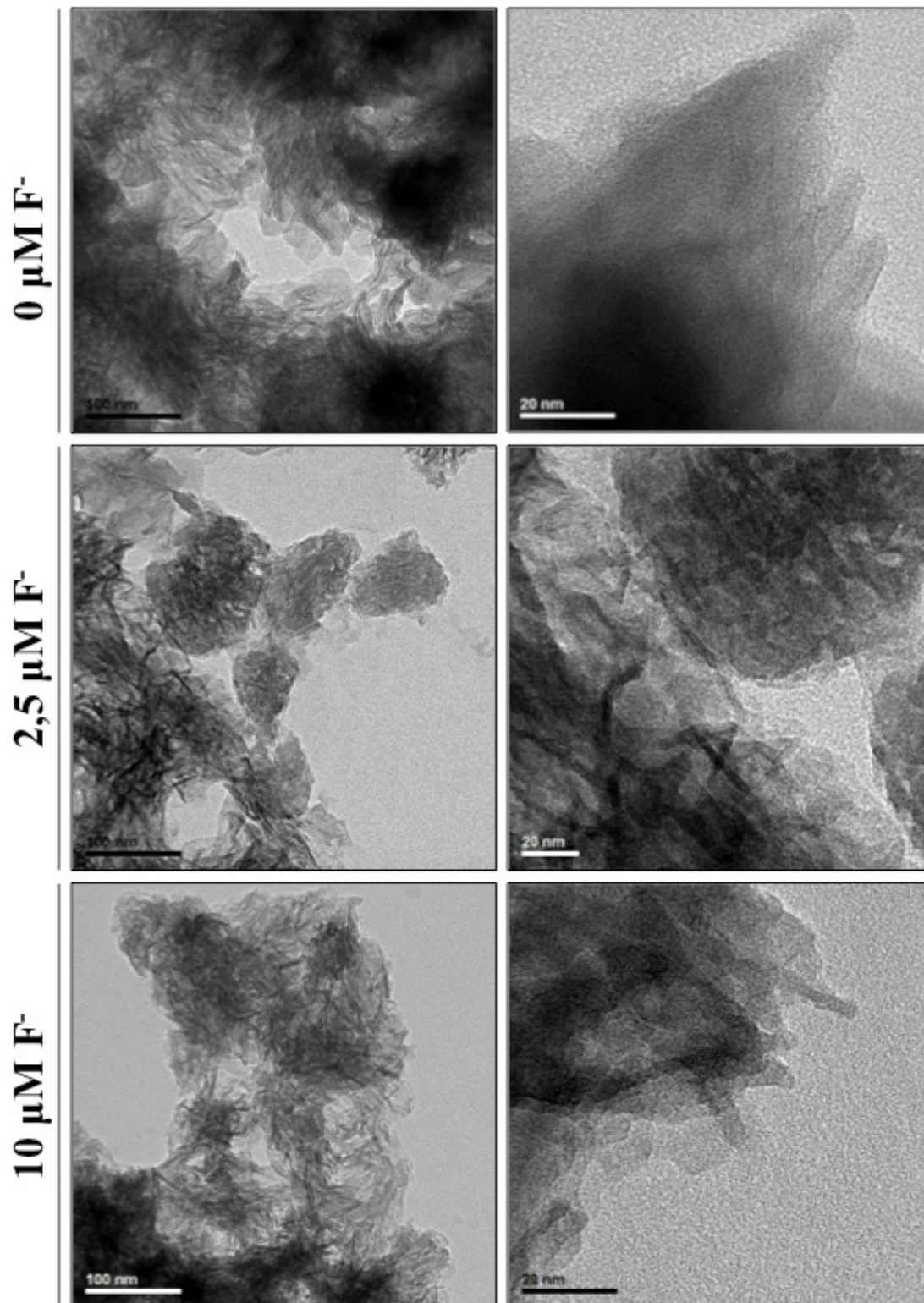
#### NANOESTRUCTURA:

Esta observación se realizó con TEM. El medio de dispersión de las muestras fue etanol (en lugar de agua) para preservar las sales solubles en agua en su estado original.

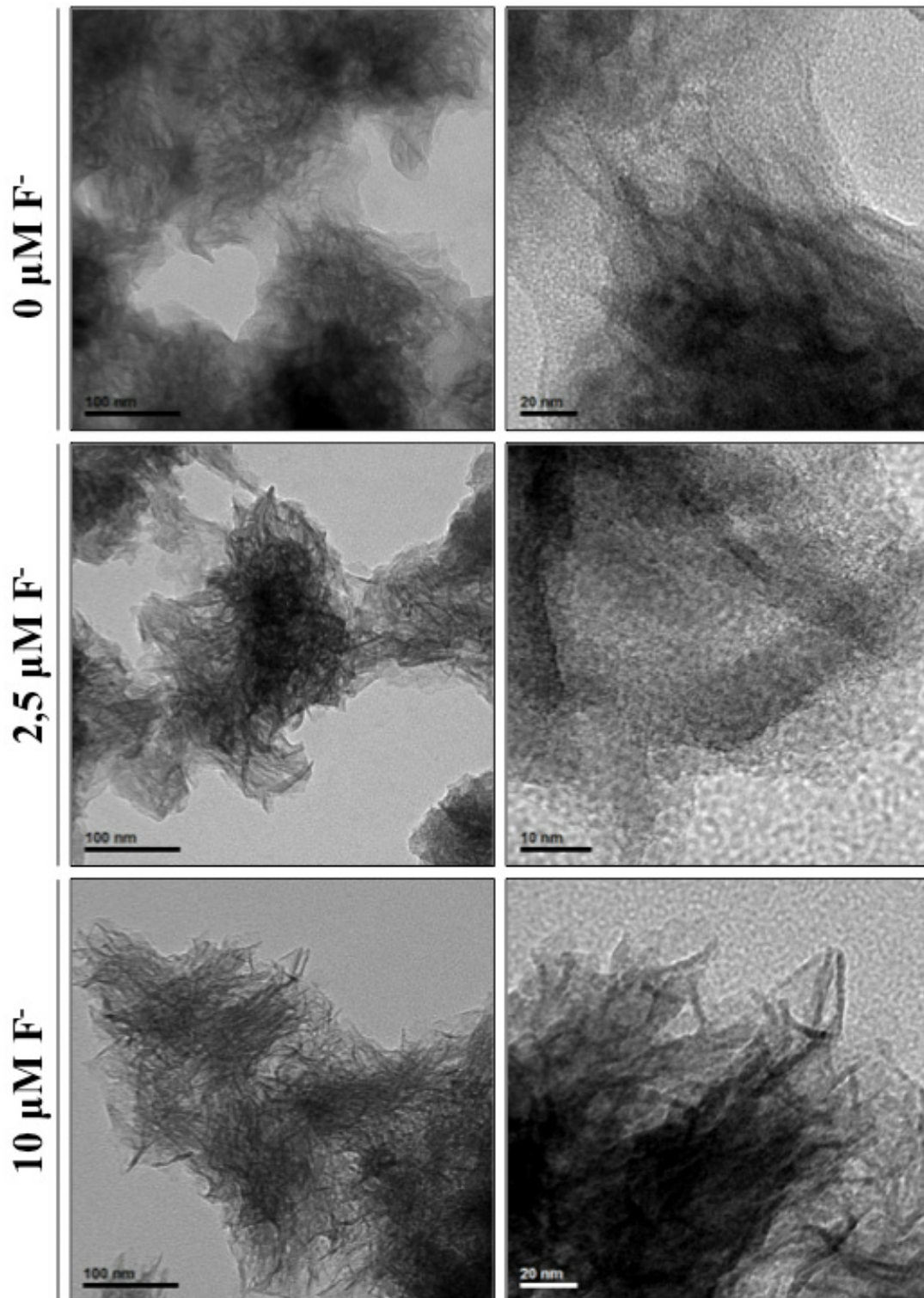
En el caso de las células muertas (Figura RIII-12) en ausencia de flúor la estructura de glomérulos (esferolitos) formaba un denso empaquetamiento de partículas laminares entrecruzadas. En imágenes de alta resolución los planos cristalinos no fueron frecuentes, aunque ocasionalmente se observaron partículas definidas de 5 nm de longitud. Las células muertas tratadas con F<sup>-</sup> 2,5 μM presentaron una estructura que comenzó a transformarse en fibrilar y más densa en algunas áreas. A concentración 10 μM las fibrillas se transformaron en barras, y el empaquetamiento fue mucho más denso, observándose planos cristalinos en partículas de alrededor de 6 nm.

En el caso de las células vivas (Figura RIII-13) en ausencia de flúor la estructura fue más fibrilar, y estas fibras presentaron una apariencia menos curvada que en los depósitos en células muertas. Como ocurrió en el caso de las células muertas, conforme la concentración de flúor se incrementó, las partículas laminares desaparecieron, las fibrillas se acortaron y engrosaron y apareció un empaquetamiento más denso, transformándose en estructuras alargadas cristalinas casi totalmente definidas.

**Figura RIII-12.** Depósitos observados mediante TEM en VSMCs muertas calcificadas, incubadas durante 5 días en medio calcificante (Pi 2 mM), en ausencia y presencia de flúor.



**Figura RIII-13.** Depósitos observados mediante TEM en VSMCs vivas calcificadas, incubadas durante 5 días en medio calcificante (Pi 2 mM), en ausencia y presencia de flúor.



En conclusión, la nanoestructura de los depósitos observados en células muertas en ausencia de flúor consistió en nanopartículas de 30 nm con una forma laminar y partículas alargadas. En el caso de las células vivas la forma de las partículas fue más fibrilar que laminar. Tanto en células vivas como en muertas, la presencia de flúor favoreció el aumento de densidad en el empaquetamiento y forma fibrilar, dando a 10 nm forma de varilla. En ausencia de flúor los cristales con planos definidos fueron difíciles de encontrar, presentando formas redondeadas y grandes, 5 nm. En presencia de alta concentración de flúor se observaron partículas alargadas cristalinas casi totalmente definidas. Por lo tanto, el flúor tuvo un efecto aparente en la forma de las partículas, induciendo la transformación de láminas a forma de varilla, reforzándose esta tendencia en células vivas.

## 2. Estudio comparativo de los depósitos en VSMCs muertas en función del tiempo (días) de incubación con medio calcificante (Pi 2 mM) / calcificación.-

Debido a que incubaciones prolongadas con medio con alto fosfato (Pi 2 mM) dieron lugar a la pérdida de la inhibición de la calcificación por efecto del flúor, se analizaron los depósitos en VSMCs muertas incubadas con medio calcificante durante diferentes días:

- Día 2: incipiente calcificación.
- Día 3: inicio de la calcificación, efecto inhibitorio del flúor presente.
- Día 5: calcificación masiva, pérdida del efecto inhibitorio del flúor.

### COMPOSICIÓN DE LOS DEPÓSITOS:

Se realizó el análisis químico por SEM.

La relación Ca/P fue baja al día 2 (excepto en las VSMCs tratadas con  $F^-$  2,5  $\mu$ M), aumentó al tercer día y se mantuvo con valores similares al quinto día. No se observaron variaciones regulares con el tratamiento con flúor (Tabla RIII-3).

**Tabla RIII-3.** Análisis de los depósitos mediante SEM. Se utilizó la siguiente nomenclatura: D2, D3 y D5 para los días 2, 3 y 5; F0, F2,5, F5 y F10 para las distintas concentraciones de flúor.

<b>Muestra</b>	<b>Días</b>	<b>[F] <math>\mu</math>M</b>	<b>Ca/P</b>
<b>D2 F0</b>	2	0	1,17
<b>D2 F2.5</b>	2	2,5	1,42
<b>D2 F5</b>	2	5	1,09
<b>D2 F10</b>	2	10	1,18
<b>D3 F0</b>	3	0	1,40
<b>D3 F2.5</b>	3	2,5	1,37
<b>D3 F5</b>	3	5	1,36
<b>D3 F10</b>	3	10	1,35
<b>D5 F0</b>	5	0	1,37
<b>D5 F2.5</b>	5	2,5	1,37
<b>D5 F5</b>	5	5	1,40
<b>D5 F10</b>	5	10	1,40

#### TEXTURA:

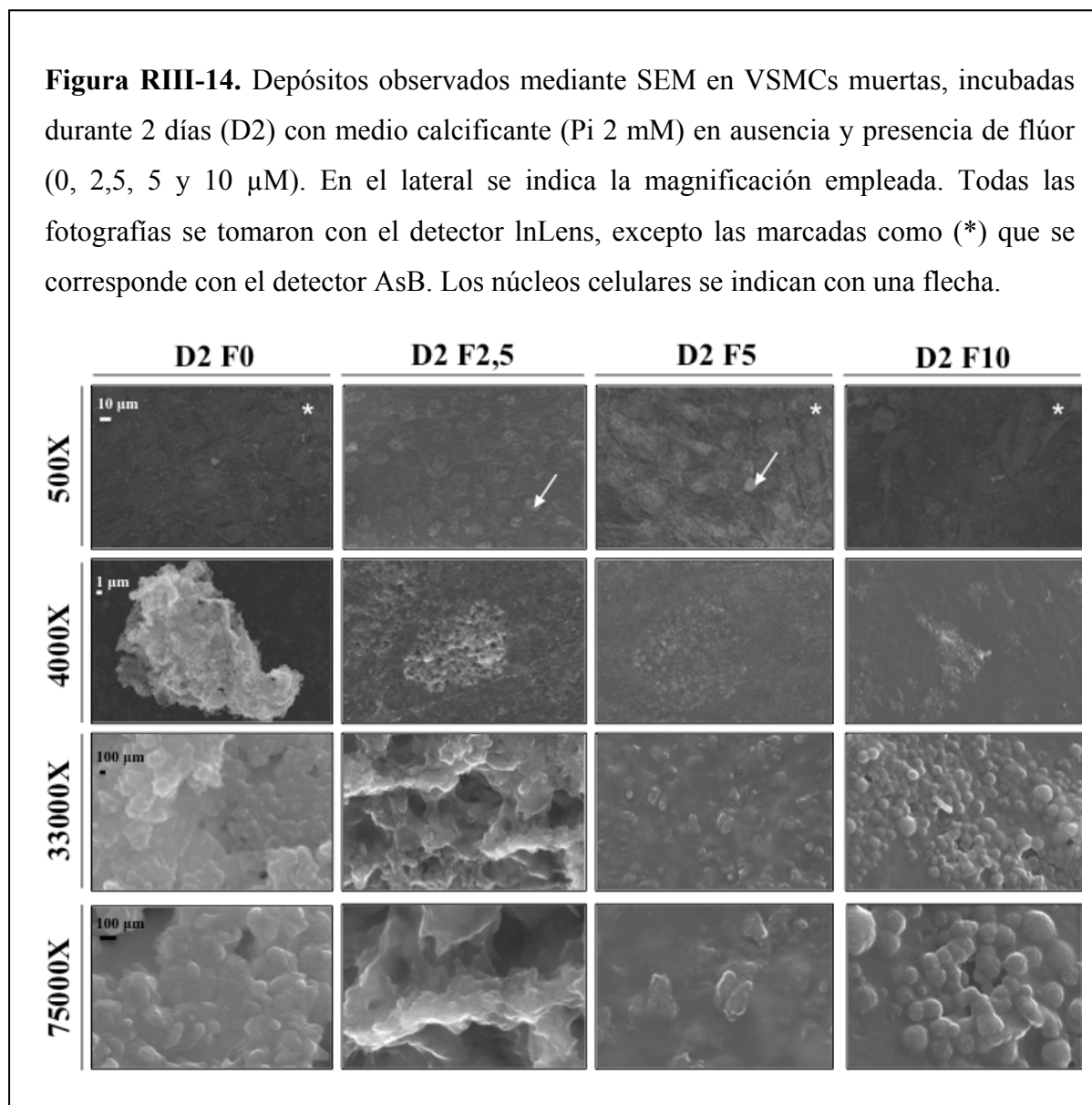
Se utilizaron dos tipos de detectores: 1) InLens, el cual capta electrones secundarios y da una buena resolución topográfica de la superficie; y 2) AsB, el cual capta electrones retrodispersados y que ofrece una buena imagen de la composición y de la orientación cristalina. Se utilizó la siguiente nomenclatura: D2, D3 y D5 para los días 2, 3 y 5; F0, F2,5, F5 y F10 para las distintas concentraciones de flúor.

Tras dos días de incubación con medio calcificante (D2) (Figura RIII-14) a baja magnificación (500X) la imagen topográfica (detector InLens) de las muestras D2 0F mostró una superficie prácticamente lisa, con algunos, escasos, granos sueltos. La imagen composicional (detector AsB) fue también uniforme y oscura, lo que indica que apenas había elementos de alta densidad electrónica (es decir, calcio) en toda la superficie. A más magnificación (4000X) se observó que los granos tenían algunas micras de tamaño y una estructura de terrazas, es decir, de plataformas superpuestas con dimensiones cada vez más estrechas, para acabar en partículas de unos 100 nm (33000X) que a la máxima magnificación (75000 X) mostraron un granulado todavía más fino en su superficie, de algunos nm. A alta magnificación se observaron agrupaciones de esferas de unos cientos de nanómetros, con una subestructura en terrazas como la descrita anteriormente. Esta textura



también apareció en las muestras con flúor, en éstas la imagen de las células apareció más marcada. A alta magnificación se apreció el nacimiento de cristalitas en la zona del núcleo.

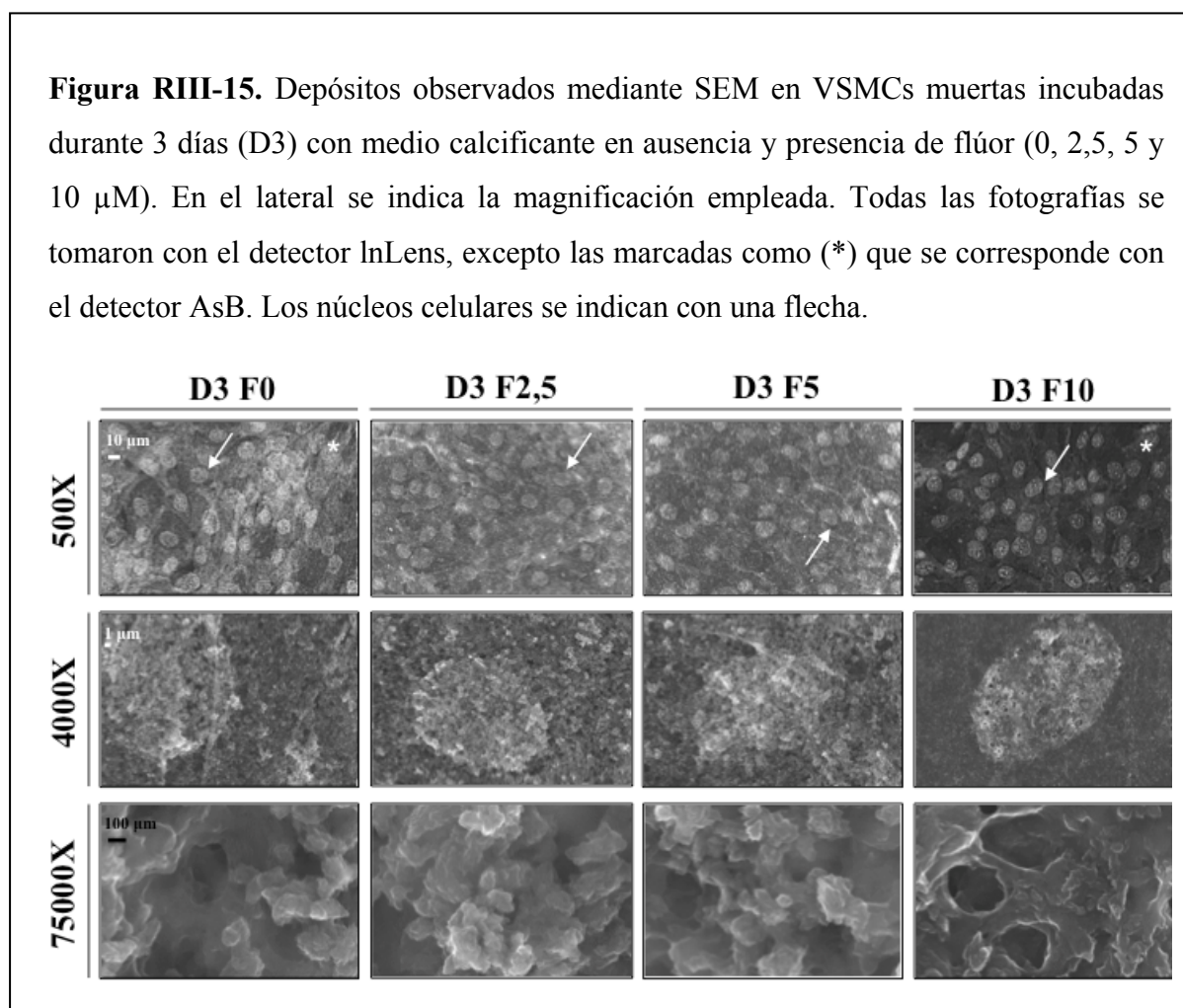
**Figura RIII-14.** Depósitos observados mediante SEM en VSMCs muertas, incubadas durante 2 días (D2) con medio calcificante (Pi 2 mM) en ausencia y presencia de flúor (0, 2,5, 5 y 10  $\mu$ M). En el lateral se indica la magnificación empleada. Todas las fotografías se tomaron con el detector InLens, excepto las marcadas como (\*) que se corresponde con el detector AsB. Los núcleos celulares se indican con una flecha.



En las muestras correspondientes al día 3 (Figura RIII-15) en ausencia de flúor (D3 F0) la imagen topográfica (InLens) a baja magnificación mostró claramente el esqueleto del cultivo celular, es decir el núcleo y los bordes de las células. En la imagen química y cristalográfica (AsB) se observó una mayor acumulación de elementos pesados de alta densidad electrónica (es decir, calcio) sobre el núcleo. Los depósitos de fosfato de calcio se formaron inicialmente sobre el núcleo de la célula o dentro de él como ya se vislumbraba en

alguna de las muestras D2. A más magnificación se observó que fuera del núcleo había una capa de pequeños cristales sueltos sobre la superficie, mientras que en el núcleo había ya un montículo de cristales superpuestos apilados en forma de terrazas. En la parte superior el tamaño de las partículas fue menor de 100 nm. Según aumentó la concentración de flúor, el montículo de pequeños cristales sobre el núcleo fue más bajo y en la F10 fue completamente plano. Aparentemente el flúor frenó el desarrollo de la cristalización, especialmente sobre el núcleo.

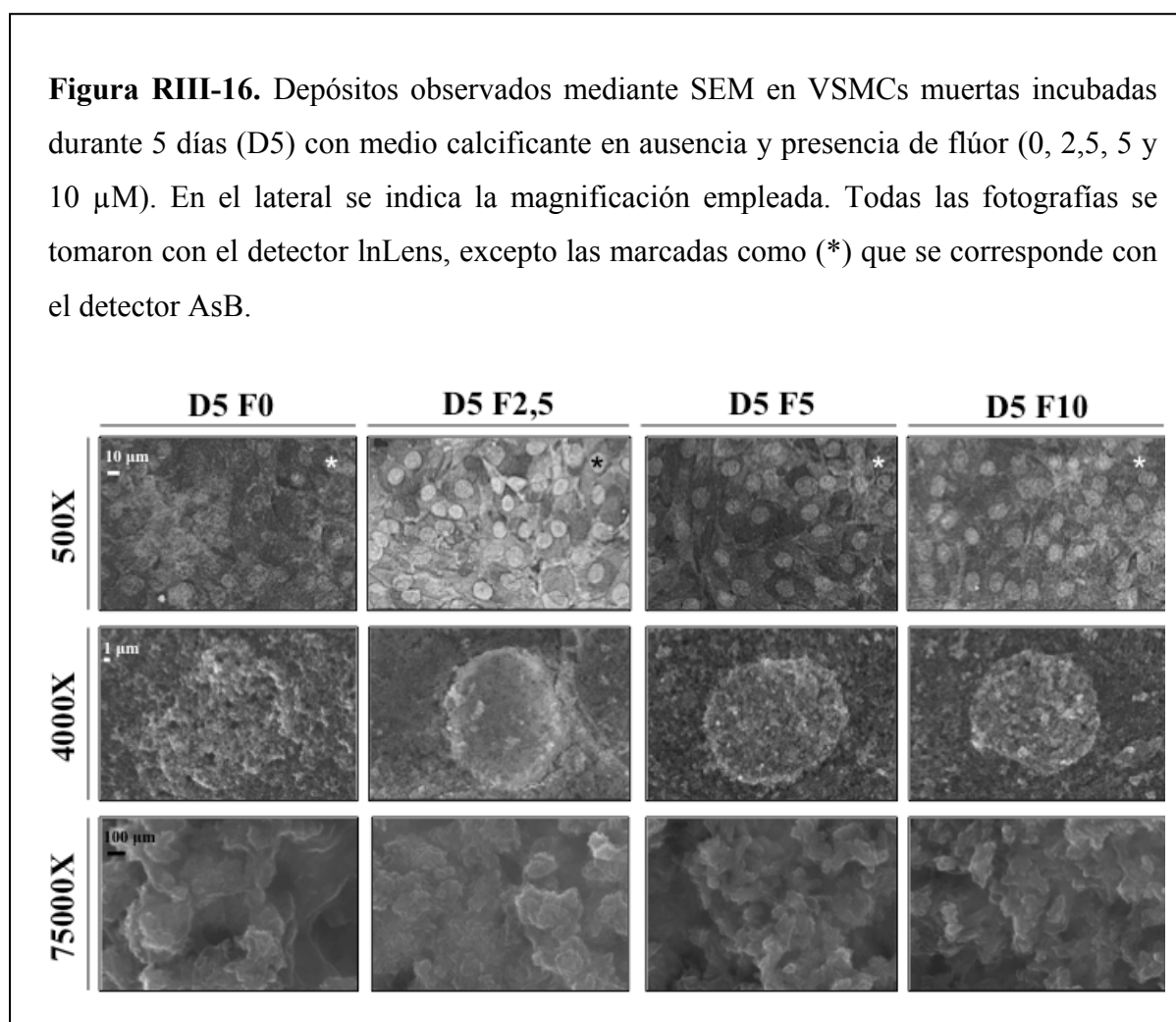
**Figura RIII-15.** Depósitos observados mediante SEM en VSMCs muertas incubadas durante 3 días (D3) con medio calcificante en ausencia y presencia de flúor (0, 2,5, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ). En el lateral se indica la magnificación empleada. Todas las fotografías se tomaron con el detector InLens, excepto las marcadas como (\*) que se corresponde con el detector AsB. Los núcleos celulares se indican con una flecha.



Tras cinco días (D5) de incubación con medio calcificante (Figura RIII-16) la imagen química fue muy uniforme, mostrando concentraciones de calcio muy similares sobre toda la superficie, aunque muy punteada, indicando que el tamaño de los cristales era muy pequeño, como efectivamente se comprobó a más magnificación. En la imagen topográfica, sin

embargo se observó una mayor acumulación de fosfato cálcico sobre el núcleo, donde aparecieron montículos altos, coronados por partículas de tamaño del orden de algunas decenas de nm. No obstante el desarrollo de los montículos siguió siendo aterrazado. Al aumentar la concentración de flúor, la intensidad en imagen química fue menor en general y más concentrada sobre los núcleos, donde por otra parte los montículos decrecieron en altura, hasta que para F10 sólo se observó una capa de cristales fuera del núcleo, sobre el núcleo el montículo presentó varias capas pero fue todavía bastante plano.

**Figura RIII-16.** Depósitos observados mediante SEM en VSMCs muertas incubadas durante 5 días (D5) con medio calcificante en ausencia y presencia de flúor (0, 2,5, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ). En el lateral se indica la magnificación empleada. Todas las fotografías se tomaron con el detector InLens, excepto las marcadas como (\*) que se corresponde con el detector AsB.



Los resultados revelaron que:

- La precipitación se produjo sobre o dentro de las células y no en el seno del medio de cultivo.



- La precipitación fue considerablemente más abundante sobre o dentro del núcleo de las células.
- Al segundo día, la precipitación apenas había comenzado, pero en el tercero ya era bastante apreciable y al quinto día fue masiva, cubriendo completamente la superficie de los pocillos.
- La precipitación se desarrolló en capas, mediante la formación de partículas planas, extensión lateral rápida formando una capa, nucleación secundaria sobre la primera capa y así sucesivamente.
- El flúor no cambió el mecanismo precipitación pero la frenó, en cuanto a cantidad total depositada en la extensión lateral de las capas (los depósitos fueron más porosos) y sobre todo en la nucleación secundaria sobre la superficie de las capas (depósitos más planos).

### III. G. EFECTO DEL FLÚOR EN LA CALCIFICACIÓN “*IN VIVO*”

Para confirmar el efecto inhibitorio del flúor sobre la calcificación vascular se usó un modelo animal de calcificación vascular e insuficiencia renal crónica, el cual consistió en ratas sometidas a nefrectomía 5/6 (Shobeiri y cols., 2010).

Se adquirieron ratas sanas de 1,5 meses de edad y se sometieron en nuestras instalaciones a la intervención mencionada. En primer lugar estos animales fueron sometidos a la resección de los dos polos del riñón izquierdo y una semana después se procedió a la extirpación completa del riñón derecho (como se detalla en Material y métodos).

Al cabo de una semana de recuperación los animales se dividieron en seis grupos.

Se fijaron tres grupos diferentes como control negativo. Dos grupos fueron los controles negativos, y en ellos los animales no fueron sometidos a nefrectomía pero se les administró pienso con fosfato, a concentración normal, Pi al 0,6 % (Grupo: Normal + 0,6 % Pi), o al 1,2 %, concentraciones altas (Grupo: Normal + 1,2 % Pi). Además, hubo un tercer grupo control negativo, en el que los animales consumieron pienso con Pi al 0,6 % y habían sido sometidos a nefrectomía (Grupo: Nx + 0,6 % Pi).

El grupo control positivo se compuso de animales nefrectomizados, los cuales ingirieron una dieta con alta concentración de fosfato (Grupo: Nx + 1,2 % Pi). El quinto y

sexto grupo estuvieron formados por animales nefrectomizados, que consumieron una dieta con Pi al 1,2 % y agua fluorada, un grupo a concentración 1,5 mg F<sup>-</sup>/l (Grupo: Nx + 1,2 % Pi + 1,5 F) y el otro grupo a concentración 10 veces superior, 15 mg F<sup>-</sup>/l (Grupo: Nx + 1,2 % Pi + 15 F).

Estos tratamientos se prolongaron 4,5 meses debido a que no se usó vitamina D<sub>3</sub> como acelerador de la calcificación.

Tanto pienso como agua fueron suministrados *ad-libitum*. En la tabla RIII-4 se muestran los consumos de agua y pienso durante el tratamiento de los animales. El consumo de pienso no mostró diferencias entre los grupos de tratamiento y los controles. En el caso de la ingesta de agua, ésta fue significativamente mayor en el caso de los animales nefrectomizados frente a los animales sanos.

**Tabla RIII-4.** Consumos de agua y pienso durante el tratamiento. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar.

‡ Significativamente diferentes con respecto al grupo Normal + 0,6 % Pi (control negativo). Agua y pienso se refieren al consumo por animal

Grupo	Consumo de agua (ml/rata/día)	Consumo de pienso (g/rata/día)
Normal + 0,6 % Pi	24 $\pm$ 0,7	20 $\pm$ 0,8
Normal + 1,2 % Pi	25 $\pm$ 0,7	23 $\pm$ 0,3
Nx + 0,6 % Pi	42 $\pm$ 0,6‡	25 $\pm$ 0,6
Nx + 1,2 % Pi	43 $\pm$ 0,8‡	22 $\pm$ 0,8
Nx + 1,2 % Pi + 1,5 F	45 $\pm$ 1,2‡	25 $\pm$ 1,0
Nx + 1,2 % Pi + 15 F	43 $\pm$ 0,7‡	23 $\pm$ 1,1

Tras 4,5 meses de tratamiento los animales fueron anestesiados y se procedió a la extracción de sangre y orina para determinar la existencia de enfermedad renal y relacionarlos con la calcificación vascular, resultados mostrados en la tabla RIII-5 y 6. También se extrajo corazón y aorta, y la aorta fue procesada para cuantificar calcio y para microscopía.

**Tabla RIII-5.** Valores de perfil renal en plasma y parámetros relacionados con la calcificación vascular. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar.

‡ Significativamente diferentes con respecto al grupo Normal + 0,6 % Pi (control negativo).

\* Significativamente diferentes con respecto al grupo Nx + 1,2 % Pi (control positivo).

Grupo	Urea (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	Ca (mg/dl)	Pi (mg/dl)
Normal + 0,6 % Pi	31,4 $\pm$ 3,8	0,9 $\pm$ 0,1	13,0 $\pm$ 0,7	11,0 $\pm$ 0,8
Normal + 1,2 % Pi	32,2 $\pm$ 2,4	0,8 $\pm$ 0,1	12,4 $\pm$ 0,3	12,6 $\pm$ 2,4
Nx + 0,6 % Pi	135,4 $\pm$ 38,3	2,1 $\pm$ 0,5	11,6 $\pm$ 0,1	11,5 $\pm$ 2,1
Nx + 1,2 % Pi	97,8 $\pm$ 25,7	2,0 $\pm$ 0,3‡	10,5 $\pm$ 0,9	17,3 $\pm$ 4,0
Nx + 1,2 % Pi + 1,5 F	141,3 $\pm$ 1,7	2,6 $\pm$ 0,1‡	8,2 $\pm$ 0,3‡	31,0 $\pm$ 2,0‡*
Nx + 1,2 % Pi + 15 F	194,8 $\pm$ 16,0‡	3,1 $\pm$ 0,2‡*	8,0 $\pm$ 0,4‡	33,7 $\pm$ 1,4‡*

**Tabla RIII-6.** Valores de perfil renal en orina y parámetros relacionados con la calcificación vascular. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar.

‡ Significativamente diferentes con respecto al grupo Normal + 0,6 % Pi (control negativo).

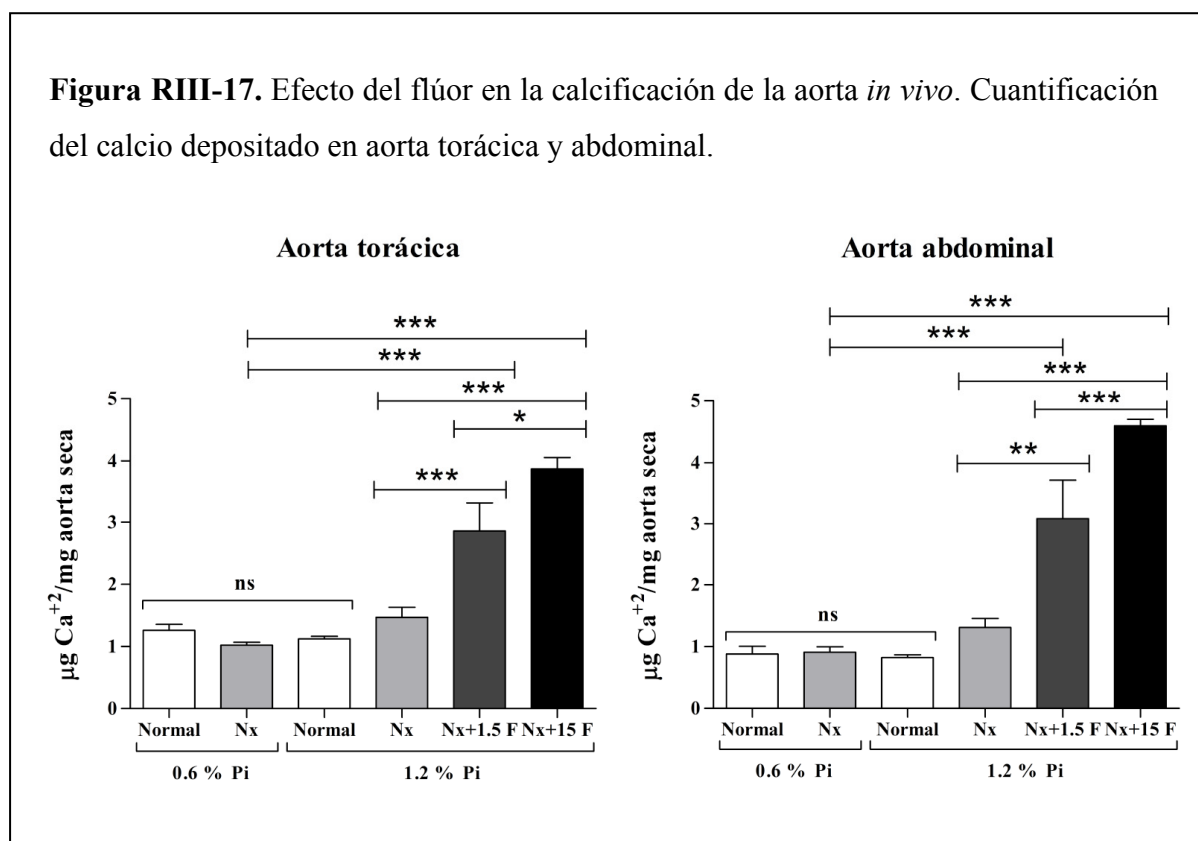
\* Significativamente diferentes con respecto al grupo Nx + 1,2 % Pi (control positivo).

Grupo	Creatinina (mg/dl)	Pi (mg/dl)
Normal + 0,6 % Pi	112,3 $\pm$ 28,5	5,3 $\pm$ 4,0
Normal + 1,2 % Pi	131,2	246,3 $\pm$ 76,5‡
Nx + 0,6 % Pi	46,3 $\pm$ 9,8‡	21,3 $\pm$ 19,1
Nx + 1,2 % Pi	48,8 $\pm$ 8,4‡	418,5 $\pm$ 23,8‡
Nx + 1,2 % Pi + 1,5 F	42,0 $\pm$ 12,9‡	387,9 $\pm$ 55,3‡
Nx + 1,2 % Pi + 15 F	28,2 $\pm$ 4,9‡	349,2 $\pm$ 24,8‡

Como se observa en la Tabla RIII-5 los animales nefrectomizados presentaron mayores concentraciones de urea, creatinina y fosfato en plasma que los grupos control negativo, compuestos por animales no nefrectomizados. El tratamiento con flúor incrementó todavía más estos parámetros, y disminuyó la concentración de calcio en comparación al grupo control positivo, grupo que también consumía Pi al 1,2 %.

En la Tabla RIII-6 se observa que los animales nefrectomizados muestran una reducción en la excreción de creatinina por orina, siendo todavía menor en el grupo de

animales que consumían agua con 15 mg F<sup>-</sup>/l. Los animales tratados con flúor presentaron una menor concentración de fosfato en orina que los animales control positivo.



Como se observa en la figura RIII-17 tras 4,5 meses de tratamiento el grupo control positivo, compuesto por animales nefrectomizados y que ingirieron pienso con Pi al 1,2 %, mostró un incremento de la calcificación del 14 % en el caso de la aorta torácica y de un 33 % en el caso de la aorta abdominal respecto a los grupos control negativo (animales no nefrectomizados o nefrectomizados y que ingirieron pienso con Pi al 0,6 %). Mientras que los grupos que bebieron agua fluorada mostraron un grado de calcificación significativamente mucho mayor frente a los controles negativos.

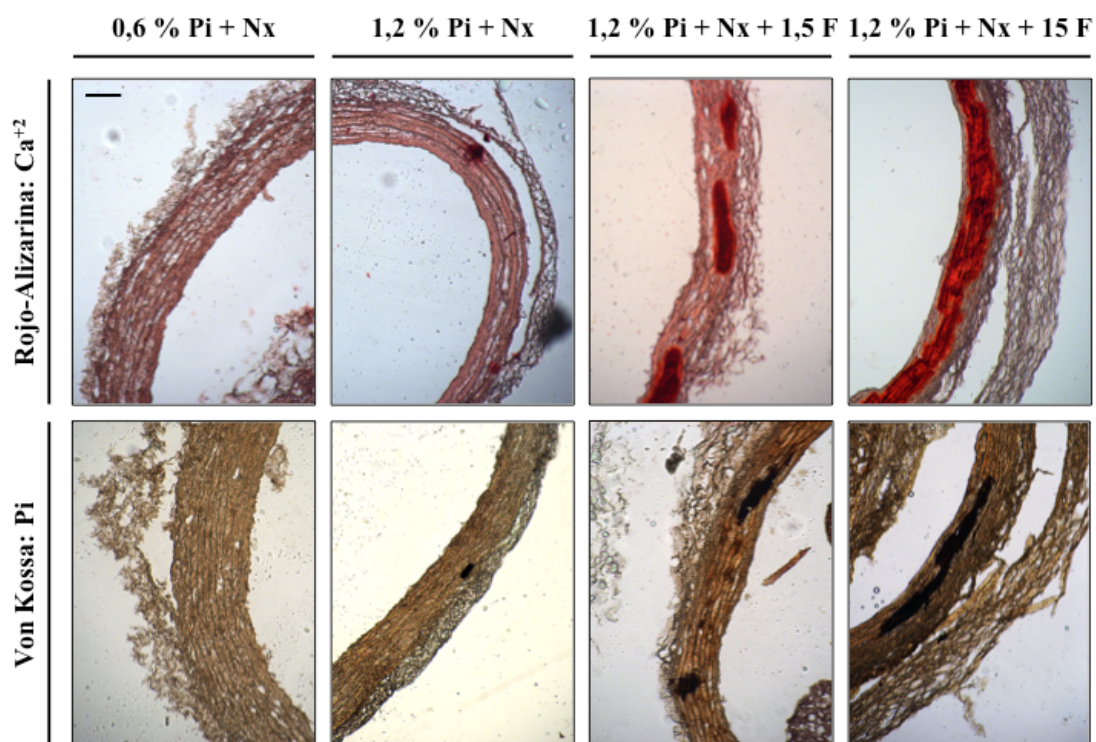
Los animales que bebieron agua con 1,5 mg F<sup>-</sup>/l mostraron un incremento de la calcificación en el caso de la aorta torácica del 56 % y del 63 % en el caso de la aorta abdominal frente a los controles negativos y de un 49 % en el caso de la aorta torácica y de un 45 % en el caso de la aorta abdominal frente al control positivo. En el caso de los animales que ingirieron agua con 15 mg F<sup>-</sup>/l el incremento de la calcificación en el caso de la aorta torácica y abdominal fue de un 62 % y 72 % respectivamente frente a los controles negativos,

y de un 67 % en el caso de la aorta torácica y de un 81 % en el caso de la aorta abdominal frente al control positivo. El grado de calcificación de aorta torácica y abdominal fue un 26 % y 48 % respectivamente, mayor en los animales que ingirieron agua con 15 mg F<sup>-1</sup>/l frente a los que bebieron agua con 1,5 mg F<sup>-1</sup>/l.

Estos resultados se confirmaron mediante las tinciones de rojo de alizarina y von Kossa de secciones de aorta de los animales en tratamiento (Figura RIII-18).

**Figura RIII-18.** Efecto del flúor en la calcificación de la aorta *in vivo*: ratas Wistar sometidas a nefrectomía y alimentadas con pienso con Pi al 0,6 % (control negativo), Pi al 1,2 % (control positivo) y Pi al 1,2 % junto con 1,5 ó 15 mg F<sup>-1</sup>/l en el agua de bebida.

Tinción de rojo de alizarina (tinción de calcio) y von Kossa (tinción de fosfato) de secciones de la aorta de los animales tratados. Barra de escala 200 μm.



## **V. DISCUSIÓN**



## **PARTE I. ENVEJECIMIENTO DE LAS VSMCs**

En esta primera parte se han realizado paralelamente dos estudios diferentes. Por un lado, se ha estudiado el efecto de la edad del animal donante, mediante la comparación de diferentes bioindicadores de senescencia y VSMCs, entre células de donantes de diferentes edades, lo que se relacionaría con el envejecimiento *in vivo*. Por otro lado, se ha estudiado el envejecimiento de las células en cultivo, tras la acumulación de divisiones en cultivo, lo que se podría relacionar con el envejecimiento *in vitro*.

### **I. A. ENVEJECIMIENTO CELULAR Y DESDIFERENCIACIÓN DE VSMCs**

#### **1. Evolución de los cultivos primarios.-**

Ausencia de cese de la división celular: Se ha demostrado en estudios llevados a cabo por diferentes grupos que las células somáticas alcanzan la senescencia tras un determinado número de divisiones (Hayflick y cols., 1961; Holliday, 1995).

En este caso no se ha llegado a lograr el cese total de las divisiones en ninguna de las líneas empleadas, es decir, ni las células extraídas de animales de 2, ni de 12 ni de 24 meses han conseguido alcanzar la senescencia durante el tiempo en cultivo, lo que podría llegar a explicarse de diferentes formas. Cabe destacar que no hay ninguna referencia sobre el número de divisiones (*CPDs-cumulative population doublings*) a las que las VSMCs de rata cesan su multiplicación.

La senescencia puede alcanzarse por medio de varios mecanismos, los cuales podríamos clasificar como independientes de los telómeros (inducción de senescencia por estrés y activación de reguladores negativos del ciclo celular y de oncogenes) o dependientes de los telómeros (Serrano y cols., 1997; Bodnar y cols., 1998; Rai y cols., 2009; Mackenzie y cols., 2011).

Durante el cultivo, estas células no han sido sometidas a estímulos estresantes, más allá de los que puedan derivarse de su mantenimiento en cultivo. Sin embargo, estos últimos no los hemos considerado ya que se han evitado en todo lo posible utilizando las condiciones adecuadas para este tipo celular (ver apartado de Material y métodos: 4. Obtención de cultivos primarios de células de musculatura lisa vascular de aorta; 5. Técnicas básicas de



cultivo celular). Además, muchos otros estudios han demostrado que las células son capaces de alcanzar la senescencia, sin ser ello consecuencia de las condiciones de cultivo (Holliday, 1995; Arking, 1998). Por tanto, en nuestro caso es posible descartar la implicación de la inducción de senescencia por estímulos estresantes (SIPS), y podemos considerar como único mecanismo de inducción de senescencia el acortamiento de los telómeros/inactivación de la telomerasa, o bien la activación de reguladores negativos del ciclo celular y de oncogenes.

En este estudio es imposible distinguir *a priori* entre estos dos mecanismos implicados, ya que aunque se trata de estímulos diferentes, ambos desencadenan las mismas vías para inducir senescencia (ver Introducción 3. 2. 3. Mecanismos de inducción del proceso de senescencia). Es por tanto posible concluir que aunque no se haya logrado alcanzar el proceso, sí parece haberse iniciado, ya que se encuentra incrementada la expresión de p21 (Figura RI-7, 8, 11 y 12), pero no existen otros datos para determinar el grado de implicación de una u otra causa. Otros datos que indican el desencadenamiento de la senescencia es el incremento de la inducción de lámina A/C (Figura RI-7, 8, 11 y 12) y la actividad  $\beta$ -galactosidasa (Figura RI-4).

El hecho de que no se haya alcanzado la senescencia total de estos cultivos puede explicarse de tres formas diferentes, debido a la longitud de los telómeros, presencia de otros tipos celulares o inmortalización celular.

En primer lugar, se podría pensar que no se ha alcanzado la longitud crítica de los telómeros que provoca el cese de las divisiones celulares, y esto podría ser consecuencia a su vez de dos factores. En primer lugar, las ratas de laboratorio tienen unos telómeros relativamente largos, 20-100 kb, en contraste con los humanos que tienen una longitud de 5-15 kb (Oeseburg y cols., 2010). El acortamiento es dependiente del tejido, por ejemplo este acortamiento con la edad tiene lugar en riñón, páncreas, hígado y pulmón pero no en cerebro (Cherif y cols., 2003). Por el momento no existen datos sobre el acortamiento de los telómeros asociado al envejecimiento en aorta de ratas sanas, aunque sí en humanas (Minamino y cols., 2002). Sí se ha observado este acortamiento en aorta asociado a la dieta en ratas (Tarry-Adkins y cols., 2008; da Luz y cols., 2012). Otro factor importante a tener en cuenta es la actividad de la enzima telomerasa, ya que se ha demostrado que las VSMCs de aorta de rata tienen actividad telomerasa (Minamino y cols., 2001). La unión de estos factores, la gran longitud de los telómeros, junto con la presencia de la actividad de la telomerasa, ha podido hacer posible que no se haya alcanzado el cese total de las divisiones

por el momento, al no alcanzar la longitud crítica de los telómeros necesaria para bloquear la división celular. No obstante, serían necesarios estudios específicos para determinar la longitud de los telómeros en ratas de diferentes edades, para poder determinar si esto ocurre en la aorta de esta especie, como así ocurre en el hígado, o no se lleva a cabo, como en el cerebro.

En segundo lugar, y no excluyendo a la primera hipótesis, es posible que progresivamente a lo largo del cultivo haya ido disminuyendo el porcentaje de VSMCs a favor de otros tipos celulares. A largo de toda la longitud de la aorta, además de VSMCs, aparecen también células madre, identificadas incluso en adultos (Majesky, 2007). Por tanto es posible que en el proceso de extracción de las VSMCs se aislaran también células madre y su porcentaje se haya ido incrementando progresivamente a la vez que disminuiría el porcentaje de VSMCs debido al proceso de senescencia. Se ha observado que las células madre en cultivo son capaces de dividirse más de 1.000 veces sin mostrar signos morfológicos de senescencia (Rubin, 2002), aunque sí que se va produciendo progresivamente el acortamiento de sus telómeros (Wagner y cols., 2009). Esta hipótesis podría ocurrir en nuestro caso, ya que aunque los bioindicadores de senescencia se incrementan a lo largo del cultivo (Figura RI-7 y 8), también se observan cambios morfológicos (Figura RI-2) y disminución de los bioindicadores de VSMCs (Figura RI-9 y 10). Esta hipótesis también sería apoyada por los resultados de otros autores, los cuales sugieren que las alteraciones de la actividad proliferativa y los perfiles intracelulares proteicos quizás reflejen cambios en el fenotipo de las células, aunque es posible que también pueda deberse al aumento de la proporción de otros tipos celulares en cultivo que se consideraban minoritarios e incluso ausentes (Absher y cols., 1988; Chamley-Campbell, 1979; Franke y cols., 1980; Owens y cols., 1986; Warshaw y cols., 1986).

En tercer lugar, es posible que la ausencia del cese de las divisiones sea consecuencia de la inmortalización de las líneas celulares. Ya que se ha demostrado la inmortalización espontánea de células en cultivo (Todaro y cols., 1963; Holliday, 1995).

Este estudio se realizó con células entre 17 y 90 divisiones, aunque posteriormente el cultivo se mantuvo en división. Es posible que el incremento de los marcadores de envejecimiento (Figura RI-4, 7, 8, 11 y 12) sea consecuencia del envejecimiento real de las VSMCs en esta primera fase, desarrollándose la inmortalización o incremento de otros tipos celulares, como células madre, en divisiones más avanzadas (más allá de las 90 divisiones

estudiadas). Por ello en este estudio se observa un incremento progresivo de los marcadores de envejecimiento (Figura RI-7 y 8), ya que durante estas divisiones predominarían las VSMCs que envejecieron progresivamente y posteriormente podrían haber sido sustituidas o podrían haberse immortalizado, y en consecuencia por ello no cesar la división. La pérdida de marcadores de VSMCs (Figura RI-9 y 10) ha podido ser tanto consecuencia del propio proceso de envejecimiento o por el aumento de otros tipos celulares, minoritarios al principio del cultivo.

Comportamiento celular en cultivo: Se ha demostrado que hay una relación directa entre el número de divisiones máximo en cultivo y la longevidad de la especie, así como una relación inversa entre ese número y la edad del donante (Hayflick y cols., 1961; Hayflick, 1965 y 1977; Goldstein y cols., 1969; Goldstein, 1974; Le Guilly, 1973; Martin y cols., 1970 y 1981; Rohme, 1981; Schneider y cols., 1976; Stanley y cols., 1975). Esto podría ser consecuencia de que las células de animales jóvenes hayan sufrido *in vivo* menos divisiones que las de animales de mayor edad. De este modo sería esperable que las células que extrajimos de animales de menor edad se dividieran un mayor número de veces que las de animales de mayor edad, siendo su cultivo en el tiempo más prolongado. Como se ha comentado en el apartado anterior, en nuestro caso no se ha logrado alcanzar el cese de la división celular, por lo que para evaluar este aspecto es necesario centrarse en otros bioindicadores.

El mayor envejecimiento de las células extraídas de animales de mayor edad daría lugar a que presentaran mayor expresión de bioindicadores de envejecimiento a lo largo del cultivo, ya que aunque en cultivo se compare entre las mismas divisiones, las células acumulan las divisiones que han tenido lugar *in vivo* e *in vitro*, por lo tanto acumularían más divisiones a mayor edad del animal donante.

En relación al comportamiento de las células en cultivo durante 250 días en cultivo, el número de células totales acumuladas, el número de divisiones por día y las células/cm<sup>2</sup> en ese periodo fue menor conforme aumentó la edad del animal donante (Figura RI-1). Todo ello podría ser debido a una menor velocidad de multiplicación de las células extraídas de animales de mayor edad, consecuencia de un mayor envejecimiento de estas VSMCs con respecto a las procedentes de animales jóvenes.

2. Indicadores de envejecimiento de las células en cultivo.- En este estudio, aunque ninguna de las tres líneas ha dejado de dividirse, las células extraídas de ratas de 24 meses muestran

una leve tinción positiva para  $\beta$ -galactosidasa a 90 divisiones acumuladas (Figura RI-4), lo cual es indicativo del inicio del proceso de senescencia. Esto sería lo esperable, es decir, que en la línea celular extraída de animales de mayor edad el proceso de senescencia se inicia antes que en las otras dos líneas. Entre las líneas extraídas de animales de 2 y 12 meses no se observan diferencias con esta técnica, por lo que podemos concluir que es menos sensible que otras técnicas (explicadas más adelante) con las que sí se observan diferencias desde las primeras divisiones comparadas.

Un indicador de senescencia es la morfología (Robbins y cols., 1970; Brunk y cols., 1973; Absher y cols., 1988; Bayreuther y cols., 1988; Cristofalo y cols., 1988, 1993 y 2004). En nuestro caso, a medida que las células acumularon divisiones su morfología fue variando (Figura RI-2), y ello debería ser consecuencia del proceso de envejecimiento. Sin embargo, debido a la incapacidad de estos cultivos de detener la división celular, es posible que estos cambios morfológicos sean debidos también a la proliferación celular de otros tipos celulares minoritarios al principio del cultivo y que hayan ido incrementando su presencia con el tiempo, como pueden ser las células madre mencionadas anteriormente. Estos cambios coinciden con lo descrito en las referencias consultadas, las cuales indican que tras los subcultivos, las células se aplanan progresivamente, adquiriendo una apariencia fibroblástica. También indican que las alteraciones de la actividad proliferativa y los perfiles intracelulares proteicos quizás reflejen cambios en el fenotipo de las células, aunque es posible que pueda deberse al aumento de la proporción de otros tipos celulares en cultivos que se consideraban minoritarios e incluso ausentes, como fibroblastos y células endoteliales. También se ha planteado que puedan existir dos poblaciones distintas de VSMCs, las cuales difieren en morfología y perfil proteico (Absher y cols., 1988; Chamley-Campbell, 1979; Owens y cols., 1986; Warshaw y cols., 1986).

Otra característica de las células senescentes es el incremento de la apoptosis con la senescencia (Burton y cols., 2009). A lo largo de los cultivos de todas las líneas celulares se observó un incremento progresivo de la apoptosis celular dentro de la misma línea, lo que se esperaría a lo largo del proceso de envejecimiento (Figura RI-5 y 6). Sin embargo al comparar la apoptosis desarrollada por cada línea para una misma división, lo esperable hubiera sido que ésta fuera directamente proporcional a la edad del animal donante, lo cual fue así a divisiones tempranas, este incremento, aunque mínimo, podría indicar que las células extraídas de animales de mayor edad se encuentran en un estado más avanzado de

envejecimiento. Sin embargo a divisiones avanzadas, aunque se mantuvo esta relación entre células extraídas de animales de 12 y 24 meses, no fue así para células extraídas de animales de 2 meses. Probablemente esto fuera debido a una desdiferenciación celular, con menor influencia de la edad del animal. Debido a que el incremento de la apoptosis se mantuvo dentro de todas las líneas y la relación fue adecuada entre las diferentes líneas a tempranas divisiones y no lo fue únicamente para divisiones avanzadas en células extraídas de animales de 2 meses, se podría pensar que el proceso de desdiferenciación ha dado lugar a un incremento de la apoptosis en la línea de células extraídas de animales de 2 meses, superior al esperado por el envejecimiento del cultivo. Por todo ello, se concluye que el envejecimiento de las células *in vivo* como *in vitro* incrementa la apoptosis, pudiendo ésta verse exacerbada en función de la dirección que tome la desdiferenciación celular.

Junto con la tinción de  $\beta$ -galactosidasa y la valoración morfológica, como biomarcadores más bien cualitativos, y de la apoptosis, cualitativa y cuantitativa, se estudiaron otros marcadores de senescencia, lámina A/C y p21, tanto cualitativa como cuantitativamente.

El incremento de la expresión de lámina A/C y p21 en todas las líneas estudiadas a lo largo del cultivo, indica que el envejecimiento de las células tiene lugar a medida que éstas acumulan divisiones (Figura RI-7 y 8).

3. Cambios en la expresión de indicadores de células del músculo liso vascular.- El envejecimiento de las células también se ha relacionado con el proceso de modulación fenotípica (Mazurkowitz y cols., 1979; Gospodarowicz y cols., 1981; Absher y cols., 1988). Por tanto lo esperable sería que el envejecimiento fuera acompañado de la desdiferenciación de las células, con la pérdida de proteínas características del fenotipo contráctil (fenotipo diferenciado). En este caso, para todas las líneas, se produce la pérdida de marcadores de VSMCs diferenciadas como SM22 $\alpha$  y  $\alpha$ -actina (Figura RI-9 y 10), apoyando los resultados de Shanahan y cols. (1993) y contradiciendo los resultados de Nakano-Kurimoto y cols. (2009). Esto lleva a concluir que las células se desdiferencian a medida que envejecen.

El estudio del comportamiento a lo largo del cultivo de las VSMCs, para cada una de las líneas empleadas, se realizó principalmente para confirmar el comportamiento de las células durante el proceso de envejecimiento descrito por otros autores y de este modo relacionar el comportamiento de las VSMCs a lo largo del cultivo, con el proceso de

envejecimiento *in vivo*. A partir de estas observaciones se puede concluir que las VSMCs en cultivo pierden sus marcadores específicos, desdiferenciándose, a medida que acumulan divisiones y envejecen, ocurriendo este proceso en todas las edades de rata donante estudiadas, con un patrón similar.

4. Expresión de indicadores de envejecimiento en función de la edad del animal.- En segundo lugar se realizó el estudio comparativo, entre líneas, para cada una de las divisiones empleadas, lo que como ya se ha mencionado se relacionaría con el envejecimiento *in vivo*. Se partió de la hipótesis de que las células extraídas de animales de mayor edad se encontrarían en un estado más avanzado de envejecimiento que las extraídas de animales jóvenes. Esta hipótesis está de acuerdo con los resultados obtenidos, ya que, a medida que aumenta la edad del donante las VSMCs presentaron mayor expresión de marcadores de envejecimiento, lámina A/C y p21 (Figura RI-11 y 12). De este modo, según las referencias consultadas y los resultados previos a lo largo del cultivo, a medida que se incrementa la edad del donante, el grado de envejecimiento de las VSMCs sería mayor y, por tanto, deberían expresar menos marcadores de VSMCs.

Para todas las divisiones estudiadas la expresión de la lámina A/C se incrementó conforme aumentó la edad de los animales donantes (Figura RI-11 y 12). En el caso de p21 (Figura RI-11 y 12), teniendo únicamente en cuenta el proceso de envejecimiento, el patrón debería haber sido el mismo que para la lámina A/C, sin embargo, esto sólo fue así a divisiones tempranas, 17 y 30 CPDs. A divisiones avanzadas, 70 y 90 CPDs. la expresión de p21 fue mayor en las VSMCs de donantes de 2 meses que en las de 12 y 24 meses. Esto no sería indicativo de senescencia (ya que, además, la lámina A/C presentó menor expresión para VSMCs de donantes de 2 meses) sino de incremento de apoptosis como se puede ver en las figuras RI-5 y 6, el cual se ha comentado ocurrió en divisiones avanzadas en el cultivo de células extraídas de donantes de 2 meses. Es posible que la gran desdiferenciación que sufrieron estas células incrementara la apoptosis independientemente del grado de envejecimiento, ya que esta inversión del patrón de la expresión de p21 para células extraídas de donantes de 2 meses solo tiene lugar a divisiones avanzadas y el patrón esperado se mantiene entre células extraídas de donantes de 12 y 24 meses, así como el incremento de la expresión de la lámina A/C si se correlaciona positivamente con la edad del donante. Por ello se puede concluir que las células procedentes de animales jóvenes, debido a que *in vivo* han acumulado menos divisiones, se encuentran en un estado menos envejecido que las extraídas

de animales de mayor edad y, de este modo, su envejecimiento se encuentra retardado *in vitro* con respecto a las células extraídas de animales de mayor edad.

##### 5. Expresión de indicadores de musculatura lisa vascular en función de la edad del animal.-

Se partió de la hipótesis de que las células extraídas de animales de mayor edad se encontrarían en un estado más avanzado de envejecimiento que las extraídas de animales jóvenes. Esta hipótesis se ha confirmado (Figura RI-11 y 12), y de acuerdo a las referencias consultadas y los resultados previos a lo largo del cultivo, a medida que se incrementa la edad del donante, el grado de envejecimiento de las VSMCs fue mayor y, por tanto, deberían expresar menos marcadores de VSMCs.

Como ya se ha explicado en la introducción, hay opiniones contrapuestas sobre las proteínas que se modifican durante el cultivo. Según Shanahan y cols. (1993), proteínas tales como SM22 $\alpha$  y  $\alpha$ -actina se encuentran principalmente en el fenotipo contráctil y se pierden progresivamente durante la proliferación. Otros autores como Nakano-Kurimoto y cols. (2009), han detectado una expresión significativa de SM22 $\alpha$  y  $\alpha$ -actina en VSMCs senescentes, de modo similar a las células jóvenes. Nuestros resultados coinciden con lo observado por Shanahan y cols. (1993), y discrepan con los obtenidos por Nakano-Kurimoto y cols. (2009).

Hemos demostrado que la expresión de estas proteínas disminuye a medida que se incrementa la edad del animal donante (Figura RI-13 y 14), aunque se debe discutir más profundamente que en el caso de los marcadores de envejecimiento, ya que las diferencias entre todas las edades no son tan claras para todas las divisiones.

A 17 CPDs para la expresión proteica de SM22 $\alpha$ , y a 30 CPDs tanto para la expresión proteica de  $\alpha$ -actina, como para la de RNA y proteína de SM22 $\alpha$ , no se observa una disminución de la expresión entre VSMCs extraídas de donantes de 2 y 12 meses, pero sí entre estas dos edades y las células extraídas de donantes de 24 meses. Las diferencias de expresión de SM22 $\alpha$  y  $\alpha$ -actina entre VSMCs de donantes 2 y 12 meses se hizo significativa a divisiones avanzadas (70 y 90 CPDs). Entre VSMCs de donantes de 2 y 24 meses, como se ha comentado, ya existían diferencias a divisiones tempranas (17 y 30 CPDs), haciéndose todavía más evidentes a divisiones avanzadas. Por otro lado, a divisiones avanzadas disminuyó la diferencia de expresión entre VSMCs de donantes de 12 y 24 meses de estas proteínas. En resumen, la expresión de marcadores de envejecimiento, como lámina A/C y

p21, es significativamente diferente entre VSMCs extraídas de diferentes edades, existen diferencias significativas de los marcadores de envejecimiento en todas divisiones, incrementándose su expresión conforme aumenta la edad del donante, para todas las divisiones estudiadas. Es posible que la diferencia del grado de envejecimiento, a tempranas divisiones, entre las células extraídas de animales de 2 y 12 meses no sea suficiente como para dar lugar a diferencias significativas de los marcadores de VSMCs. Sin embargo, el grado de envejecimiento entre las células extraídas de animales de 2 y 24 meses es mayor y es posible que sea suficiente para mostrar diferencias de expresión de estos biomarcadores. Sí se observan diferencias de expresión en los marcadores de envejecimiento, lámina A/C y p21, entre células extraídas de animales de 12 y 24 meses, aunque no son significativas. Sin embargo, sí que lo son para los marcadores de VSMCs, por lo que se podría pensar en la existencia de un umbral de envejecimiento a partir del cual, aunque no exista una gran diferencia entre edades, una vez superado se haga significativa la desdiferenciación.

A divisiones más avanzadas aparecen dos patrones (Figura RI-14). A 70 divisiones se invierte el patrón de expresión, ya que la expresión de marcadores de VSMCs para células extraídas de animales de 12 meses fue menor que para donantes de 24 meses. Esto podría ser debido a la presencia de dos poblaciones celulares, como se ha observado morfológicamente (Figura RI-2), pudiendo expresar una de ellas menos marcadores de VSMCs, mientras en VSMCs de donantes de 24 meses existen células de morfología única, pudiendo ser éstas las que expresan más marcadores del fenotipo contráctil. A 90 divisiones se vuelve a invertir el patrón, las células de donantes de 24 meses presentan una menor expresión de marcadores de VSMCs frente a las extraídas de animales de 12 meses. De nuevo, este cambio a 90 CPDs podría deberse a la disminución de estos marcadores a divisiones muy avanzadas, y/o al posible inicio del proceso de senescencia que se observó por tinción de  $\beta$ -galactosidasa (Figura RI-4).

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que existe una disminución de la expresión de los marcadores del fenotipo contráctil de VSMCs a medida que se incrementa la edad del animal donante para todas las divisiones estudiadas en cultivo. Como se ha explicado en el caso de los marcadores de envejecimiento, aunque en cultivo las células de todas las líneas estudiadas se hayan dividido el mismo número de veces, conforme se incrementa la edad del animal donante también se incrementa, probablemente, el número de divisiones que han sufrido sus células (lo que resultaría de la suma de las divisiones *in vivo* e



*in vitro*), y de este modo sus células se encontrarían en un estado más avanzado de envejecimiento y de desdiferenciación.

Por ello, uniendo el proceso de envejecimiento y desdiferenciación y los resultados *in vivo* e *in vitro*, se podría llegar a una conclusión global. Las células en cultivo, independientemente de la edad del animal donante, sufren un proceso gradual de envejecimiento, el cual se acompaña de su desdiferenciación, es decir, tanto las líneas obtenidas a partir de animales jóvenes como las obtenidas a partir de animales viejos, a lo largo del cultivo envejecen y se desdiferencian. Este comportamiento también ocurre *in vivo*, ya que al comparar VSMCs de animales de diferentes edades para una misma división el grado de envejecimiento y desdiferenciación se incrementa con la edad del donante, lo que se puede explicar teniendo en cuenta que cuanto más tiempo ha vivido el individuo en más ocasiones se deberían haber dividido sus células.

#### I. B. FACTORES IMPLICADOS EN LA SENESCENCIA DE VSMCs

Entre los factores que se piensa que pueden estar involucrados en el proceso de envejecimiento se encuentra el estrés oxidativo. Se ha observado la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) relacionadas con senescencia (Chen y cols., 2001).

Se observa que las células extraídas de animales de 12 y 24 meses presentan una mayor expresión de p38 fosforilada, bioindicador de estrés oxidativo, que las células extraídas de animales de 2 meses, en todas las divisiones estudiadas (Figura RI-15). Entre células extraídas de animales de 12 y 24 meses no se observan diferencias significativas de expresión de 17 a 70 divisiones, sin embargo a 90 divisiones la expresión es mayor para las células extraídas de animales de 12 meses. De forma global se observa que aparece un menor grado de estrés oxidativo en las células extraídas de animales de menor edad, por lo que se podría concluir que existe una cierta relación entre envejecimiento de VSMC y estrés oxidativo, incrementándose éste con la edad. El hecho de que a 90 divisiones la expresión de p38 fosforilada sea mayor para células extraídas de animales de 12 meses que para células extraídas de animales de 24 meses, puede ser más bien consecuencia de la desdiferenciación a lo largo del cultivo.

## I. C. RELACIÓN ENTRE SENESCENCIA Y CALCIFICACIÓN VASCULAR

Algunos autores indican que la desdiferenciación de las VSMCs puede ser debida a su origen mesenquimatoso, el cual puede dar lugar a diferentes tipos celulares (Iyemere y cols., 2006), por ello afirman que la desdiferenciación asociada a senescencia a su vez da lugar a *transdiferenciación* osteogénica (Burton y cols., 2009). Se ha observado como las VSMCs en presencia de calcificación vascular desarrollan un fenotipo osteogénico (Shanahan y cols., 1999; Tintut y cols., 2003; Tyson y cols., 2003) y que la calcificación medial se incrementa con el envejecimiento (Elliot y cols., 1994).

1. Expresión de indicadores de calcificación.- Como se ha observado a lo largo de esta tesis, todas las líneas celulares empleadas muestran un mayor envejecimiento y desdiferenciación de sus células conforme se incrementa la edad del animal donante, lo cual se evidenció por la pérdida de marcadores de VSMCs. Para evaluar la implicación del fenotipo osteogénico en el proceso de calcificación durante el envejecimiento se analizó la expresión de factores pro- y anti-calcificantes.

Con respecto a los factores procalcificantes (Figura RI-16) se observó que conforme se incrementa la edad del donante también se incrementa significativamente la expresión de BMP2 en todas las divisiones analizadas. Se ha descrito que BMP2 actúa como un mediador crucial en el proceso de calcificación vascular, a través de la inducción de factores de transcripción entre los que se incluyen Msx2 y CBFA1 (Hruska y cols., 2005; Johnson y cols., 2006).

En cuanto a CBFA1, las diferencias comenzaron a ser significativas, a 30 CPDs, conforme aumenta la edad del donante. En el caso de Msx2 las diferencias de expresión no fueron evidentes hasta 70 CPDs, sin ser significativas hasta las 90 CPDs.

Por ello se puede concluir que aunque la *transdiferenciación* osteogénica parece ocurrir durante todo el proceso de envejecimiento, según se deduce de las diferencias significativas de expresión de BMP2 para todas las divisiones analizadas conforme se incrementa la edad del donante, estos cambios no ocurren paralelamente para todos los factores procalcificantes. La activación de CBFA1 por BMP2 precede a la activación de Msx2. Parece ser necesario alcanzar un mínimo número de divisiones en cultivo para que se

incremente la expresión de CBFA1 y Msx2. Observándose en todos casos que la activación de la expresión de estos factores ocurre de forma dependiente de la edad del animal donante.

Como factor anticalcificante se cuantificó la expresión de MGP (Figura RI-17). Debido a la transición osteoblástica observada, sería esperable que las células senescentes tuvieran una menor expresión de MGP, proteína de matriz Gla anticalcificante. En este caso apareció un patrón no esperado. Aunque sí se observa una menor expresión de MGP en las células extraídas de animales de 24 meses frente a los de 2 meses en todas las divisiones, esto no ocurre así para las células extraídas de animales de 12 meses, las cuales muestran mayor expresión de MGP que las células extraídas de animales de 2 y 24 meses para todas las divisiones. A través del estudio morfológico del cultivo de las células extraídas de animales de 12 meses, se ha evidenciado la existencia de dos tipos celulares en esta línea (Figura RI-2), lo que podría explicar la sobreexpresión de MGP. Las células de morfología similar a las de las líneas de células extraídas de animales de 2 y 24 meses son escasas a las 70 divisiones, y desaparecen totalmente tras 90 divisiones en cultivo. Es posible que las células en el cultivo de VSMCs extraídas de animales de 12 meses, de morfología similar a las VSMCs extraídas de animales de 2 y 24 meses, presenten menor expresión de MGP que la otra población celular observada en el cultivo procedente de animales de 12 meses. Por ello la disminución del porcentaje de las mismas en la línea de 12 meses podría hacer posible el mantenimiento de la expresión de MGP por el otro tipo celular observado. Obviando el caso particular de la línea de 12 meses y teniendo únicamente en cuenta la relación entre la VSMCs extraídas de donantes de 2 y 24 meses, se podría concluir que la pérdida de factores anticalcificantes, como MGP, tienen lugar conforme las células envejecen, siendo ello dependiente de la edad del animal donante, a mayor edad del animal mayor pérdida de expresión de MGP.

A partir de estos resultados, junto con los descritos anteriormente, en los que se había observado una mayor expresión de marcadores de senescencia y menor de la de marcadores de VSMCs a medida que se incrementa la edad del animal donante, se podría deducir que el envejecimiento y desdiferenciación de las células durante la vida del animal producirían una transición osteoblástica que incrementaría el riesgo de desarrollo de calcificación vascular.

Aunque la *transdiferenciación* osteoblástica se ha visto implicada en el proceso de calcificación vascular, como se ha explicado anteriormente existen dos teorías que buscan dar explicación a su implicación en el proceso, inducción de la calcificación vascular por la previa expresión de genes osteoblásticos o expresión de estos mismos genes como

consecuencia de la calcificación (Introducción: 4. 3. Implicación de la *transdiferenciación* de VSMCs en la calcificación medial).

En este estudio se procedió a la cuantificación de la expresión de genes anti- y procalcificantes en cultivos bajo condiciones normofosfatémicas, es decir, sin inducir el proceso de calcificación vascular. Por lo que la expresión de genes osteoblásticos podría ser consecuencia directa del envejecimiento, sin haber tenido lugar, previamente, depósitos cálcicos.

2. Efecto de la senescencia sobre la calcificación vascular.- Para poder afirmar que el incremento de la expresión de estos genes da lugar al incremento de la calcificación en presencia de concentraciones elevadas de fosfato en el caso concreto del envejecimiento, fue necesaria la incubación de las células de diferentes divisiones con un medio calcificante. En este caso se realizaron dos estudios diferentes. En primer lugar cada línea celular se incubó bajo condiciones calcificantes observándose un ligero incremento de la calcificación a medida que las células acumulaban divisiones (Figura RI-18 y 20). Esto indicaría que la mayor desdiferenciación y envejecimiento *in vitro* de las células favorecen el incremento de calcificación vascular. En segundo lugar se comparó el grado de calcificación obtenida entre las edades estudiadas para una misma división. En este caso se observó que aunque dentro de una misma división se observan diferencias significativas en la expresión de osteogenes, no hay diferencias en el grado de calcificación entre las distintas edades para una misma división (Figura RI-19 y 20). Es decir, ligeros incrementos en el grado de senescencia y des- y *transdiferenciación*, como el existente entre edades dentro de un mismo número de divisiones, podrían no ser suficientes para incrementar la calcificación y cuando estos dos factores se vieran más incrementados sí podrían aumentar el grado de calcificación, como para las diferencias observadas entre 17 y 70-90 divisiones dentro de una misma edad. También habría que considerar la posibilidad de una mayor desdiferenciación *in vitro*, en comparación a lo que ocurre *in vivo*, como consecuencia de la imperfección de este modelo celular de calcificación ectópica.

Por ello, se podría llegar a concluir que la desdiferenciación y *transdiferenciación* que tienen lugar durante el envejecimiento favorecen el desarrollo de la calcificación vascular, pero no pueden llegar a considerarse los únicos o siquiera principales factores desencadenantes.

## **PARTE II. INFLUENCIA DEL ARSÉNICO EN LA CALCIFICACIÓN VASCULAR Y SENESCENCIA DE VSMCS**

### **II. A. CITOTOXICIDAD DE LAS ESPECIES DE ARSÉNICO**

La selección de concentraciones para este estudio requirió un estudio previo, ya que como se ha explicado en los objetivos, el fin de este estudio era determinar si los diferentes compuestos de arsénico ( $\text{As}^{\text{III}}$ ,  $\text{As}^{\text{V}}$ , MMA, DMA) eran capaces de inducir senescencia y calcificación vascular. La inducción de estos procesos se podría explicar por la producción de senescencia inducida por estrés (SIPS), la cual es consecuencia de la exposición repetida o crónica de las células a ciertos tipos de estrés, a concentraciones no letales (Brack, 2000), y de ahí la necesidad de conocer la toxicidad de las distintas formas y a diferentes concentraciones.

Para elegir las concentraciones no tóxicas a usar se trataron las VSMCs con diferentes formas y concentraciones de arsénico (Figura RII-1 y 2). Se usó arsenito de sodio ( $\text{As}^{\text{III}}$ ), arseniato de potasio ( $\text{As}^{\text{V}}$ ), ácido monometilarsénico (MMA) y ácido dimetilarsénico (DMA), siendo estos dos últimos también formas pentavalentes.

Tanto  $\text{As}^{\text{III}}$  como  $\text{As}^{\text{V}}$  son citotóxicos para las VSMCs a 100  $\mu\text{M}$  en cultivo, siendo mucho más tóxica la forma trivalente que la pentavalente, ya que  $\text{As}^{\text{III}}$  induce aproximadamente un 30 % de citotoxicidad tras 1 día en cultivo, mientras que el  $\text{As}^{\text{V}}$  para alcanzar este mismo porcentaje requiere que el tratamiento se prolongue 3 días. Tras 5 días en cultivo el porcentaje de toxicidad es elevado en ambos casos, aproximadamente un 80 % y un 65 % respectivamente para  $\text{As}^{\text{III}}$  y  $\text{As}^{\text{V}}$ , por lo que estas concentraciones se excluyeron de este estudio.

A concentración 10  $\mu\text{M}$ , el  $\text{As}^{\text{V}}$  no desarrolla citotoxicidad durante 5 días en cultivo, y el  $\text{As}^{\text{III}}$  únicamente al quinto día eleva la producción de citotoxicidad hasta aproximadamente un 12 % más que las células control. Por ello se eligieron estas concentraciones como las máximas concentraciones de tratamiento para estas dos formas de arsénico.

En el caso de las formas metiladas ninguna de las concentraciones testadas produjo citotoxicidad. Ya que estos compuestos se producen biológicamente en el proceso de metabolización de  $\text{As}^{\text{III}}$  y  $\text{As}^{\text{V}}$  se planteó la posibilidad de que estos compuestos fueran

incapaces de introducirse en las VSMCs y fuera ésta la razón de la falta de citotoxicidad. Estas formas metiladas se utilizaron también para detectar el efecto sobre la inducción de senescencia (ver más adelante), resultando también negativo. Por lo tanto, ya que ni MMA ni DMA inducían citotoxicidad ni senescencia, ambos compuestos fueron apartados de los estudios de calcificación.

Por otro lado se planteó la posibilidad de que la ausencia de citotoxicidad en algunas de las formas o concentraciones utilizadas no fuera cierta, sino sólo la consecuencia de la inhibición experimental de la actividad de la enzima LDH. Por ello, cada una de las formas arsenicales utilizadas se incubó con la concentración más alta utilizada en una muestra positiva (tritón X-100) y se descartó esta posibilidad, ya que la citotoxicidad del control positivo no disminuyó al ser incubada con las diferentes formas de arsénico.

Por todo ello, en la determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa se utilizaron las mismas concentraciones y especies que en el ensayo de LDH, ya que se realizó en las mismas placas, pero en el caso de la calcificación únicamente se usaron  $\text{As}^{\text{III}}$  y  $\text{As}^{\text{V}}$  a un máximo de 10  $\mu\text{M}$ .

## II. B. EFECTO DEL ARSÉNICO EN LA CALCIFICACIÓN

En condiciones normofosfatémicas el  $\text{As}^{\text{III}}$  no indujo calcificación con ninguna de las concentraciones utilizadas (Figura RII-3). Este resultado se confirmó con el tratamiento de ratas sanas, es decir con normofosfatemia, las cuales fueron tratadas durante un mes con 50 ppm  $\text{As}^{\text{V}}$ , sin desarrollar durante este periodo calcificación vascular (Figura RII-15 B). Únicamente se incrementó la calcificación *in vitro* de forma dosis dependiente en condiciones hiperfosfatémicas, como las que tienen lugar en insuficiencia renal (Figura RII-3). Por ello se puede concluir que el arsénico no es suficiente para inducir la calcificación de VSMCs bajo concentraciones fisiológicas de Pi y Ca, y que el incremento de calcificación bajo condiciones calcificantes puede estar favorecido por otros procesos simultáneos.

Para determinar si el efecto del arsénico en la calcificación fue mediado por un mecanismo biológico de las células o por un mecanismo físico que afectara a la iniciación de la calcificación o al depósito de fosfatos de calcio, se usó un modelo pasivo de calcificación (células previamente muertas) (Figura RII-4). En el caso de las células muertas el grado de calcificación fue mayor que en las vivas, pero no se incrementó de manera dosis dependiente,

como sí lo hizo en células vivas. De ello se concluye que el arsénico no da lugar a este efecto por un mecanismo físico que favorece el depósito pasivo de hidroxiapatita, sino que es consecuencia de un efecto sobre la actividad celular.

A la vez que se incubaron las VSMCs tratadas con  $\text{As}^{\text{III}}$  en un medio calcificante se tomaron muestras para determinar la citotoxicidad, observándose un incremento de la citotoxicidad en presencia simultánea de arsénico y altas concentraciones de Pi, por encima de los valores observados a concentraciones normofosfatémicas (Figura RII-5). Por lo que podemos concluir que se produce un efecto sinérgico de Pi y arsénico sobre la citotoxicidad y este incremento de la muerte celular da lugar a una mayor calcificación. Cabe destacar que está documentado que el depósito de fosfato de calcio incrementa la muerte celular (Reynolds y cols., 2004).

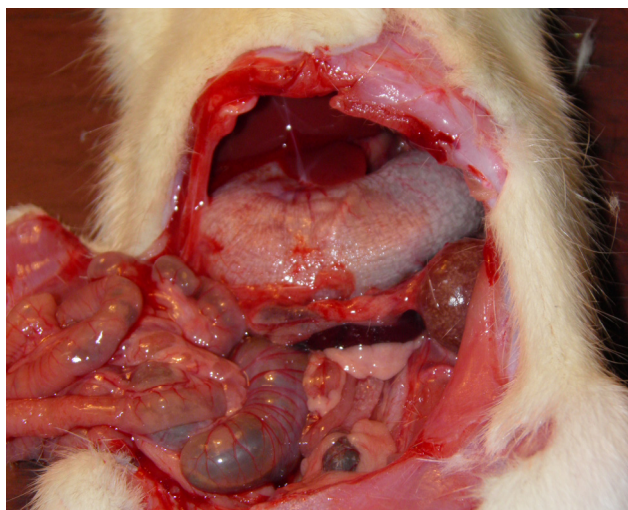
En este mismo estudio se demostró que el arsénico es capaz de desencadenar el proceso de senescencia prematura inducida por estrés (SIPS) tanto *in vitro* como *in vivo* (ver Resultados: II. E. Senescencia prematura inducida por estrés (SIPS) “*in vitro*” e “*in vivo*” por arsénico). En estudios realizados por otros autores se ha visto que la calcificación medial se incrementa con el envejecimiento (Elliot y cols., 1994). Además, en resultados previos hemos demostrado que las células senescentes presentan mayor expresión de genes osteoblásticos y una mayor calcificación que las VSMCs que han sufrido menos divisiones (ver Resultados: Parte I. Envejecimiento de las VSMCs). Por ello se planteó la posibilidad de que el incremento de la calcificación inducida por arsénico bajo condiciones hiperfosfatémicas fuera consecuencia de la senescencia inducida por arsénico. Para demostrarlo se incubaron en primer lugar las VSMCs con la concentración adecuada de  $\text{As}^{\text{III}}$  para producir senescencia y tras esa inducción se incubaron con un medio calcificante libre de arsénico (Figura RII-14 B). De esta forma no se produjo el incremento de la calcificación observado cuando se llevó a cabo la incubación conjunta de altas concentraciones de Pi con  $\text{As}^{\text{III}}$ , con lo que se puede concluir que la inducción de senescencia por parte del arsénico no es suficiente para producir el incremento de la calcificación, sino que requiere el efecto simultáneo de Pi y arsénico, lo que confirma la hipótesis anteriormente planteada sobre la inducción de calcificación consecuencia del efecto citotóxico sinérgico de Pi y arsénico.

Para poder demostrar si estos hallazgos eran reales y no simplemente un artefacto del modelo *in vitro* y de las particulares condiciones experimentales, se usó un modelo animal de calcificación vascular e insuficiencia renal crónica, el cual consistió en ratas sometidas a

nefrectomía 5/6 (Shobeiri y cols., 2010). En este modelo reproducimos *in vivo* (Figura RII-6 y 7) los resultados obtenidos *in vitro*, concluyendo de este modo que el arsénico incrementa la calcificación vascular en condiciones hiperfosfatémicas, como la que tiene lugar en la insuficiencia renal. El efecto perjudicial del arsénico ocurrió de forma similar en ambas fracciones anatómicas de la aorta, es decir, en aorta torácica y abdominal. Los animales nefrectomizados mostraron hiperfosfatemia y una FEPi incrementada (Tabla RII-2), como consecuencia de la alta ingesta de Pi y, probablemente, por incremento de los niveles plasmáticos de la fosfatona FGF23. La concentración de calcio en plasma no disminuyó, como ocurre en insuficiencia renal, debido a que los animales fueron tratados con calcitriol. El papel del arsénico como inductor de la calcificación vascular inducida por Pi en animales nefrectomizados es un importante hallazgo patobiológico, con, probablemente, repercusiones para los pacientes con insuficiencia renal crónica en áreas de alta exposición a arsénico.

Los animales tratados con vitamina D<sub>3</sub> y sometidos a nefrectomía (Tabla RII-1) prácticamente no incrementaron su peso durante el tratamiento, a diferencia de los animales tratados con vitamina D<sub>3</sub> pero no sometidos a nefrectomía, que sí lo hicieron. Los animales tratados con arsénico, vitamina D<sub>3</sub> y sometidos a nefrectomía perdieron peso durante el tiempo en tratamiento. Un síntoma característico de insuficiencia renal en la rata es el incremento del consumo de agua: en el caso de los animales nefrectomizados pero sin tratamiento

**Figura DII-1.** Estómago calcificado de rata Wistar nefrectomizada, tratada con vitamina D<sub>3</sub> y alimentada con una dieta alta en fosfato.



simultáneo con arsénico, se produjo este mayor consumo, respecto a los no nefrectomizados. Por el contrario en los animales con insuficiencia renal, tratados con arsénico en el agua de bebida, el consumo disminuyó, quizá por la alteración del sabor de la misma. Con respecto al consumo de pienso, éste disminuyó en las ratas nefrectomizadas, tanto tratadas como no tratadas con arsénico, aunque fue todavía menor en las ratas tratadas con arsénico. En este caso la reducción de la ingestión pudo ser consecuencia del tratamiento con vitamina D<sub>3</sub>, ya



que al sacrificio en los animales no nefrectomizados no se observaron alteraciones macroscópicas, sin embargo, en los animales nefrectomizados junto con la calcificación de las arterias se detectó la calcificación del estómago y de varias estructuras anatómicas más (Figura DII-1), a pesar de haber utilizado la dosis más baja de vitamina D<sub>3</sub> de las señaladas en la literatura; esa calcificación pudo reducir la ingesta de pienso. La reducción de la ingesta en el caso de los animales que fueron tratados con arsénico se redujo más que en los no tratados, en este caso podrían darse dos explicaciones, en primer lugar el sabor alterado del agua dio lugar a que se redujera la ingesta de agua y en consecuencia se redujo el consumo de pienso; en segundo lugar, es posible que como ocurrió en la aorta, la calcificación del estómago de los animales tratados con arsénico fuera mayor que en los no tratados y esto redujera todavía más el consumo de pienso por las molestias derivadas de la ingesta.

## II. C. EXCLUSIÓN DE MECANISMOS DE TOXICIDAD “*IN VITRO*” POR ARSÉNICO

En trabajos de otros grupos se han descrito diversos mecanismos de toxicidad por arsénico, tales como incremento de la apoptosis, estrés oxidativo o activación del inflammasoma (Simeonova y cols., 2004; Balakumar y cols., 2009; Li y cols., 2010), los cuales no se han encontrado en este trabajo, lo que puede ser consecuencia de las condiciones experimentales o del modelo celular empleado (Figura RII-8, 9 y 10).

## II. D. SENESCENCIA PREMATURA INDUCIDA POR ESTRÉS (SIPS) “*IN VITRO*” E “*IN VIVO*” POR ARSÉNICO

Simultáneamente al estudio de citotoxicidad se llevó a cabo la tinción  $\beta$ -galactosidasa asociada a la senescencia (Figura RII-11). Las células senescentes muestran una expresión de la  $\beta$ -galactosidasa de cinco a diez veces mayor que las jóvenes por lo que esta técnica puede ser empleada para la detección de células senescentes (Dimri y cols., 1995). Como se ha explicado anteriormente, la concentración de 100  $\mu$ M para As<sup>III</sup> y As<sup>V</sup> produjo una elevada citotoxicidad, lo que hizo imposible evaluar el proceso de senescencia. En el caso de MMA y DMA esta concentración no fue tóxica, aunque tampoco indujo senescencia. Al evaluar el resto de concentraciones utilizadas, el único compuesto que indujo senescencia fue As<sup>III</sup>, tanto a 1  $\mu$ M como a 10  $\mu$ M. Aparentemente As<sup>V</sup> no fue capaz de desencadenar el proceso.

Para confirmar la inducción de senescencia se cuantificó la expresión de marcadores de senescencia como lámina A/C y p21 (Figura RII-12 y 13). En el caso de As<sup>III</sup>, se observó

un incremento significativo de la expresión de p21, mayor a mayor concentración empleada, sin embargo no se observó un incremento en la expresión de lámina A/C.

Como ya es conocido la senescencia puede desencadenarse de distintas formas, y como en este caso el proceso que la induce es, con toda seguridad, el estrés consecuencia del arsénico, se trataría de senescencia prematura inducida por estrés (SIPS), como se había descrito previamente en células madre mesenquimatosas (Cheng y cols., 2011). Las bajas concentraciones empleadas de  $As^{III}$  producen un estímulo estresante que da lugar a senescencia prematura.

En la ruta bioquímica de inducción de la senescencia por estrés actúa la proteína p21, ya que p21 es activada inmediatamente como respuesta al daño celular (Alcorta y cols., 1996; Robles y cols., 1998). Esta activación posiblemente precede a la acumulación de lámina A/C y por ello se no se han observado incrementos de esta última. Por otro lado, es posible que la acumulación de lámina A/C únicamente se produzca en procesos implicados en el daño de los telómeros y por ello no se encuentre incrementada su expresión en este caso, en el que el proceso de senescencia es consecuencia de estrés y no de daño a los telómeros.

Para confirmar el efecto observado *in vitro* se trataron ratas durante un mes con  $As^{III}$  50 ppm observándose este mismo efecto, tanto con resultados positivos para la tinción  $\beta$ -galactosidasa, como para la tinción inmunofluorescente frente a p21, sin cambios en la expresión de lámina A/C (Figura RII-15).

Por ello es posible concluir que el arsénico es capaz de inducir senescencia prematura en VSMCs de aorta.

## II. E. ARSÉNICO INDUCE DESDIFERENCIACIÓN DE VSMCs

La acumulación de células senescentes en tejidos, como consecuencia de envejecimiento o estrés celular, puede explicar el declive de la funcionalidad de tejidos afectados (Lähteenvuo y cols., 2012). Este declive puede ser relacionado con un segundo fenómeno que ha sido observado en VSMCs expuestas a arsénico, la desdiferenciación celular. El origen de VSMCs como ya se ha mencionado es mesenquimatoso, pudiendo estas células fácilmente *transdiferenciarse in vitro* e *in vivo* por la expresión de genes que generalmente son silenciados en VSMCs pero expresados en otras células del mismo origen

(Iyemere y cols., 2006; Majesky y cols., 2007). Esto ocurre bajo determinadas circunstancias, incluyendo entre ellas las condiciones calcificantes (Bochaton-Piallet y cols., 1996; Chamley-Campbell y cols., 1979; Neuville y cols., 1997) y el envejecimiento (ver Resultados: I. A. Envejecimiento celular y desdiferenciación de VSMCs). Por ejemplo, durante la calcificación ectópica en insuficiencia renal crónica se ha observado la expresión de genes osteoblásticos, como causa de calcificación (Moe y cols., 2004) o como un intento de las células para organizar o protegerse de los depósitos de fosfatos de calcio (Villa-Bellosta y cols., 2011).

En este estudio se ha demostrado que la incubación de las VSMCs tanto con  $As^{III}$  como con  $As^V$  da lugar a la pérdida de marcadores del fenotipo contráctil de estas células, proteínas citoplasmáticas como SM22 $\alpha$ , calponina y anticalcificantes como MGP, pero no de  $\alpha$ -actina, tanto *in vitro* (Figura RII-16 y 17) como *in vivo* (Figura RII-18). Es posible que la  $\alpha$ -actina sea más resistente a la desdiferenciación que los otros marcadores mencionados, esto se puede observar en el anterior estudio referente al envejecimiento de las VSMCs en cultivo, en el que se observa que la pérdida de expresión de SM22 $\alpha$  es más rápida que la de  $\alpha$ -actina (ver Figura RI-9 y 10). A partir de estos resultados se deduce que el tratamiento con arsénico es capaz de inducir la desdiferenciación de las VSMCs, siendo evidente que la pérdida del fenotipo diferenciado de VSMCs puede tener dramáticas consecuencias para el correcto funcionamiento de la pared de la aorta.

En este mismo estudio también se cuantificó la expresión de osteogenes, los cuales se encuentran incrementados en células senescentes como consecuencia de la *transdiferenciación* celular, también demostrado en el estudio anterior sobre senescencia de VSMCs (Figura RI-15), así como por resultados de otros autores (Shanahan y cols., 1999; Tintut y cols., 2003; Tyson y cols., 2003). En este caso, el arsénico es incapaz de producir el incremento de la expresión de genes osteoblásticos. A partir de estos resultados podemos extraer una conclusión, la cual confirma conclusiones previas. La senescencia inducida por arsénico no presenta relación con la inducción de la calcificación vascular, ya que en este caso la senescencia no se acompaña del incremento de la expresión de genes osteoblásticos, siendo necesaria la acción combinada de Pi y arsénico para incrementar la calcificación. Por todo ello, parece ser que la calcificación inducida por arsénico es consecuencia de la citotoxicidad, y no de la inducción de senescencia.

En resumen, a los ya conocidos efectos perjudiciales del arsénico en el sistema vascular, a partir de este estudio se pueden añadir la acumulación de la senescencia prematura

de las células del músculo liso junto con la desdiferenciación del fenotipo de las células de la aorta, lo que podría contribuir al funcionamiento inadecuado de la actividad contráctil de la pared arterial. Un incremento de la citotoxicidad y calcificación bajo condiciones hiperfosfatémicas debe ser tenido en cuenta en pacientes con insuficiencia renal crónica expuestos a concentraciones moderadas de arsénico.

## **PARTE III. EFECTO DEL FLÚOR SOBRE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR**

### **III. A. ELECCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE TRATAMIENTO CON FLÚOR**

Ya que el fin de este estudio fue investigar la posible relación entre la fluorización de las aguas de consumo y la calcificación vascular, fue necesario elegir concentraciones a usar de flúor que se correspondieran con las obtenidas como consecuencia de la ingesta de esta agua.

Por ello, tras la evaluación de varios artículos en los que se cuantificó la concentración de flúor iónico en plasma en individuos que consumían aguas fluoradas y los cuales la fijaban entre 1 y 6  $\mu\text{M F}^-$  (Husdan, 1976; Singer, 1979; Kaminsky, 1990), se decidió tratar las VSMCs con 2,5, 5 y 10  $\mu\text{M F}^-$ .

Los tratamientos *in vivo*, en los que se administraron aguas fluoradas a ratas, se realizaron con dos concentraciones, 1,5 y 15 ppm  $\text{F}^-$ , la primera de ellas es la concentración que la OMS fija como límite seguro.

Las concentraciones que superan los valores plasmáticos tras la ingesta de agua fluorada y los valores de flúor en agua mayores de los permitidos por la OMS, sirvieron para determinar el efecto del flúor a mayores concentraciones de las encontradas en individuos y en aguas potables, ya que podría ser que el flúor tuviera efecto sobre el proceso pero no a las concentraciones plasmáticas derivadas del consumo de agua fluorada a las concentraciones que fija la OMS.

### **III. B. DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD EN EL TRATAMIENTO “*IN VITRO*” CON FLÚOR**

Para determinar la citotoxicidad del flúor sobre las VSMCs, estas células se incubaron durante 5 días (tiempo de tratamiento calcificante) con las siguientes concentraciones de flúor: 0, 2,5, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ; tanto en condiciones normofosfatémicas como hiperfosfatémicas (Figura RIII-1). En condiciones normofosfatémicas no se produjo citotoxicidad ni en ausencia ni en presencia de flúor, por lo que podemos concluir que en condiciones fisiológicas el flúor, a las concentraciones alcanzadas en plasma tras la ingesta de agua

fluorada, no tiene efectos tóxicos sobre las VSMCs. En condiciones hiperfosfatémicas, como las que tienen lugar en fallo renal crónico (Jono y cols., 2000), al tercer día de tratamiento la citotoxicidad fue elevada, tanto en presencia como en ausencia de flúor, coincidiendo este día con el inicio de la calcificación de las VSMCs, aunque se observó que a medida que se incrementaba la concentración de flúor la citotoxicidad era menor. Al quinto día, último día de tratamiento, se mostró el mismo patrón. Como se puede observar en la figura RIII-2 el flúor inhibe la calcificación, de una manera dependiente de la dosis.

De este modo, se observa que el cultivo de VSMCs en presencia de flúor no tiene efecto sobre la citotoxicidad en condiciones normofosfatémicas. Sin embargo, en presencia de alto fosfato se produce un incremento de la citotoxicidad durante el cultivo, viéndose incrementado en gran medida cuando se hace evidente la calcificación y la cual se reduce en presencia de concentraciones crecientes de flúor. Por ello se puede concluir que el depósito de cristales de fosfato y calcio sobre las células da lugar a citotoxicidad, la cual se ve disminuida por el tratamiento con flúor debido a la reducción del grado de calcificación.

### III. C. EFECTO DEL FLÚOR EN LA CALCIFICACIÓN “*IN VITRO*”

Existen evidencias de que el flúor tiene efectos positivos sobre la calcificación ósea al incrementar la proliferación de osteoblastos y el depósito mineral (Palmer y cols., 2012). Este efecto beneficioso también ocurre en los tejidos dentales (Wynn, 2002). Ya que la naturaleza y composición de los depósitos inorgánicos encontrados en la aorta parecen no diferir en gran medida de los depósitos inorgánicos en tejidos óseos (Bonucci, E., 2007) y la expresión de genes osteoblásticos tiene lugar en regiones calcificadas (Shanahan y cols., 1999; Tyson y cols., 2003; Bostrom, y cols., 1993), podría pensarse que el mecanismo que da lugar a los efectos positivos del flúor sobre la calcificación fisiológica se llevara a cabo también en el caso de la calcificación ectópica, como la que tiene lugar en aorta.

A la hora de realizar los tratamientos correspondientes *in vitro* se usaron las concentraciones que presentan en plasma las personas que beben agua fluorada (Husdan, 1976; Singer, 1979; Kaminsky, 1990), sin superar ésta los límites permitidos por la OMS.

Bajo concentraciones normofosfatémicas no se produjo calcificación (Figura RIII-2), por lo que se puede concluir que el flúor no tiene efecto sobre la calcificación con concentraciones normales de calcio y fósforo.

Al elevar la concentración de fosfato en el medio de cultivo, hasta concentraciones presentes en hiperfosfatemia, la calcificación se desarrolló tanto en ausencia como en presencia de flúor, reduciéndose los depósitos de calcio conforme se incrementó la concentración de flúor en el medio de cultivo (Figura RIII-2). A partir de estos resultados se puede deducir que el flúor inhibe la calcificación en VSMCs en presencia de altas concentraciones de fosfato.

Para confirmar el efecto inhibitorio del flúor en la calcificación vascular se realizó una curva dosis-respuesta bajo condiciones calcificantes con concentraciones crecientes de pirofosfato (Figura RIII-3), conocido inhibidor de la calcificación liberado por VSMCs (Fleisch y cols., 1962; Price, 1989; Terkeltaub, 2001; Murshed y cols., 2005; Proudfoot y cols., 2006), en presencia y en ausencia de  $5 \mu\text{M F}^-$ . Esto mismo se llevó a cabo con ácido fosfonofórmico (Figura RIII-4), análogo del pirofosfato, de síntesis química, el cual también se ha demostrado como inhibe la calcificación (Villa-Bellosta y cols., 2007, 2009 y 2011a). En ambos casos la concentración inhibitoria 50 ( $\text{IC}_{50}$ ), concentración necesaria del inhibidor para reducir el grado de calcificación al 50 %, fue menor en presencia de flúor, es decir, en presencia de flúor la concentración de cualquiera de estos inhibidores para inhibir la calcificación es menor que en ausencia de flúor. El efecto complementario de flúor y pirofosfato es mayor que en el caso del ácido fosfonofórmico. La concentración de PPI necesaria en presencia de flúor se redujo al 50 %, en el caso de PFA ésta se redujo aproximadamente un 24 % en presencia de flúor. A partir de estos resultados se puede confirmar que el flúor en presencia de altas concentraciones de fosfato inhibe la calcificación de VSMCs.

#### III. D. DETERMINACIÓN DEL MECANISMO IMPLICADO EN LA INHIBICIÓN DE LA CALCIFICACIÓN “*IN VITRO*” POR FLÚOR

Es conocida la unión del ion flúor a la estructura de la hidroxiapatita, por sustitución de los grupos hidroxilo (Casarett y Doull's, 2008; Palmer y cols., 2012), por lo que podría plantearse la posibilidad de que esta inhibición fuera consecuencia de la unión de este ión a los cristales en crecimiento, mientras otra posibilidad sería que el flúor tuviera un efecto desconocido sobre el metabolismo de las VSMCs que produjera la reducción de la calcificación.

Para determinar la implicación de la actividad de las VSMCs en esta inhibición se incubaron paralelamente células vivas y muertas en presencia de concentraciones crecientes de flúor y alta concentración de fosfato (Figura RIII-5). Tras 5 días en tratamiento, las células muertas calcificaron con una mayor intensidad que las células vivas para todas las concentraciones de flúor. Este hecho refleja la liberación por parte de las VSMCs de inhibidores de la calcificación, los cuales no están presentes en células muertas y como consecuencia de ello la calcificación se ve incrementada en éstas últimas. Sin embargo, la disminución de la calcificación como consecuencia del efecto del flúor únicamente fue observada en células vivas tras el tratamiento de 5 días de duración. A partir de este resultado no se puede concluir que el único efecto del flúor en la calcificación sea sobre la actividad celular, ya que al cuantificar la calcificación a diferentes días de tratamiento en células muertas, al inicio se observa inhibición de la calcificación de forma dosis dependiente como ocurre en células vivas (Figura RIII-6). A partir de estos resultados se deduce que la ausencia de inhibición por flúor en células muertas se debió únicamente a la duración de la calcificación *in vitro*, es decir, a cinco días los depósitos cálcicos eran ya considerables y el efecto protector del flúor había sido superado, teniendo en cuenta, además, que la inhibición de la misma sí tiene lugar al inicio de la calcificación. Por tanto, es posible concluir, ya que la inhibición de la calcificación tiene lugar tanto en células vivas como en muertas y que el flúor inhibe la calcificación mediante un mecanismo físico, sin poder descartar la implicación de un mecanismo biológico, ya que la inhibición es mayor en células vivas que en muertas.

### III. E. EXPRESIÓN “IN VITRO” DE GENES OSTEABLÁSTICOS EN VSMCs TRATADAS CON FLÚOR EN PRESENCIA DE MEDIO CALCIFICANTE

Se han encontrado factores de regulación ósea en los vasos sanguíneos, particularmente en lugares de calcificación medial (Shanahan y cols., 1999; Tyson y cols., 2003; Bostrom, y cols., 1993), por lo que sería esperable la presencia de ellos en estas células.

Como se puede observar en la figura RIII-7 el tratamiento con flúor inhibió la expresión de genes osteoblásticos, en células calcificadas, de manera dosis dependiente. Se analizaron las expresiones de BMP2, CBFA1 y Msx2, observándose que cuanto menor era el grado de calcificación, menor era la expresión de estos osteogenes. Por lo que se puede concluir que la reducción de la calcificación se acompaña de la reducción de la expresión de genes osteoblásticos, pudiendo suponer por tanto que tiene lugar una menor



*transdiferenciación* al fenotipo osteoblástico en presencia de flúor, posiblemente por la menor cantidad de depósitos de fosfatos cálcicos sobre las VSMCs en cultivo.

### III. F. ANÁLISIS DE LOS DEPÓSITOS CÁLCICOS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM) Y DE BARRIDO (SEM)

#### 1. Estudio comparativo de los depósitos entre VSMCs vivas y muertas.-

##### Composición de los depósitos:

A partir de los resultados previos sobre calcificación *in vitro* se concluyó que el efecto del flúor estaba provocado por la alteración del mecanismo físico de calcificación sin descartarse la implicación biológica, por ello se planteó la posibilidad de estudiar los depósitos en las células calcificadas en presencia y ausencia de flúor, tanto en células vivas (como modelo biológico) como en células muertas (como modelo físico).

La composición de los depósitos mediante SEM (Tabla RIII-1) reveló una clara diferencia en el ratio Ca/P entre células vivas (como media 1,18) y células muertas (como media 1,38). El ratio de hidroxiapatita es 1,67, para fosfato anhídrido 1,50 y para fosfato monobásico 1,0. Una baja relación Ca/P está asociada con un estado temprano del proceso de precipitación. Por ello, y de acuerdo a resultados previos de nuestro grupo (Villa-Bellosta y Sorribas y cols., 2009 y 2011), se puede concluir que la precipitación es activamente restringida en células vivas con respecto a las células muertas. Este hecho apoya los resultados correspondientes a la calcificación observada entre células vivas y muertas (Figura RIII-5), y refleja la existencia de inhibidores de la calcificación por parte de las VSMCs vivas, los cuales no están presentes en células muertas, siendo como consecuencia de ello la calcificación más temprana en éstas últimas.

No se observaron diferencias significativas en el ratio Ca/P dependientes de la concentración de flúor para cada modelo. Por ello, y aunque se ha observado que el flúor reduce la calcificación, se puede concluir que su efecto principal consiste en la disminución de los depósitos y en el retraso del proceso de la calcificación (explicado más adelante a partir de los resultados de nanoestructura) aunque no tan eficazmente como los inhibidores endógenos de las VSMCs, ya que si éste fuera el caso se esperaría una menor relación Ca/P

en presencia de flúor, de forma similar a la reducción que tiene lugar entre células muertas y vivas (Tabla RIII-1).

La presencia de azufre y nitrógeno en células vivas (Tabla RIII-1) es representativa de la presencia de proteínas en los depósitos. Estos elementos únicamente aparecen en células vivas, los cuales podrían corresponderse principalmente con inhibidores de la calcificación y/o a la síntesis de una matriz protectora de los cristales en formación. Este resultado coincide con la composición de los depósitos observada mediante TEM (Tabla RIII-2), que mostró una alta presencia de carbono en los depósitos de células vivas, indicando también la presencia de componentes orgánicos, como se había determinado con SEM. El análisis de carbono en los depósitos no se realizó mediante SEM ya que las cintas de carbono empleadas para adherir los fragmentos del fondo de los pocillos al soporte del microscopio interfiere en el análisis.

El ratio Ca/P, como en el caso del análisis mediante SEM, se mostró incrementado en las células muertas respecto a las vivas, lo que indica que el proceso de cristalización está más avanzado en las células muertas.

Apoyando los resultados obtenidos mediante SEM se observa que hay poca influencia de la concentración de flúor en la composición de los depósitos.

#### Textura:

En ausencia de flúor los depósitos en células muertas fueron masivos y cubrieron la superficie total del pocillo, mientras en presencia de éste, aparecieron granos porosos de un tamaño de 10 a 20  $\mu\text{m}$  (Figura RIII-8). Las diferencias en el patrón de los depósitos evidencian la modificación del proceso de calcificación por parte del flúor.

En el caso de las células vivas, las calcificaciones formaron islas de crecimiento en altura, las cuales no cubrieron la superficie del pocillo. La menor cantidad de depósitos (Figura RIII-8) demuestra la activa inhibición de la calcificación por parte de las células vivas.

Al observar estos depósitos a mayor magnificación se observó que los depósitos presentaban forma de cristales laminares formando esferolitos (Figura RIII-9), evolucionando estos cristales hasta forma de varilla y aumentando su densidad conforme se incrementó la

concentración de flúor, observándose este patrón tanto en células muertas (Figura RIII-10) como en células vivas (Figura RIII-11). A partir de estos resultados se puede concluir que el flúor modifica el patrón de cristalización, tanto en células muertas como en células vivas, y por tanto que su efecto es independiente de cualquier actividad celular.

#### Nanoestructura:

La nanoestructura de los depósitos en células muertas (Figura RIII-12) difirió de la observada en células vivas (Figura RIII-13). En células muertas en ausencia de flúor aparecieron nanopartículas laminares y partículas alargadas, mientras en las células vivas en ausencia de flúor la forma fue más fibrilar que la laminar observada en las células muertas. Esta modificación del patrón refleja una calcificación más lenta y organizada debida, probablemente, a la liberación de inhibidores de la calcificación por las células vivas o de proteínas de matriz que intentan organizar los cristales o defenderse de ellos, en lugar de masiva como tuvo lugar en células muertas en ausencia de flúor por la falta de inhibidores del proceso.

Tanto en células muertas como en células vivas la presencia de flúor favoreció el aumento de la densidad en el empaquetamiento y la predominancia de la forma fibrilar, dando lugar a la formación de varillas y apareciendo partículas alargadas cristalinas casi totalmente definidas, difíciles de encontrar en ausencia de flúor. Por lo tanto se puede concluir que el flúor, de forma similar a los inhibidores endógenos de la calcificación (aunque menos potente), da lugar a una calcificación más lenta y organizada. En el caso de las células vivas el patrón es el mismo, sin embargo estas partículas son todavía más fibrilares y definidas en presencia de flúor por la combinación del efecto inhibitorio de los propios inhibidores de las células y el flúor adicionado al medio.

Todo ello lleva a concluir que el flúor tiene un efecto aparente en la forma de las partículas, induciendo la transformación de láminas a forma de varilla, reforzándose esta tendencia en células vivas. Este efecto no es consecuencia de la incorporación del ion fluoruro en los depósitos (como ocurre en las osificaciones óseas y dentales: Palmer y cols., 2012; Singh y cols., 2004), ya que éste no fue detectado en el análisis de la composición, sino que este efecto parece ser consecuencia de una modificación del proceso de cristalización e inhibición de la nucleación, lo que podría explicar la prevención de la calcificación. Este efecto al ser similar en células vivas y muertas indica que el efecto intrínseco de los iones

fluoruro en el proceso de calcificación es independiente de la actividad celular. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la cristalización *in vitro* de las VSMC es diferente a la observada en aortas, ya que en éstas sí se observa la presencia de hidroxiapatita madura (Verberckmoes y cols., 2007; Neven y cols., 2011), y ahí sí que podría estar incorporado.

## 2. Estudio comparativo de los depósitos en VSMCs muertas en función del tiempo (días) de incubación con medio calcificante (Pi 2 mM) / calcificación.-

En estudios previos se observó que las incubaciones prolongadas de células muertas con medio con alto fosfato (Pi 2 mM) dieron lugar a la pérdida de la inhibición de la calcificación por efecto del flúor (Figura RIII-6), por tanto se analizaron los depósitos en VSMCs muertas incubadas con medio calcificante durante diferentes días: día 2, incipiente calcificación; día 3, inicio de la calcificación y efecto inhibitorio del flúor presente; y día 5, calcificación masiva y ausencia observable del efecto inhibitorio del flúor. Con este estudio se pretendió confirmar que la pérdida de la inhibición era consecuencia de la saturación del proceso.

### Composición de los depósitos:

En el análisis por SEM (Tabla RIII-3) se detectó una baja ratio Ca/P a los dos días de incubación con medio calcificante, la cual aumentó al tercer día y se mantuvo con similares valores al quinto día, sin observarse variaciones en función de la concentración de flúor.

Como en el estudio anterior realizado con células vivas y muertas, tampoco aquí se observó influencia del flúor en la ratio Ca/P. Sin embargo, se observa un aumento gradual de la relación Ca/P con el tiempo de cultivo, lo que indica un aumento de la cristalinidad. La ratio al día 2 (aproximadamente 1,18) indica la presencia de especies amorfas, que se comprueba posteriormente por el estudio de las imágenes de los depósitos, y con un elevado contenido de aniones de fosfato ácido ( $\text{HPO}_4^{-2}$ ). Al quinto día el promedio (1,4) se aproxima ya a los valores para  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Por ello se puede concluir que a medida que pasa el tiempo las especies que inicialmente dan lugar a los depósitos se van organizando, evolucionando hacia la estructura de hidroxiapatita.

Textura:

Tras dos días de incubación con medio calcificante las imágenes tanto en presencia como en ausencia de flúor (Figura RIII-14) revelaron una superficie prácticamente lisa y uniforme, lo que indicó que los depósitos eran prácticamente inexistentes, a excepción de granos sueltos, los cuales constituyeron los primeros puntos de calcificación. Estos granos sueltos mostraron una estructura en terrazas, lo que indica que la calcificación tiene lugar en capas superpuestas. El nacimiento de los cristales se localizó principalmente en el núcleo.

Como se puede observar en la figura RIII-15 al tercer día de incubación con medio calcificante la calcificación fue evidente, con una mayor acumulación de elementos pesados de alta densidad (calcio) sobre el núcleo. Esta imagen apoya las conclusiones extraídas de las imágenes del segundo día, los depósitos de fosfato de calcio se forman inicialmente sobre el núcleo de la célula (o dentro de él), debido en parte, probablemente, a la forma muy aplanada de las células, sobre la que sobresale el núcleo o a la carga negativa de los ácidos nucleicos que se unirían al calcio. Conforme se incrementó la concentración de flúor en el medio de cultivo, el montículo de cristales sobre el núcleo se redujo. A partir de estos resultados se puede concluir que el flúor frena el proceso de cristalización, especialmente sobre el núcleo.

Al quinto día (Figura RIII-16) se observó una calcificación masiva, aunque más localizada en el núcleo. Al aumentar la concentración de flúor se observó un menor grado de depósitos y de menor altura.

A partir de estos resultados se puede concluir que aunque en la cuantificación de calcio tras cinco días de calcificación no se observaran diferencias en ausencia o presencia de flúor, es posible que ello fuera consecuencia de que el método de cuantificación de calcio empleado no fuera lo suficientemente sensible para detectar las diferencias observadas mediante microscopía, y sin embargo el flúor sí frene el proceso de calcificación, aunque de un modo mínimo y, probablemente no significativo desde un punto de vista terapéutico, en etapas avanzadas.

### III. G. EFECTO DEL FLÚOR EN LA CALCIFICACIÓN “*IN VIVO*”

Para confirmar el efecto inhibitorio del flúor sobre la calcificación vascular se usó el modelo animal de calcificación vascular e insuficiencia renal crónica utilizado previamente, es decir, ratas sometidas a nefrectomía 5/6 (Shobeiri y cols., 2010).

Como era de esperar los grupos control negativo constituidos por animales no nefrectomizados, independientemente de la dieta que consumían, normal (0,6 %) o alto (1,2 %) fosfato, no mostraron signos de calcificación vascular al cuantificar el calcio presente en sus aortas (Figura RIII-17). Lo mismo ocurrió con el tercer grupo control negativo, constituido por animales nefrectomizados y que consumieron una dieta con Pi al 0,6 % (Figura RIII-17), en este caso tampoco se observaron depósitos cálcicos al analizar sus aortas con la tinción de rojo de alizarina (tinción para calcio) ni con la tinción de von Kossa (tinción para fosfato) (Figura RIII-18).

En el caso del tercer grupo control negativo, formado por animales nefrectomizados que consumían pienso con Pi al 0,6 %, sus valores de fosfato en plasma no se alteraron significativamente respecto a los animales no nefrectomizados y por tanto no se desarrolló el proceso de calcificación vascular, en el tiempo de tratamiento, aun en presencia de insuficiencia renal (Tabla RIII-5). El grupo no nefrectomizado consumidor de pienso con Pi al 1,2 % tampoco presentó valores significativamente elevados de Pi en plasma (Tabla RIII-5), ya que aunque podrían elevarse por la ingesta de esta dieta, su funcionalidad renal era normal y reguló la concentración en plasma, eliminando el exceso por orina (Tabla RIII-6).

La calcificación era esperable en el grupo constituido por animales nefrectomizados y consumidores de dieta con Pi al 1,2 %. En este caso se observó un ligero incremento de la calcificación respecto a los grupos control negativo (Figura RIII-17 y 18).

A partir de los resultados obtenidos con el modelo *in vitro* de calcificación vascular se esperaba que las ratas tratadas con flúor en las mismas condiciones que el grupo control positivo (animales nefrectomizados y consumidores de dieta con Pi al 1,2 %) mostraran un menor grado de calcificación. Sin embargo se observó que incluso los animales que bebían la menor concentración de flúor, 1,5 mg F<sup>-</sup>/l y permitida por la OMS para el tratamiento de las aguas, considerándola segura, mostraron un incremento significativo del grado de

calcificación con respecto al control positivo (Figura RIII-17 y 18). El incremento fue todavía mayor en el grupo de animales que bebían agua con 15 mg F<sup>-</sup>/l (Figura RIII-17 y 18).

A partir del consumo de agua observada durante el tratamiento de los animales se vio que en todos los grupos de animales nefrectomizados se duplicó la ingesta de agua frente al consumo en ratas sanas (no nefrectomizadas) (Tabla RIII-4). Al analizar la analítica sanguínea y de orina (Tabla RIII-5 y 6) se observó que todos los grupos nefrectomizados, frente a los no nefrectomizados, presentaron una mayor concentración de urea y creatinina en sangre como consecuencia de la reducción de la filtración glomerular, y disminuyeron la de calcio. En el caso de los parámetros renales disminuyó la creatinina en orina. Por todo ello podemos afirmar que todos los grupos sometidos a nefrectomía desarrollaron insuficiencia renal. En el caso de los animales que consumieron pienso con Pi al 1,2 % se incrementó la concentración del mismo en plasma respecto a los animales que consumieron pienso con Pi al 0,6 %, lo que junto con la demostrada insuficiencia renal favorecería el desarrollo de la calcificación vascular en todos los grupos que consumían este pienso. Por todo ello, es posible descartar que el menor grado de calcificación en el grupo control positivo frente a los grupos tratados con flúor fuera por ausencia de desarrollo de insuficiencia renal, sino que este fue debido a otros factores.

Al comparar los resultados de los analíticas sanguíneas y de orina de los grupos control positivo (Nx + 1,2 % Pi) y los animales sometidos a las mismas condiciones pero tratados con flúor (Nx + 1,2 % Pi + F), se observó que la concentración de urea, creatinina y fosfato en plasma fue menor en los animales control positivo que en los que bebieron agua con flúor (tanto 1,5 como 15 mg F<sup>-</sup>/l) y se redujo más la concentración de calcio en plasma en los tratados con flúor, siendo esto último consecuencia del déficit de calcitriol que impide la absorción intestinal de calcio, dando esto lugar al incremento de PTH e incrementando finalmente el grado de hiperfosfatemia por mayor liberación desde el hueso, pero menor excreción urinaria por la insuficiencia renal existente. En orina se redujo la concentración de creatinina y fosfato en los animales tratados con flúor, reflejo de la mayor disminución de la filtración. Todo ello es indicativo de que los animales tratados con flúor desarrollaron un mayor grado de insuficiencia renal durante el tratamiento, pudiendo concluir que el causante de ello fue el tratamiento con flúor (ya que el resto de condiciones fueron las mismas que en el grupo control positivo). El mayor grado de insuficiencia renal en las ratas tratadas con

flúor provocó una mayor concentración de fosfato en plasma lo que derivó en un incremento del grado de calcificación vascular.

Por todo ello, en vista de los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo*, no se puede descartar que el flúor inhiba mediante un mecanismo físico el grado de calcificación vascular, lo cual se ha demostrado *in vitro*. Sin embargo, esta inhibición *in vivo* es eclipsada, ya que el tratamiento con flúor incrementa el grado de insuficiencia renal y esto conlleva un aumento del grado de calcificación vascular como consecuencia del incremento de fosfato en plasma y posiblemente por la mayor presencia de toxinas urémicas en sangre que también inducen su desarrollo. Por todo ello, aunque la concentración de 1,5 mg F<sup>-</sup>/l en el agua de bebida sea considerada segura, debería ser revisada, ya que aunque no desarrolle efectos adversos en individuos sanos sí incrementa el grado de insuficiencia renal en animales ya enfermos.





## **VI. CONCLUSIONES**



Las conclusiones más relevantes que pueden derivarse de este trabajo son:

1. El límite de Hayflick para VSMCs es superior a 100 divisiones. A dichas divisiones la división celular no se detiene aunque ya existen signos de envejecimiento.
2. El envejecimiento de las VSMCs tiene lugar gradualmente, a medida que las células acumulan divisiones, tanto *in vitro* como *in vivo*.
3. Las VSMCs se desdiferencian de modo gradual, a medida que acumulan divisiones y envejecen, tanto *in vitro* como *in vivo*. Conforme las VSMCs acumulan divisiones reducen su velocidad de multiplicación y su morfología cambia, siendo esto último consecuencia del proceso de envejecimiento, del proceso de desdiferenciación celular y del incremento del porcentaje de otros tipos celulares minoritarios al inicio del cultivo.
4. Las células procedentes de animales jóvenes, debido a que han acumulado *in vivo* menos divisiones, se encuentran en un estado menos envejecido que las extraídas de animales de mayor edad, y de este modo su envejecimiento y desdiferenciación se encuentran retardados *in vitro* con respecto a las células extraídas de animales de mayor edad.
5. El envejecimiento de las células *in vivo* e *in vitro* incrementa la apoptosis y estrés oxidativo, pudiendo verse exacerbada la apoptosis en función del grado/tipo de desdiferenciación celular.
6. La *transdiferenciación* osteogénica *in vitro* tiene lugar durante el proceso de envejecimiento, sin ser necesarios previamente depósitos cálcicos, y no ocurriendo simultáneamente con todos los factores: BMP2 es el primero que se expresa, seguido de Cbfa1 y por último Msx2. La *transdiferenciación* osteogénica *in vitro* se produce antes cuanto mayor es la edad del animal donante de VSMCs.
7. La desdiferenciación y *transdiferenciación* que tienen lugar durante el envejecimiento de las VSMCs favorecen el desarrollo de la calcificación vascular, sin embargo, no pueden llegar a considerarse los únicos o principales factores desencadenantes.
8. Tanto  $As^{III}$  como  $As^V$  a concentración 100  $\mu M$  se pueden considerar tóxicos para VSMCs en cultivo, siendo más tóxica la forma trivalente que la pentavalente. Las formas metiladas, MMA y DMA, no inducen citotoxicidad en VSMCs.
9. El arsénico es capaz de desencadenar el proceso de senescencia prematura inducida por estrés (SIPS) tanto *in vitro* como *in vivo*. La pérdida de marcadores de VSMCs se puede relacionar con el proceso de senescencia inducida por estrés.

10. El arsénico no es suficiente para inducir la calcificación de VSMCs bajo concentraciones fisiológicas de fosfato y calcio. La inducción de senescencia por parte del arsénico no es suficiente para inducir el proceso de calcificación vascular ni *transdiferenciación* osteogénica. El incremento *in vitro* e *in vivo* de la calcificación parece ser consecuencia del efecto sinérgico de fosfato y arsénico sobre el incremento de la citotoxicidad.
11. En condiciones hiperfosfatémicas la presencia de flúor disminuye la calcificación *in vitro* de VSMCs. La reducción de la calcificación en presencia de flúor parece ser consecuencia de la modificación del proceso de cristalización e inhibición de la nucleación de forma independiente de la actividad celular y sin incorporarse el ion fluoruro a los depósitos *in vitro*.
12. En condiciones hiperfosfatémicas *in vitro*, como las que tienen lugar en fallo renal crónico, el flúor disminuye la citotoxicidad y la expresión de osteogénes, posiblemente como consecuencia del menor depósito de fosfatos de calcio.
13. A medida que se incrementa el tiempo de calcificación los depósitos incrementan su cristalinidad, organizándose y evolucionando hasta la estructura de hidroxiapatita. La calcificación tiene lugar en capas superpuestas, las cuales se reducen en presencia de flúor.
14. El patrón de calcificación observada en células vivas refleja una calcificación más lenta y organizada que la que tiene lugar en células muertas. Esa diferencia parece ser consecuencia de la presencia de inhibidores de la calcificación, ausentes en las células muertas. El flúor da lugar a una calcificación más lenta y organizada, como la que tiene lugar en presencia de inhibidores endógenos de la calcificación.
15. *In vivo*, la ingesta de agua por individuos con insuficiencia renal, a dosis considerada segura por la Organización Mundial de la Salud (OMS) puede agravar la insuficiencia renal, lo que derivaría en el incremento del grado de calcificación vascular.

## **VII. REFERENCIAS**



- Absher M, Woodcock-Mitchell J, Mitchell J, Baldor L, Low R, Warshaw D. (1988). Characterization of vascular smooth muscle cells phenotype in long term culture. *In Vitro cellular and developmental biology*, **25** (2): 183-192.
- Abulaiti A, Fikaris AJ, Tsygankova OM, Meinkoth JL. (2006). Ras induces chromosome instability and abrogation of the DNA damage response. *Cancer Res.* **66(21)**: 10505-10512.
- Ahmed S, O'Neill KD, Hood AF, et al. (2001). Calciphylaxis is associated with hyperphosphatemia and increased osteopontin expression by vascular smooth muscle cells. *Am J Kidney Dis.* **37**: 1267–1276.
- Alarcon-Vargas D, Ronai Z. (2002). p53-Mdm2--the affair that never ends *Carcinogenesis.* **23(4)**: 541-547.
- Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JC. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicativa senescence of normal human fibroblast. (1996). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93(24)**: 13742-13747.
- Amann, K. (2008). Media Calcification and Intima Calcification Are Distinct Entities in Chronic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* **3**: 1599–1605.
- Amini M., K.C. Abbaspour, M. Berg, L. Winkel, S. J. Hug, E. Hoehn, H. Yang, C.A Johnson (2008) Preliminary Statistical Modeling of Global Geogenic Arsenic Contamination in Groundwater. *Environ. Sci. Technol.* **42**: 3669–3675.
- Andrés, E. (2004). Fisiopatología de la insuficiencia renal crónica. *Anales de Cirugía Cardíaca y Vasculat*; **10(1)**: 8-15.
- Andress DL. (2005). Vitamin D treatment in chronic kidney disease. *Semin Dial.* **18(4)**: 315-21.
- Alcazar R.; Orte, L.; Otero, A. (2008). Enfermedad renal crónica avanzada. Guías Sociedad Española de Nefrología (S.E.N.). *Nefrología.* **3**: 3-6.
- Arking, R. Biology of Aging. (1998). Segunda Edición, Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, EE.UU. (Páginas 9-13, 367-415, 445-460).



- ATSDR (2003): Toxicological Profile for Fluorides, Hydrogen Fluoride, and Fluorine (Update). Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, Georgia. (Páginas 1–356).
- Avolio A. (1995). Genetic and environmental factors in the function and structure of the arterial wall. *Hypertension*. **26**: 34–37.
- Bailey M, Pillarisetti S, Jones P, Xiao H, Simionescu D, Vyavahare N. (2004). Involvement of matrix metalloproteinases and tenascin-C in elastin calcification. *Cardiovasc Pathol*. **3**: 146–155.
- Balakumar P, and Kaur J. (2009). Arsenic exposure and cardiovascular disorders: an overview. *Cardiovasc. Toxicol*. **9**: 169-176.
- Bao, L., Shi, H. (2010). Arsenite induces endothelial cell permeability increase through a reactive oxygen species-vascular endothelial growth factor pathway. *Chem. Res Toxicol*. **23**: 1726-1734.
- Bayreuther, K., Rodemann, H. P., Hommel, R., Dittmann, K., Albiez, M., and Francz, P. I. (1988). Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **85**(14): 5112-5116.
- Beck L, Leroy C, Salaün C, Margall-Ducos G, Desdouets C, Friedlander G. (2009). Identification of a novel function of PiT1 critical for cell proliferation and independent of its phosphate transport activity. *J Biol Chem*. **284**(45): 31363-74.
- Benditt EP, Benditt JM. (1973). Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **70**: 1753–1756.
- Bierman, E. L. (1978). The effect of donor age on the in vitro life span of cultured human arterial smooth-muscle cells. *In Vitro*. **14**(11): 951-955.
- Blackburn EH, Gall JG. (1978). A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. *J Mol Biol*. **120**(1): 33-53.
- Blackburn EH. (2000). Telomere states and cell fates. *Nature*. **408**(6808): 53-56.

- Blackburn EH. (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell*. **106**: 661–73.
- Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, Greider CW. (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*. **91**(1): 25-34.
- Blumenfeld OO, Schwartz E, Hearn VM, Kranepool MJ. (1979). Vascular smooth muscle cells for studies of cellular aging in Vitro; and examination of changes in structural cells lipids. *Int Rev Cytol Suppl*. **10**: 77-91.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., Wright, WE. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. **279**(5349): 349–352.
- Bochaton-Piallat M-L, Gabbiani F, Ropraz P, Gabbiani G. (1993). Age influences the replicative activity and the differentiation features of cultured rat aortic smooth muscle cell populations and clones. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **13**: 1449–1455.
- Bochaton-Piallat M-L, Ropraz P, Gabbiani F, Gabbiani G. (1996). Phenotypic heterogeneity of rat arterial smooth muscle cell clones: implications for the development of experimental intimal thickening. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **16**: 815– 820.
- Bonucci E., Sadun R. (1975) Dihydratichysteol-induced aortic calcification. A histochemical and ultrastructural investigation. *Clin Orthop Relat Res*. **107**: 283-294.
- Bonucci, E. Biological Calcification. (2007). Normal and Pathological Processes in the Early Stages. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemania. Capítulo 4 – The Nature and Composition of the Inorganic Phase (Páginas 85-86), Capítulo 5 – The Shape of Inorganic Particles (Páginas 127-128), Capítulo 6 – The Size of Inorganic Particles (Páginas 157-158), Capítulo 14 – Calcifying Matrices: Pathological Calcifications (Páginas 394-401).
- Bostrom, K., Watson, K.E., Horn, S., Wortham, C., Herman, I.M., Demer, L.L. (1993). Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J. clin. investig*. **91**(4): 1800–1809.

- Boström K., Demer LL. (2000). Regulatory mechanism in vascular calcification. *Cri Rev Eukaryot Gene Expr.* **10**: 151-158.
- Boström K. (2001). Insights into the mechanism of vascular calcification. *Am J Cardiol.* **88**: 20E-22E.
- Bostrom K, Tsao D, Shen S, Wang Y, Demer LL (2001). Matrix GLA protein modulates differentiation induced by bone morphogenetic protein-2 in C3H10T1/2 cells. *Journal of Biological Chemistry.* **276**: 14044-14052.
- Brack C, Lithgow G, Osiewacz H, Toussaint O. (2000). EMBO Workshop Report: Molecular and cellular gerontology Serpiano, Switzerland, September 18-22, 1999. *EMBO J.* **19**(9): 1929-1934.
- Bradford, M. M. (1976). 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.
- Brown, W. E.; Eidelman, N.; Tomazic B. (1987). Octacalcium phosphate as a precursor in biomineral formation. *Adv Dent Res.* **1**(2): 306-313.
- Brunk, U., Ericsson, J. L., Ponten, J., and Westermarck, B. (1973). Residual bodies and "aging" in cultured human glia cells. Effect of entrance into phase 3 and prolonged periods of confluence. *Exp Eye Res.* **79**(1): 1-14.
- Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. (1998). Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* **12**: 1260–1268.
- Bürrig, K.F. (1991). The endothelium of advanced arteriosclerotic plaques in humans. *Arterioscler. Thromb.* **11**: 1678–1689.
- Burton, G., Sheerin, S., Lawton, O., Rhys-Williams, Kipling, Faragher. (2009). Microarray analysis of senescent vascular smooth muscle cells: A link to atherosclerosis and vascular calcification. *Experimental Gerontology.* **44**(10): 659-665.

- Burton D.G.A., Matsubara H., Ikeda K. (2010). Pathophysiology of vascular calcification: Pivotal role of cellular senescence in vascular smooth muscle cells. *Experimental Gerontology*. **45**: 819–824.
- Byon, C.H., Javed, A., Dai,Q., Kappes, J.C., Clemens, T.L., Darley-Usmar, V.M.,McDonald, J.M., Chen, Y. (2008). Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor RUNX-2 by AKT signaling. *J. Biol. Chem.* **283**(22): 15319–15327.
- Camello-Almaraz C, Gomez-Pinilla PJ, Pozo MJ, Camello PJ. (2006). Mitochondrial reactive oxygen species and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Am J Physiol Cell Physiol.* **291**(5): C1082-1088.
- Campbell GR, Campbell JH. (1985). Smooth muscle phenotypic changes in arterial wall homeostasis: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Exp Mol Pathol.* **42**: 139–162.
- Campbell GR, Campbell JH. (2000). Vascular smooth muscle and arterial calcification. *Z Kardiol.* **89**: 54-62.
- Campisi, J. (1999). Replicative senescence and immortalization. En: The molecular basis of cell cycle and growth control. Wiley-Liss, New York, (Páginas: 348-373).
- Campisi, J., (2001). Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol.* **11**: S27–S31.
- Campisi, J., Dimri, G., Hara, E. (1995) Control of replicativa Senescence, Handbook of the Biology of Aging, eds. Schneider, E. L. & Rowe, J. W. (Academic,San Diego), Cuarta edición (Páginas: 121-140).
- Carrel A. (1912). On the permanent life of tissues outside of the organism. *J Exp Med.* **15**(5): 516–528.
- Casarett y Doull's. (2008). Toxicology, the basic science of poisons. Séptima edición. Editor Curtis D. Klaassen, Ph.D. McGraw-Hill – Nueva York. (Chapter 23 – Toxic Effects of Metals (Páginas 936-939; 965)).

Cazzalini O, Scovassi AI, Savio M, Stivala LA, Prosperi E. (2010). Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response. *Mutat Res.* **704**(1-3): 12-20.

Centers for Disease Control and Prevention. (2001). Recommendations for using fluoride to prevent and control dental caries in the United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) Recommendations and Reports.* **50**(RR-14):1-42.

Chamley, J. H., G. R. Campbell, and J. D. McConnell. (1977). Comparison of vascular smooth muscle cells from adult human, monkey and rabbit in primary culture and in subculture. *Cell Tissue Res.* **177**: 503–522.

Chamley-Campbell, J. H., Campbell, G. R., Ross R. (1979). The smooth muscle cell in culture. *Physiol. Rev.* **59**: 1-61.

Chang E, Harley CB. (1995). Telomere length and replicative aging in human vascular tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**: 11190 –11194.

Chen D, Zhao M, Mundy GR. (2004) Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors.* **22**: 233–241.

Chen NX, Duan D, O’Neill KD, Wolisi GO, Koczman JJ, LaClair R, Moe SM. (2006). The mechanisms of uremic serum-induced expression of bone matrix proteins in bovine vascular smooth muscle cells. *Kidney International.* **70**: 1046–1053

Chen QM, Prowse KR, Tu VC, Purdom S, Linskens MH. (2001). Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. *Exp Cell Res.* **265**(2): 294-303.

Cheng H, Qiu L, Zhang H, Cheng M, Li W, Zhao X, Liu K, Lei L, Ma J. (2011). Arsenic trioxide promotes senescence and regulates the balance of adipogenic and osteogenic differentiation in human mesenchymal stem cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* **43**(3): 204-209.

Cherif, J. L. Tarry, S. E. Ozanne, C. N. Hales. (2003). Ageing and telomeres: a study into organ- and gender-specific telomere shortening. *Nucleic Acids Research.* **31**(5): 1576-1583,

- Chou, Q. Y cols. (1992). Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res.* **20**: 1717-1723.
- Cleveland, D. W., Fischer, S. G., Kirschner, M. W., and Laemmli, U. K. (1977). Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **252**: 1102–1106.
- Climent I, Tsai L, Levine RL. (1989). Derivatization of r-glutamyl semialdehyde residues in oxidized proteins by fluoresceinamine. *Anal. Biochem.* **182**(2): 226-232.
- Climent, S., Sarasa, M., Muniesa, P., Latorre, R. (2005). Manual de anatomía y embriología de los animales domésticos. Conceptos básicos y datos aplicativos. Cabeza, aparato respiratorio, aparato digestivo, aparato urogenital. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza. (Páginas: 291-299).
- Climent, S., Sarasa, M., Dominguez, L., Muniesa, P., Terrado, J. (2005). Manual de anatomía y embriología de los animales domésticos. Conceptos básicos y datos aplicativos. Embriología General. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza. (Páginas 70-72).
- Collado M, Serrano M. (2006). The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer.* **6**(6): 472-476.
- Collet GDM. Candfield AE. (2005). Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. *Cir Res.* **96**: 930-938.
- Coltoff-Schiller, B., Goldfischer, S., Adamany, A.M., and Wolinsky, H. (1976). Endocytosis by vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. Roles of vesicles and lysosomes. *Am J Pathol.* **83**: 45-60.
- Coppé, J.P., Patil, C.K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D.P., Goldstein, J., Nelson, P.S., Desprez, P.Y., Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cellnonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* **6**(12): 2853–2868.
- Cristofalo VJ. (1988). Cellular biomarkers of aging. *Exp Gerontol.* **23**(4-5): 297-307.
- Cristofalo, V. J., and Pignolo, R. J. (1993). Replicative senescence of human fibroblast-like

cells in culture. *Physiol Rev.* **73**(3): 617-638.

Cristofalo VJ, Lorenzini A, Allen RG, Torres C, Tresini M. (2004). Replicative senescence: a critical review. *Mech Ageing Dev.* **125**(10-11): 827-848.

Cunningham, J. G., y cols. (2005). Fisiología veterinaria. Tercera edición. Editorial Elsevier. (Páginas: 430-437).

d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature.* **426**: 194–198.

da Luz PL, Tanaka L, Brum PC, Dourado PM, Favarato D, Krieger JE, Laurindo FR. (2012). Red wine and equivalent oral pharmacological doses of resveratrol delay vascular aging but do not extend life span in rats. *Atherosclerosis.* **224**(1): 136-142.

Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. (2006) Protein Carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J. Cell. Mol. Med.* **10**(2): 389-406.

Davies KJ, Delsignore ME, Lin SW. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals II. Modification of amino acids. *J. Biol. Chem.* **262**(20): 9902-9907.

Davies JD, Carpenter KL, Challis IR, Figg NL, McNair R, Proudfoot D (2005). Adipocytic differentiation and liver x receptor pathways regulate the accumulation of triacylglycerols in human vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* **280**: 3911–9.

Dao HH, Essalihi R, Bouvet C, Moreau P. (2005). Evolution and modulation of age-related medial elastocalcinosis: impact on large artery stiffness and isolated systolic hypertension. *Cardiovasc Res.* **66**: 307–317.

Daoud AS., Frank AS., Jarmolych J., Franco WT., Fritz KE. (1985) Ultrastructural and elemental analysis of calcification of advanced swine aortic atherosclerosis. *Exp Mol Pathol.* **43**: 337-347.

de Lange, T. (2002). Protection of mammalian telomeres. *Oncogene.* **21**: 532–540.

- de Magalhaes, J. P. (2008). Integrative Genomics of Ageing Group. Cellular Senescence: Hayflick's Limit and Aging Cells. <http://www.senescence.info/cells.html>
- Demer LL, Tintut Y. (2003) Mineral exploration: search for the mechanism of vascular calcification and beyond: the 2003 Jeffrey M Hoeg Award Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **23**:1739-1743.
- Demer LL, Tintut Y. (2008). Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation.* **117**(22): 2938-2948.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., y cols (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**(20): 9363-9367.
- Dorai H, Vukicevic S, Sampath TK. (2000). Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1) inhibits smooth muscle cell proliferation and stimulates the expression of markers that are characteristic of SMC phenotype in vitro. *J Cell Physiol.* **184**: 37– 45.
- Duan, X., Zhou, Y., Teng, X., Tang, C., and Qi, Y. (2009). Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis is activated in vascular calcification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **387**: 694-699.
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. (1997). Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.* **89**: 747–754.
- Dyce, K.M. ; Sack, W.O.; Wensing, C.J.G. (2012). Anatomía veterinaria. Manual Moderno, México.
- Earle, W. R. (1943). Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in living cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **4**: 165-212.
- Eastman Q, Grosschedl R. (1999). Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr Opin Cell Biol.* **11**: 233–240.
- Eaton, DC; Pooler, JP. (2006). Fisiología renal de Vander – Serie Lange de Fisiología. Sexta Edición. McGraw Hill, México (Páginas: 180-190).



Ebeling AH. (1913). The permanent life of connective tissue outside of the organism. *J Exp Med.* **17**(3): 273-285.

Eisenstein R., Trueheart RE., Hass GM. (1960) Pathogenesis of abnormal tissue calcifications. Sognnaes RF (editor) Calcification in biological systems. American Association for the Advances of Sciences, Washington (Páginas: 281-305).

Eisenstein R., Zeruolis L. (1964). Vitamin-D induced aortic calcification. *Arch Path.* **77**: 27-35.

Elliott RJ, McGrath LT. (1994). Calcification of the human thoracic aorta during aging. *Calcif Tissue Int.* **54**(4): 268-273.

Epple, M.; Bäuerlein, E.; (editores). (2007). Handbook of Biomineralization. Aspects of Pathological Calcifications. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. (Páginas 4, 285-299).

Erusalimsky, J. D.; Kurz, D. J. (2005). Cellular senescence in vivo: Its relevance in ageing and cardiovascular disease. *Experimental Gerontology.* **40**: 634–642.

Essalihi R, Dao HH, Gilbert LA, Bouvet C, Semerjian Y, McKee MD, Moreau P. (2005). Regression of medial elastocalcinosis in rat aorta: a new vascular function for carbonic anhydrase. *Circulation.* **112**: 1628–1635.

Essalihi, R.; Ouellette, V.; Dao, HH.; McKee, MD.; Moreau, P. (2004). Phenotypic Modulation of Vascular Smooth Muscle Cells During Medial Arterial Calcification: a Role for Endothelin?. *J Cardiovasc Pharmacol.* **44**(Supl 1): S147-50.

Ewence AE, Bootman M, Roderick HL, Skepper JN, McCarthy G, Epple M. (2008). Calcium phosphate crystals induce cell death in human vascular smooth muscle cells: A potential mechanism in atherosclerotic plaque destabilization. *Circ Res.* **103**: e28 – e34.

Farber, J.M., Levine, R.L. (1986) Sequence of a peptide susceptible to mixed function oxidation. Probable cation binding site in glutamine synthetase. *J. Biol. Chem.* **261**: 4574-4578.

Fitzpatrick LA, Severson A., Edwards WD., Ingram RT. (1994). Diffuse calcification in

human coronary arteries. Association of osteopontin with atherosclerosis. *J Clin Invest.* **94**: 1597-1604.

Fleisch H.; Bisaz, S. (1962). Mechanism of calcification: Inhibitory role of pyrophosphate. *Nature.* **195**: 911.

Foreman; Kimberly E.; Tang, J. (2003). Molecular mechanisms of replicative senescence in endothelial cells. *Experimental Gerontology.* **38**: 1251–1257,

Forster IC, Hernando N, Biber J, Murer H. (2012). Phosphate Transport Kinetics and Structure-Function Relationships of SLC34 and SLC20 *Proteins.* *Curr Top Membr.* **70**: 313-356.

Fowler,S., Shio, H., and Wolinsky H. (1977). Subcellular fractionation and morphology of calf aortic smooth muscle cells: studies on whole aorta, aortic explants, and subcultures grown under. *J Cell Biol.* **75**(1): 166–184.

Frame FM, Rogoff HA, Pickering MT, Cress WD, Kowalik TF. (2006). E2F1 induces MRN foci formation and a cell cycle checkpoint response in human fibroblasts. *Oncogene.* **25**(23): 3258-3266.

Franceschi RT, Xiao G. (2003). Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways. *J Cell Biochem.* **88**: 446–454.

Franke, W. W., Schmid, E., Vandekerckhove, J., Wever, K. (1980). A permanently proliferation rat vascular smooth muscle cell with maintained expression of smooth muscle characteristics, including actin of the vascular smooth muscle type. *J. Cell Biol.* **87**: 594-600.

Fukui, N., Zhu, Y., Maloney, W.J., Clohisy, J., Sandell, L.J., (2003). Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes. *J. Bone Joint Surg. Am.* **85-A**: 59–66.

Galvin KM, Donovan MJ, Lynch CA, Meyer RI, Paul RJ, Lorenz JN, Fairchild-Huntress V, Dixon KL, Dunmore JH, Gimbrone MA Jr, Falb D, Huszar D. (2000). A role for smad6 in development and homeostasis of the cardiovascular system. *Nat Genet.* **24**: 171–174.

- García, M. H. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico*. **1**(2): 31-34.
- Gardner MB, Blackenhorn DH. (1968) Aortic medial calcification. An ultrastructural study. *Arch Pathol*. **85**: 397-403.
- Garg, K.; Lomashvili, KA.; O'Neill, WC. (2005). American Society of Nephrology, *ASN Renak Week*. Abstr. F-FC, 72.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. **119**(3): 493–501.
- Gennaro G, Ménard C, Michaud SE, Rivard A. (2003). Age-dependent impairment of reendothelialization after arterial injury: role of vascular endothelial growth factor. *Circulation*. **107**(2): 230-233.
- Gerland, L. M., Peyrol, S., Lallemand, C., Branche, R., Magaud, J. P., and Ffrench, M. (2003). Association of increased autophagic inclusions labeled for beta-galactosidase with fibroblastic aging. *Exp Gerontol*. **38**(8): 887-895.
- Gey, G. O., Coffman, W. D., Kubicek, M. (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of the cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res*. **84**: 63-71.
- Gey GO, Svtelisl M, Foard M, Bang FB. (1974). Long-term growth of chicken fibroblasts on a collagen substrate. *Exp Cell Res*. **84**(1): 63-71.
- Giachelli CM. (2001). Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res*. **89**(12): 1147-1154.
- Giraud, S.; Favreau, F.; Chatauret, N.; Thuillier, R.; Maiga, S. y Hauet, T. (2011). Contribution of Large Pig for Renal Ischemia-Reperfusion and Transplantation Studies: The Preclinical Model. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. **2001**: 1-14.
- Glenn WD (2002). Fluoride (F), an essential pre-eruptive nutrient. *J Dent Res*. **81**(8): 516.

Goodwin, A.M., and D'Amore, P.A. (2002). Wnt signaling in the vasculature. *Angiogenesis*. **5**: 1–9.

Goldstein, S., Littlefield JW, Soeldner JS. (1969). Diabetes mellitus and aging: diminished planting efficiency of cultured human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **64**(1): 155–160

Goldstein, S. (1974). Aging in vitro. Growth of cultured cells from the Galapagos tortoise. *Exp Cell Res*. **83**(2): 297-302.

Goldstein, S. (1990). Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science*. **249**(4973): 1129-1133.

Gospodarowicz, K. Hirabayashi, L. Giguere, And J .-P. Tauber. (1981). Factors Controlling the Proliferative Rate, Final Cell Density, and Life Span of Bovine Vascular Smooth Muscle Cells in Culture. *The Journal Of Cell Biology*. **89**: 568-578.

Gravina, S.; Vijg, J. Epigenetic factor in aging and longevity. (2010). *Pflugers Arch – Eur Physiol*. **459**: 247-258.

Greider CW, Blackburn EH. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*. **43**(2 Pt 1): 405-413.

Haber, DA. Telomeres, Cancer, and Immortality. (1995). *N Engl J Med*. **332**: 955-956.

Häberle labortechnik GmbH + Co. Counting chamber, Neubauer. [http://shop.haeberle-lab.de/info318\\_lang\\_UK.htm](http://shop.haeberle-lab.de/info318_lang_UK.htm)

Halayko, Aj.; Jsolway, J. (2001). Plasticity in Skeletal, Cardiac, and Smooth Muscle Invited Review: Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in smooth muscle cells. *J Appl Physiol*. **90**: 358-368.

Hao H, Hirota S, Tsukamoto Y, Imakita M, Ishibashi-Ueda H, Yutani C. (1995). Alterations of bone matrix protein mRNA expression in rat aorta in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **15**: 1474–1480.

Harley, C.B., Futcher, A.B., Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. **345**: 458–460.

- Harrison, R. G. (1910). The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. *J. exp. Zool.* **9**: 787–846.
- Hayflick, L., and Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* **25**: 585-621.
- Hayflick, L. (1965). The limited in vitro time of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research.* **37**: 614-636.
- Hayflick, L. (1977). En Handbook of the Biology of Aging, editors Finch, C. E., Hayflick, L. (Van Nostrand Reinhold, New York) (Páginas: 159-186).
- Hayflick (1982) Biological aspects of human aging. *Brit. J. Hospital Med.* **27**: 366-368.
- Hayflick, L. (1985). The cell biology of aging. *Clin Geriatr Med.* **1**(1): 15-27.
- Hayflick, L. (1994). How and Why We Age. Ballantine Books, New York.
- Hayflick, L. (1997). Mortality and Immortality at the Cellular Level. A Review. *Biochemistry (Mosc).* **62**(11): 1180-1190.
- Heidcamp, W. H. Cell Biology Laboratory Manual. Chapter 1 Microscope. Figure 1.8. <http://homepages.gac.edu/~cellab/chpts/chpt1/figure8.html>.
- Heinecke, J.W., y cols. (1993) Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase/hydrogen peroxidase system of human neutrophil and macrophages. *J. Biol. Chem.* **268**: 4069-4077.
- Heiss A, DuChesne A, Denecke B, Grotzinger J, Yamamoto K, Renne T, Jahnen-Dechent W. (2003). Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles. *J Biol Chem.* **278**: 13333–13341.
- Heistad, D.D., Marcus, M.L., Larsen, G.E., and Armstrong, M.L. (1981). Role of vasa vasorum in nourishment of the aortic wall. *Am. J. Physiol.* **240**: H781–H787.
- Hernando Avendaño, L. (2008). Nefrología Clínica. Editorial Médica Panamericana. Madrid-España. Tercera Edición (Páginas: 799-806).

- Holliday, R. (1995). *Understanding Ageing*. Cambridge University Press (Páginas: 67-74, 77-82).
- Hornsby PJ. (2010). Senescence and life span. *Pflugers Arch.* **459**(2): 291-299.
- Hruska KA, Mathew S, Saab G. (2005). Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circ Res.* **97**:105-114.
- Hsiao R, Sharma HW, Ramakrishnan S, Keith E, Narayanan R. (1997). Telomerase activity in normal human endothelial cells. *Anticancer Res.* **17**: 827–832.
- Hu H, Hilton MJ, Tu X, Yu K, Ornitz DM, Long F. (2005). Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development.* **132**(1): 49-60.
- Hu Y, Zhang Z, Torsney E, Afzal AR, Davison F, Metzler B, Xu Q. (2004). Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **113**: 1258–1265.
- Hujairi NM, Afzali B, Goldsmith DJ. (2004). Cardiac calcification in renal patients: what we do and don't know. *Am J Kidney Dis.* **43**: 234–243.
- Hunter GK, Goldberg HA. (1993). Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**: 8562–8565.
- Innoprot. (2012). [http://www.innoprot.com/es\\_productos.asp?idsf=40&id=8&idp=165](http://www.innoprot.com/es_productos.asp?idsf=40&id=8&idp=165). Fotografías células endoteliales, fibroblastos y VSMCs.
- Invitrogen - Molecular Probes. (2008) Click-iT® TUNEL Alexa Fluor® Imaging Assay. MP 10245. (Página: 3 – Figura 3. Detection of apoptosis with the Click-iT. TUNEL imaging assay.).
- Invitrogen Corporation. (2010). ELISA Kit – Rat IL1β (Página: 20 – Figura: Rat IL-1β Assay Summary).
- Iyemere, V.P., Proudfoot, D., Weissberg, P.L., and Shanahan, C.M. (2006). Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification. *J. Intern. Med.* **260**: 192-210.

- Jan, R. (2005). Tesis doctoral. Figura: Schema der Immundetektion.
- Johnson K, Polewski M, van Etten D, Terkeltaub R. (2005). Chondrogenesis mediated by  $PP_i$  depletion promotes spontaneous aortic calcification in  $NPP1^{-/-}$  mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **25**: 686–691.
- Johnson, RC.; Leopold, JA.; Loscalzo, J. (2006). Vascular Calcification: Pathobiological Mechanisms and Clinical Implications. *Circ. Res.* **99**: 1044-1059.
- Jones, M. R., Ravid, K. (2004). Vascular Smooth Muscle Polyploidization as a Biomarker for Aging and Its Impact on Differential Gene Expression. *The Journal of Biological Chemistry.* **279**(7): 5306–5313,
- Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, Morii H. (1997). Parathyroid hormone-related peptide as a local regulator of vascular calcification. Its inhibitory action on in vitro calcification by bovine vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **17**(6): 1135-1142.
- Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, Morii H. (1998). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide. *Circulation.* **98**(13): 1302-1306.
- Jono, S., McKee, M.D., Murry, C.E., Shioi, A., Nishizawa, Y., Mori, K., Morii, H., and Giachelli, C.M. (2000). Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res.* **87**: E10-E17.
- Jono S, Peinado C, Giachelli CM. (2000). Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Biol Chem.* **275**: 20197–20203.
- Jung YS, Qian Y, Chen X. (2010). Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cell Signal.* **22**(7): 1003-1012.
- Kaminsky, LS.; Mahoney, MC.; Leach, J.; Melius, J.; Miller, MJ. (1990). Fluoride: Benefits And Risks of Exposure. *CROBM.* **1**: 261-281.
- Kawashima H. (1987). Receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D in a vascular smooth muscle cell line derived from rat aorta. *Biochem Biophys Res Commun.* **146**(1): 1-6.

- Kellogg DE, Rybalkin I, Chen S, Mukhamedova N, Vlasik T, Siebert PD, Chenchik A. (1994). TaqStart Antibody: “hot start” PCR facilitated by neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase. *BioTechniques*. **16**: 1334-1337.
- Kelly RP, Tunin R, Kass DA. (1992). Effect of reduced aortic compliance on cardiac efficiency and contractile function of in situ canine left ventricle. *Circ Res*. **71**: 490–502.
- Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R, Wildberger JE, Mahnken AH, Bohm R, Metzger T, Wanner C, Jahnke-Dechent W, Floege J. (2003). Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet*. **361**: 827–833.
- Ketteler M. (2005). Fetuin-A and extraosseous calcification in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. **14**: 337–342.
- Ketteler, M., Rothe, H., Krüger, T., Biggar, P.H., Schlieper, G. (2011). Mechanisms and treatment of extraosseous calcification in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. **7**: 509-516.
- Kim KM. (1976). Calcification of matrix vesicles in human aortic valve and aortic media. *Fed Proc*. **35**(2): 156-162.
- King KE, Iyemere VP, Weissberg PL, Shanahan CM. (2003). Kruppel-like factor 4 (KLF4/GKLF) is a target of bone morphogenetic proteins and transforming growth factor beta 1 in the regulation of vascular smooth muscle cell phenotype. *J Biol Chem*. **278**: 11661–11669.
- Kocher, O., Gabbiani G. (1986). Expression of actin mRNAs in rat aortic smooth muscle cells during development, experimental intimal thickening, and culture. *Differentiation*. **32**(3): 245-251.
- Kocher, O., Gabbiani G. (1987). Analysis of a smooth-muscle actin mRNA expression in rat aortic smooth-muscle cells using a specific cDNA probe. *Differentiation*. **34**: 201-209.
- Koga T, Matsui Y, Asagiri M, Kodama T, de Crombrughe B, Nakashima K. (2005). NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nat Med*. **11**: 880–885.



Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. (1997). Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*. **89**: 755–764.

Kumagai, Y., and Pi, J. (2004). Molecular basis for arsenic-induced alteration in nitric oxide production and oxidative stress: implication of endothelial dysfunction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **198**: 450–457.

Kumar, MS.; Owens. GK. (2003). Combinatorial Control of Smooth Muscle–Specific Gene Expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**: 737-747.

Kunieda T, Minamino T, Nishi J, Tateno K, Oyama T, Katsuno T, Miyauchi H, Orimo M, Okada S, Takamura M, Nagai T, Kaneko S, Komuro I. (2006). Angiotensin II induces premature senescence of vascular smooth muscle cells and accelerates the development of atherosclerosis via a p21-dependent pathway. *Circulation*. **114**(9): 953-960.

Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y., Erusalimsky, J. D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci.* **113** ( Pt 20): 3613-3622.

Lacey D., Timms E., Tan H., Kelley M., Dunstan C., Burgess T., Elliott R., Colombero A., Elliott G., Scully S., Hsu H., Sullivan J., Hawkins N., Davy E., Capparelli C., Eli A., Qian Y., Kaufman S., Sarosi I., Shalhoub V., Senaldi G., Guo J., Delaney J. and Boyle W. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. **93**: 165-176.

Lähtenvuo, J., and Rosenzweig, A. (2012). Effects of aging on angiogenesis. *Circ. Res.* **110**: 1252-1264.

Lakatta EG, Levy D. (2003). Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. *Circulation*. **107**(1): 139-146.

- Lakatta EG, Levy D. (2003). Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease. *Circulation*. **107**(2): 346-354.
- Lamb, M. J. (1977). *Biology of Ageing*. Halsted (Wiley), Nueva York.
- Le Guilly Y, Simon M, Lenoir P, Bourel M. (1973). Long-term culture of human adult liver cells: morphological changes related to in vitro senescence and effect of donor's age on growth potential. *Gerontology*. **19**(5): 303-313.
- Lee, K.S., Kim, H.J., Li, Q.L., Chi, X.Z., Ueta, C., Komori, T., Wozney, J.M., Kim, E.G., Choi, J.Y., Ryoo, H.M., Bae, S.C. (2000). RUNX-2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between RUNX-2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol. Cell. Biol.* **20**(23): 8783–8792.
- Lee, M. Y., Lee, Y. H., Lim, K. M., Chung, S. M., Bae, O. N., Kim, H., Lee, C.R., Park, J.D., and Chung, J.H. (2005). Inorganic arsenite potentiates vasoconstriction through calcium sensitization in vascular smooth muscle. *Environ. Health. Perspect.* **113**: 1330–1335.
- Lee JS, Basalyga DM, Simionescu A, Isenburg JC, Simionescu DT, Vyavahare NR. (2006). Elastin calcification in the rat subdermal model is accompanied by up-regulation of degradative and osteogenic cellular responses. *Am J Pathol.* **168**: 490–498.
- Levine, R.L. (1983) Oxidative modification of glutamine synthetase I. Interaction is due to loss of one histidine residue. *J. Biol. Chem.* **258**: 11823-11827.
- Li X, Yang HY, Giachelli CM. (2006). Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res.* **98**(7): 905-912.
- Li, J.X., Shen, Y.Q., Cai, B.Z., Zhao, J., Bai, X., Lu, Y.J., and Li, X.Q. (2010). Arsenic trioxide induces the apoptosis in vascular smooth muscle cells via increasing intracellular calcium and ROS formation. *Mol. Biol. Rep.* **37**: 1569-1576.

- Lim, K.M., Shin, Y.S., Kang, S., Noh, J.Y., Kim, K., Chung, S.M., Yun, Y.P., and Chung, J.H. (2011). Potentiation of vasoconstriction and pressor response by low concentration of monomethylarsonous acid (MMA(III)). *Toxicol. Lett.* **205**: 250–256.
- Lomashvili KA, Cobbs S, Hennigar RA, Hardcastle KI, O’Neill WC. (2004). Phosphate-induced vascular calcification: role of pyrophosphate and osteopontin. *J Am Soc Nephrol.* **15**: 1392–1401.
- Lomashvili KA, Khawandi W, O’Neill WC. (2005). Reduced plasma pyrophosphate levels in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* **16**: 2495-2500.
- Lomashvili, KA.; Garg, P.; O’Neill, WC. (2006). Chemical and hormonal determinants of vascular calcification in vitro. *Kidney Int.* **69**: 1464-1470.
- Lomashvili KA, Garg P, Narisawa S, Millan JL, O’Neill WC. (2008). Upregulation of alkaline phosphatase and pyrophosphate hydrolysis: potential mechanism for uremic vascular calcification. *Kidney Int.* **73**(9): 1024-30.
- Lomashvili, KA.; Wang, X.; Wallin, R.; O’Neill, WC. (2011). Matrix Gla Protein Metabolism in Vascular Smooth Muscle and Role in Uremic Vascular Calcification. *The Journal Of Biological Chemistry.* **286**(33): 28715–28722.
- Lorenzo, V. (2011). Nefrología al día: Capítulo 16 - Enfermedad renal crónica (Páginas: 335-337).
- Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G. (1997). Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature.* **386**(6620): 78-81.
- Luoma H, Nuuja T, Collan Y, Nummikoski P. (1976). The effect of magnesium and fluoride on nephrocalcinosis and aortic calcification in rats given high sucrose diets with added phosphates. *Calcif Tissue Res.* **20**(3): 291-302.
- Mackenzie, N.C.W.; MacRae V.E. (2011). The Role of Cellular Senescence During Vascular Calcification: A Key Paradigm in Aging Research. *Curr Aging Sci.* **4**(2): 128-136.

- Majesky, M.W. (2007). Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**: 1248-1258.
- Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stannek P, Walter C, Glinka A, Niehrs C. (2002). Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature.* **417**: 664–667.
- Martin, G. R.; Schiffmann, E.; Bladen, H. A.; Marie Nylen, D.D.S. (1963). Chemical and morphological studies on the in vitro calcification of aorta. *The Journal Of Cell Biology.* **16**(2): 243-52.
- Martin GM, Sprague CA, Epstein CJ. (1970). Replicative life-span of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue and genotype. *Lab Invest.* **23**(1): 86-92.
- Martin GM, Ogburn CE, Sprague CE. (1981). Effects of age on cell division capacity, Le Vieillissement: Un Defi a la Science et a la Politique Sociale. Edited by GM Marvis, D Danon. New York, Elsevier North-Holland (Páginas: 121-131).
- Martin, GM.; Ogburn, CE, Wight, TN. (1983). Comparative Rates of Decline in the Primary Cloning Efficiencies of Smooth Muscle Cells From the Aging Thoracic Aorta of Two Murine Species of Contrasting Maximum Life Span Potentials. Clonal Growth From Aging Aortas. *American Journal Of Pathology.* **110**(2): 236-245.
- Martinez-Hernandez, A.; Huffer, WE. (1974) Pseudoxanthoma elasticum: dermal polyanions and the mineralization of elastic fibers. *Lab Invest.* **31**: 181-186.
- Massague J, Wotton D. (2000). Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* **19**: 1745–1754.
- Mats S.; Johnsson A.; Nancollas GH. (1992). The Role of Brushite and Octacalcium Phosphate in Apatite Formation. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine.* **3**(1 Pt 2): 61-82.
- Matsumura, T. (1980). Multinucleation and polyploidization of aging human cells in culture. *Adv Exp Med Biol.* **129**: 31-38.

- Matthews C, Gorenne I, Scott S, Figg N, Kirkpatrick P, Ritchie A, Goddard M, Bennett M. (2006). Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: effects of telomerase and oxidative stress. *Circ Res.* **99**(2): 156-64.
- Mazurkowitz J., Vaughan D. W. and Franzblau C. (1980). A morphometric study of vascular smooth muscle cells in culture. *In vitro.* **16**(4): 337-45
- Meier, M.; Weng, L.P.; Alexandrakis, E.; Rüschoff, J.; Goeckenjan, G. (2001). Tracheobronchial stenosis in Keutel syndrome. *Eur Respir J.* **17**: 566–569.
- Meyer WW., Stelzig H-H (1967) Verkalkungsformen der inneren elastischen Membran der Beinarterien und ihre Bedeutung für die Mediaverkalkung. *Virchows Arch Pathol Anat.* **342**: 361-373.
- Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK. (1989). Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**(18): 7049-53.
- Minamino T, Kourembanas S. (2001a). Mechanisms of telomerase induction during vascular smooth muscle cell proliferation. *Circ Res.* **89**: 237–43.
- Minamino T, Mitsialis SA, Kourembanas S. (2001b). Hypoxia extends the life span of vascular smooth muscle cells through telomerase activation. *Mol Cell Biol.* **21**: 3336 –3342.
- Minamino T, Komuro I. (2002). Role of telomere in endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* **13**: 537–543.
- Minamino, T., Yoshida, T., Tateno, K., Miyauchi, H., Zou, Y., Toko, H., Komuro, I. (2003). Ras induces vascular smooth muscle cell senescence and inflammation in human atherosclerosis. *Circulation.* **108**(18): 2264–2269.
- Minamino, Miyauchi, Yoshida, Tateno, Kunieda, Komuro. (2004). Vascular cell senescence and vascular aging. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* **36**: 175–183.
- Minamino, Komuro. (2007). Vascular Cell Senescence: Contribution to Atherosclerosis. *Circ. Res.* **100**: 15-26.

- Minamino T, Komuro I. (2008). Vascular aging: insights from studies on cellular senescence, stem cell aging, and progeroid syndromes. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* **5**(10): 637-48
- Moe SM, O'Neill KD, Duan D, Ahmed S, Chen NX, Leapman SB, Fineberg N, Kopecky K. (2002). Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins. *Kidney Int.* **61**: 638–647.
- Moe SM, Duan D, Doehle BP, O'Neill KD, Chen NX. (2003). Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels. *Kidney Int.* **63**:1003–1011.
- Moe SM, Chen NX. (2004). Pathophysiology of vascular calcification in chronic kidney disease. *Circ Res.* **95**: 560–567.
- Moe SM, Chen NX. (2005). Inflammation and vascular calcification. *Blood Purif.* **23**: 64-71.
- Moe S. y Chertow G. (2006). The Case against Calcium-Based Phosphate Binders. *Clin J Am Soc Nephrol.* **1**: 697–703.
- Mori K, Shioi A, Jono S, Nishizawa Y, Morii H. (1998). Expression of matrix Gla protein (MGP) in an in vitro model of vascular calcification. *FEBS Lett.* **433**: 19–22.
- Mosse PRL, Campbell GR, Wang ZL, Campbell JH. (1985). Smooth muscle phenotypic expression in human carotid arteries, I: comparison of cells from diffuse intimal thickenings adjacent to atheromatous plaques with those of the media. *Lab Invest.* **53**: 556 –562.
- Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**(18): 6622-6626.
- Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR. (1997). Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell.* **89**: 773–779.
- Murry CE, Gipaya CT, Bartosek T, Benditt EP, Schwartz SM. (1997). Monoclonality of smooth muscle cells in human atherosclerosis. *Am J Pathol.* **151**: 697–706.

- Murshed, M., Harmey, D., Millan, J.L., McKee, M.D., Karsenty, G. (2005). Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes Dev.* **19**(9): 1093–1104.
- Najjar SS, Scuteri A, Lakatta EG. (2005). Arterial aging: is it an immutable cardiovascular risk factor?. *Hypertension.* **46**(3): 454-462.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* **108**: 17–29.
- Nakano-Kurimoto, Ikeda, Uraoka, Nakagawa, Yutaka, Koide, Takahashi, Matoba, Yamada, Okigaki, Matsubara. (2009). Replicative senescence of vascular smooth muscle cells enhances the calcification through initiating the osteoblastic transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **297**: H1673–H1684.
- National Kidney Foundation. (2002). *KDOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification*. Parte 4.
- Neuville P, Geinoz A, Benzonana G, Redard M, Gabbiani F, Ropraz, Gabbiani G. (1997). Cellular retinol-binding protein-1 is expressed by distinct subsets of rat arterial smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Am J Pathol.* **150**: 509 –521.
- Verberckmoes SC, Persy V, Behets GJ, Neven E, Hufkens A, Zebger-Gong H, Müller D, Haffner D, Querfeld U, Bohic S, De Broe ME, D'Haese PC. (2007). Uremia-related vascular calcification: more than apatite deposition. *Kidney Int.* **71**(4):298-303.
- Neven E, Persy V, Dauwe S, De Schutter T, De Broe ME, D'Haese PC. (2010). Chondrocyte rather than osteoblast conversion of vascular cells underlies medial calcification in uremic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **30**(9): 1741-1750.
- Neven E, De Schutter TM, De Broe ME, D'Haese PC. (2011). Cell biological and physicochemical aspects of arterial calcification. *Kidney Int.* **79**(11): 1166-77.
- Nishio Y, Dong Y, Paris M, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Drissi H. (2006). Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene. *Gene.* **372**: 62–70.

- O'Neill WC. (2007). Vascular calcification: not so crystal clear. *Kidney Int.* **71**: 282–283.
- Oeseburg H., de Boer RA., van Gilst, WH., van der Harst, P. (2010). Telomere biology in healthy aging and disease. *Pflugers Arch.* **459**(2): 259–268.
- Ohtsuka S, Kakihana M, Watanabe H, Sugishita Y. (1994). Chronically decreased aortic distensibility causes deterioration of coronary perfusion during increased left ventricular contraction. *J Am Coll Cardiol.* **24**: 1406–1414.
- Oliver, C.N. (1987) Inactivation of enzymes and oxidative modification of proteins by stimulated neutrophils. *Arch. Biochem. Biophys.* **253**: 62-72.
- Olovnikov AM. (1971). Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. *Dokl Akad Nauk SSSR.* **201**(6): 1496-1499.
- Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. (1997). *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell.* **89**: 765–771.
- Owens, G., Loeb, G., Gordon, D. and Thompson M. M. (1986). Expression of smooth muscle-specific alpha-isoactin in cultured vascular smooth muscle cells: relationship between growth and cytodifferentiation. *J Cell Biol.* **102**(2): 343–352.
- Owens G, Kumar M, Wamhoff B. (2004). Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* **84**: 767– 801.
- Paegle RD (1969) Ultrastructure of calcium deposits in arteriosclerosis human aortas. *J Ultrastruct Res.* **26**: 412-423.
- Pai A, Leaf EM, El-Abbadi M, Giachelli CM. (2011). Elastin degradation and vascular smooth muscle cell phenotype change precede cell loss and arterial medial calcification in a uremic mouse model of chronic kidney disease. *Am J Pathol.* **178**(2): 764-73.
- Palmer CA, Gilbert JA; Academy of Nutrition and Dietetics. (2012). Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: the impact of fluoride on health. *J Acad Nutr Diet.* **112**(9): 1443-1453.



- Papadopouli AE, Klonaris CN, Theocharis SE. (2008). Role of OPG/RANKL/RANK axis on the vasculature. *Histol Histopathol.* **23**(4): 497-506.
- Park IK, Morrison SJ, Clarke MF. (2004). Bmi1, stem cells, and senescence regulation. *J Clin Invest.* **113**(2): 175-179.
- Park, T.-G., Seong, Y.J., Suk, K.H., Ha, J.-H., and Kim, I.K. (2005). Enhanced contractility of vascular smooth muscle after brief exposure to arsenate. *Environ. Health Perspect.* **19**: 305–311.
- Paule WJ., Bernick S., Strates B., Nimni ME. (1992) Calcification of implanted vascular tissues associated with elastin in an experimental animal model. *J Biomed Mater Res.* **26**: 1169-1177.
- Phipps SM, Berletch JB, Andrews LG, Tollefsbol TO. (2007). Aging cell culture: methods and observations. *Methods Mol Biol.* **371**:9-19.
- Price, P.A. (1989). Gla-containing proteins of bone. *Connect. Tissue Res.* **21**: 51–60.
- Price PA, Faus SA, Williamson MK. (1998). Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **18**: 1400–1407.
- Price PA, Faus SA, Williamson MK. (2000). Warfarin-induced artery calcification is accelerated by growth and vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **20**: 317– 327.
- Price PA, Thomas GR, Pardini AW, Figueira WF, Caputo JM, Williamson MK (2002) Discovery of a high molecular weight complex of calcium, phosphate, fetuin, and matrix gamma-carboxyglutamic acid protein in the serum of etidronate-treated rats. *J Biol Chem.* **277**: 3926-3934.
- Price PA, Chan WS, Jolson DM, Williamson MK. (2006). The elastic lamellae of devitalized arteries calcify when incubated in serum. Evidence for a serum calcification factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **26**: 1079-1085.
- Proudfoot D, Skepper JN, Shanahan CM, Weissberg PL. (1998). Calcification of human vascular cells in vitro is correlated with high levels of matrix Gla protein and low levels of osteopontin expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **18**: 379–388.

Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, Weissberg PL. (2000). Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res.* **87**: 1055–1062.

Proudfoot D, Shanahan CM. (2006). Molecular mechanisms mediating vascular calcification: role of matrix Gla protein. *Nephrology (Carlton)*. **11**: 455–461.

Psaltis PJ, Harbuzariu A, Delacroix S, Holroyd EW, Simari RD. (2011). Resident vascular progenitor cells diverse origins, phenotype, and function. *J Cardiovasc Transl Res.* **4**(2):161-176.

Qin X, Corriere MA, Matrisian LM, Guzman RJ. (2006). Matrix metalloproteinase inhibition attenuates aortic calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **26**:1510–1516.

Ragnauth CD, Warren DT, Liu Y, McNair R, Tajsic T, Figg N, Shroff R, Skepper J, Shanahan CM. (2010). Prelamin A acts to accelerate smooth muscle cell senescence and is a novel biomarker of human vascular aging. *Circulation.* **121**(20): 2200-2210.

Rai, P., Onder, T.T., Young, J.J., McFaline, J.L., Pang, B., Dedon, P.C., Weinberg, R.A. (2009). Continuous elimination of oxidized nucleotides is necessary to prevent rapid onset of cellular senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**(1): 169–174.

Rai, T. S.; Adams, P. D. (2012). Lessons from senescence: Chromatin maintenance in non-proliferating cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms.* **1819**: 322-331.

Reaven PD, Sacks J. (2005). Coronary artery and abdominal aortic calcification are associated with cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetologia.* **48**: 379–385.

Reed MJ, Edelberg JM. (2004). Impaired angiogenesis in the aged. *Sci Aging Knowledge Environ.* **2004**(7): pe7.

Reif W., Lange HP (1972). Vergleichende morphologische und chemische. Untersuchungen zur dystrophischen Verkalkung und mineralization der Kaninchenniere beim Infarkt und während der Regeneration der postichämischen Nephrose. *Beitr Path.* **145**: 221-248.

Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, Mc-Nair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, Jahn-

Dechent W, Weissberg PL, Shanahan CM. (2004). Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol.* **15**: 2857–2867.

Reynolds JL, Skepper JN, McNair R, Kasama T, Gupta K, Weissberg PL, Jahnke-Dechent W, Shanahan CM. (2005). Multifunctional roles for serum protein fetuin-a in inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification. *J Am Soc Nephrol.* **16**(10): 2920-2930.

Rifas L, Arackal S, Weitzmann MN. (2003). Inflammatory T cells rapidly induce differentiation of human bone marrow stromal cells into mature osteoblasts. *J Cell Biochem.* **88**: 650–659.

Robbins, E. y Marcus, P. I. (1963). Dynamics of acridine orange-cell interaction. *J Cell Biol.* **18**(2): 237–250.

Robbins, E., Levine, E. M., and Eagle, H. (1970). Morphologic changes accompanying senescence of cultured human diploid cells. *J Exp Med.* **131**(6): 1211-1222.

Robert L, Robert AM, Jacotot B. (1998). Elastin-elastase-atherosclerosis revisited. *Atherosclerosis.* **140**(2): 281-295.

Robles SJ, Adami GR. (1998). Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene.* **16**(9): 1113-1123.

Roca, P.; Oliver, J.; Rodriguez, A. M. (2004) en *Bioquímica: técnicas y métodos*. Editorial Hélice (Madrid).

Roche Applied Science. (2005). Cytotoxicity Detection Kit (LDH). Versión Julio 2005. (Página: 16 – Figura 5).

Rohme, D. (1981). Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and life spans of normal fibroblasts in vitro and erythrocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **78**(8): 5009-5013.

- Romberg RW, Werness PG, Riggs BL, Mann KG. (1986). Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium-binding proteins. *Biochemistry*. **25**(5): 1176–1180.
- Roninson IB. (2002). Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett*. **179**(1): 1-14.
- Ross R., Klebanoff S. J. (1971). The Smooth Muscle Cell: I. In Vivo Synthesis of Connective Tissue Proteins. *J Cell Biol*. **50**(1): 159–171.
- Ross, R., Wight, T.N., Strandness, E., Thiele, B. (1984). Human atherosclerosis I. Cell constitution and characteristics of advanced lesions of the superficial femoral artery. *Am. J. Pathol*. **114**: 79–93.
- Roy ME, Nishimoto SK. (2002). Matrix Gla protein binding to hydroxyapatite is dependent on the ionic environment: calcium enhances binding affinity but phosphate and magnesium decrease affinity. *Bone*. **31**(2): 296-302.
- Rubin H. (2002). The disparity between human cell senescence in vitro and lifelong replication in vivo. *Nat Biotechnol*. **20**(7): 675-681.
- Rutsch F, Vaingankar S, Johnson K, Goldfine I, Maddux B, Schauerte P, Kalhoff H, Sano K, Boisvert WA, Superti-Furga A, Terkeltaub R. (2001). PC-1 nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in idiopathic infantile arterial calcification. *Am J Pathol*. **158**(2): 543-554.
- Sato I, Morita I, Kaji K, Ikeda M, Nagao M, Murota S. (1993). Reduction of nitric oxide producing activity associated with in vitro aging in cultured human umbilical vein endothelial cell. *Biochem Biophys Res Commun*. **195**: 1070–1076.
- Schneider, E. L., Chase G. A. (1976). Relationship between age of donor and in vitro life span of human diploid fibroblasts. *Interdiscip. Top. Gerontol*. **10**: 62-69.
- Schneider E. L., Mitsui Y. (1976). The relationship between in vitro cellular aging and in vivo human age. *Proc Natl Acad Sci U. S. A*. **73**: 3584-3588.

Schotta G. Pathways that form pericentric heterochromatin. (2012) Medical Faculty, Adolf Butenandt Institut.

<http://www.molekularbiologie.abi.med.uni-muenchen.de/contact/index.html>.

Schrier, R. W. y Gottschalk, C. W. Diseases of the kidney. Sexta edición (1997). Tomo I, II y III. Little, Brown and Company, Boston.

Schulz L, Tyler J. (2005). Heterochromatin focuses on senescence. *Mol Cell*. **17**(2): 168-170.

Schwartz SM, Campbell GR, Campbell JH. (1986). Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ Res*. **58**: 427– 444.

Schwartz SM, DeBlois D, O'Brien ERM. (1995). The intima: soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res*. **77**: 445–465.

Seifert G (1970) Morphologic and biochemical aspects of experimental extraosseous tissue calcification. *Clin Ortho Relat Res*. **69**: 146-158.

Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. **88**(5): 593-602.

Serrano M, Blasco MA. (2001). Putting the stress on senescence. *Curr Opin Cell Biol*. **13**: 748–753.

Shanahan, Weissberg, Metcalfe. (1993). Isolation of gene markers of differentiated and proliferating vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*. **73**: 193-204.

Shanahan CM, Cary NR, Metcalfe JC, Weissberg PL. (1994). High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. **93**: 2393–2402.

Shanahan, Weissberg. (1998). Smooth muscle cell heterogeneity: patterns of gene Expression in Vascular Smooth Muscle Cells in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **18**: 333-338.

- Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME. (1999). Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation*. **100**: 2168-2176.
- Shanahan CM, Weissberg PL. (1999). Smooth muscle cell phenotypes in atherosclerotic lesions. *Curr Opin Lipidol*. **10**: 507–513.
- Shanahan CM, Proudfoot D, Tyson KL, Cary NR, Edmonds M, Weissberg PL. (2000). Expression of mineralisation-regulating proteins in association with human vascular calcification. *Z Kardiol*. **89**: 63–68.
- Shao JS, Cheng SL, Pingsterhaus JM, Charlton-Kachigian N, Loewy AP and Towler DA. (2005). Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *J Clin Invest*. **115**: 1210-1220.
- Shioi A, Nishizawa Y, Jono S, Koyama H, Hosoi M, Morii H. (1995). Glycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **15**: 2003–2009.
- Shioi A., Mori K., Jono S., Wakikawa T., Hiura Y., Koyama H., Okuno Y., Nishizawa Y., Morii, H. (2000) Mechanism of atherosclerotic calcification. *Z Kardiol*. **89**: 75-79.
- Shobeiri, N., Adams, M.A. and Holden, R.M. (2010). Vascular calcification in animal models of CKD: A review. *Am. J. Nephrol*. **31**: 471-481.
- Simeonova, P.P., and Luster, M.I. (2004). Arsenic and atherosclerosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. **198**: 444-449.
- Singh KA, Spencer AJ. (2004). Relative effects of pre- and post-eruption water fluoride on caries experience by surface type of permanent first molars. *Community Dent Oral Epidemiol*. **32**(6): 435-446.
- Slatopolsky E, Weerts C, Lopez-Hilker S, Norwood K, Zink M, Windus D, Delmez J. (1986). Calcium carbonate as a phosphate binder in patients with chronic renal failure undergoing dialysis. *The New England Journal of Medicine*. **315**(3): 157-161.

- Smith, P.K., y cols. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85.
- Smith, AH.; Lingas, EO.; Rahman, M. (2000). Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. *Bulletin of the World Health Organization*, **78** (9): 1093-103.
- Sobue, K.; Hayashi, K.; Nishida, W. (1999). Expressional regulation of smooth muscle cell-specific genes in association with phenotypic modulation. *Molecular and Cellular Biochemistry.* **190**: 105-118.
- Speer MY, McKee MD, Guldberg RE, Liaw L, Yang HY, Tung E, Karsenty G, Giachelli CM. (2002). Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *J Exp Med.* **196**: 1047-1055.
- Spronk H. M., Soute B. A., Schurgers L. J., Cleutjens J. P., Thijssen H. H., De Mey J. G., Vermeer C. (2001). Matrix Gla protein accumulates at the border of regions of calcification and normal tissue in the media of the arterial vessel wall. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**: 485-490.
- Stanley, J. F., Pye, D., and MacGregor, A. (1975). Comparison of doubling numbers attained by cultured animal cells with life span of species. *Nature.* **255**(5504): 158-159.
- Stanulis-Praeger, B.M. (1987): Cellular senescence revisited: a review. *Mech. Ageing Dev*, **38**: 1-48.
- States, J.C., Srivastava, S., Chen, Y., and Barchowsky, A. (2009). Arsenic and cardiovascular disease. *Toxicol. Sci.* **107**: 312-323.
- Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebersold R, Schinke T, Karsenty G, Giachelli CM. (2001). Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res.* **89**(12): 1147-1154.

- Steitz SA, Speer MY, McKee MD, Liaw L, Almeida M, Yang H, Giachelli CM. (2002). Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol.* **161**: 2035–2046.
- Strehler, B. (1982). *Time, Cells and Aging*. Academic Press, Nueva York.
- Tanhauser, S. M., and Laipis, P. J. (1995). Multiple deletions are detectable in mitochondrial DNA of aging mice. *J Biol Chem.* **270**(42): 24769-24775.
- Tanimura A., McGregor DH., Anderson HC (1986) Calcification in atherosclerosis. I. Human studies. *J Exp Pathol.* **2**: 261-273.
- Takubo K, Izumiyama-Shimomura N, Honma N, Sawabe M, Arai T, Kato M, Oshimura M, Nakamura K. (2002). Telomere lengths are characteristic in each human individual. *Exp Gerontol.* **37**(4): 523-531.
- ten Dijke P, Fu J, Schaap P, Roelen BA. (2003). Signal transduction of bone morphogenetic proteins in osteoblast differentiation. *J Bone Joint Surg Am.* **85A**(supl 3):34–38.
- Tarry-Adkins JL, Martin-Gronert MS, Chen JH, Cripps RL, Ozanne SE. (2008). Maternal diet influences DNA damage, aortic telomere length, oxidative stress, and antioxidant defense capacity in rats. *FASEB J.* **22**(6): 2037-2044.
- Terkeltaub R.A. (2001). Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **281**: C1–C11.
- Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. (1981). Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell.* **26**(1 Pt 1): 99-105.
- Tintut Y, Parhami F, Bostrom K, Jackson SM, Demer LL. (1998). cAMP stimulates osteoblast-like differentiation of calcifying vascular cells: potential signaling pathway for vascular calcification. *J Biol Chem.* **273**: 7547–7553.
- Tintut, Y.; Patel, J.; Parhami, F.; Demer, LL. (2000). Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Promotes In Vitro Calcification of Vascular Cells via the cAMP Pathway. *Circulation.* **102**: 2636-2642.



- Tintut Y, Alfonso Z, Saini T, Radcliff K, Watson K, Boström K, Demer LL. (2003). Multilineage potential of cells from the artery wall. *Circulation*. **108**: 2505–2510.
- Todaró, G.J., H. Green. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell. Biol.* **17**: 299-313.
- Tomazic BB (2001) Physiochemical principles of cardiovascular calcification. *Z Kardiol* **90**: 68-80.
- Topouzis S, Majesky MW. (1996). Smooth muscle lineage diversity in the chick embryo: two types of aortic smooth muscle cell differ in growth and receptor-mediated transcriptional responses to transforming growth factor- $\beta$ . *Dev Biol.* **178**: 430–445.
- Toussaint, O., Dumont, P., Dierick, J. F., Pascal, T., Fripiat, C., Chainiaux, F., Sluse, F., Eliaers, F., and Remacle, J. (2000). Stress-induced premature senescence. Essence of life, evolution, stress, and aging. *Ann N Y Acad Sci.* **908**: 85-98.
- Toussaint, O., Medrano, E.E., von Zglinicki, T., (2000). Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp. Gerontol.* **35**: 927–945.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **76**(9): 4350–4343.
- Towler, D.A., Bidder, M., Latifi, T., Coleman, T., and Semenkovich, C.F. (1998). Diet-induced diabetes activates an osteogenic gene regulatory program in the aortas of low density lipoprotein receptor-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **273**: 30427–30434.
- Trelstad RL. (1974). Human aorta collagens: evidence for three distinct species. *Biochem Biophys Res Commun.* **57**(3): 717–725.
- Trion, A., van der Laarse, A. (2004). Vascular smooth muscle cells and calcification in atherosclerosis. *Am Heart J.* **147**: 808-814.

- Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM. (2003). Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **23**: 489–94.
- Uchida, K., Kawakishi, S. (1990). Site-specific oxidation of angiotensin I by copper(II) and L-ascorbate: conversión of histidine residues to 2- imidazolones. *Arch. Biochem. Biophys.* **283**: 20-26.
- Verberckmoes SC, Persy V, Behets GJ, Neven E, Hufkens A, Zebger-Gong H, Müller D, Haffner D, Querfeld U, Bohic S, De Broe ME, D’Haese PC. (2007). Uremia-related vascular calcification: more than apatite deposition. *Kidney Int.* **71**: 298–303.
- Villa-Bellosta R, Bogaert YE, Levi M, Sorribas V. (2007). Characterization of phosphate transport in rat vascular smooth muscle cells: implications for vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **27**(5): 1030-1036.
- Villa-Bellosta R, Sorribas V. (2009). Phosphonoformic acid prevents vascular smooth muscle cell calcification by inhibiting calcium-phosphate deposition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **29**(5): 761-766.
- Villa-Bellosta R, Millan A, Sorribas V. (2011a). Role of calcium-phosphate deposition in vascular smooth muscle cell calcification. *Am J Physiol Cell Physiol.* **300**(1): C210-220.
- Villa-Bellosta R, Sorribas V. (2011b). Calcium phosphate deposition with normal phosphate concentration. -Role of pyrophosphate-. *Circ J.* **75**(11): 2705-2710.
- von Kossa J (1901) Ueber die im Organismus kunstlich erzeugbaren Verkalkungen. *Beit Path Anat.* **29**:163-202.
- Wagner W, Bork S, Horn P, Krunic D, Walenda T, Diehlmann A, Benes V, Blake J, Huber FX, Eckstein V, Boukamp P, Ho AD. (2009). Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PLoS One.* **4**(6):e5846.
- Wallin R, Cain D, Hutson SM, Sane DC, Loeser R. (2000). Modulation of the binding of matrix Gla protein (MGP) to bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). *Thromb Haemost.* **84**: 1039–1044.

Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, LaPan P, Luxenberg DP, McQuaid D, Moutsatsos IK, Nove J, Wozney JM. (1990). Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**: 2220–2224.

Waring M. J. (1965). Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *Journal of Molecular Biology.* **13**(1): 269–282

Warshaw DM, Szarek JL, Hubbard MS, Evans JN. (1986). Pharmacology and force development of single freshly isolated bovine carotid artery smooth muscle cells. *Circ Res.* **58**(3): 399-406.

Watanabe H, Ohtsuka S, Kakihana M, Sugishita Y. (1992). Decreased aortic compliance aggravates subendocardial ischaemia in dogs with stenosed coronary artery. *Cardiovasc Res.* **26**: 1212–1218.

Weismann, A. (1891) *Essays Upon Heredity and Kindred Biological Problems*, 2nd Ed., Clarendon Press, Oxford.

Weissberg PL, Clesham GJ, Bennett MR. (1996). Is vascular smooth muscle cell proliferation beneficial? *Lancet.* **347**: 305–307.

Weizman, S.A. and Gordon, L.L. (1990) Inflammation and cancer: Role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood.* **76**: 655-663.

Wheeler, R. (2007). DAPI, from Protein Data Bank.

WHO. (2008). World Health Organization. Guidelines for Drinking-water Quality. Third edition incorporating the first and second Addenda. Volume 1. Recommendations. (Páginas 375-377).

Wight TN, Ross R. (1975). Proteoglycans in primate arteries. I. Ultrastructural localization and distribution in the intima. *J Cell Biol.* **67**: 660-675.

Wissler, R. W. (1968). The arterial medial cell, smooth muscle or multifunctional mesenchyme. *J. Atheroscler. Res.* **8**: 201-213.

- Wopenka, B.; Pasteris, JD. (2005). A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Materials Science and Engineering. C* **25**: 131–143
- Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet.* **18**(2): 173-179.
- Xiao G, Gopalakrishnan R, Jiang D, Reith E, Benson MD, Franceschi RT. (2002). Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogenactivated protein kinase signaling pathways are required for osteoblastspecific gene expression and differentiation in MC3T3–E1 cells. *J Bone Miner Res.* **17**: 101–110.
- Xiao G, Jiang D, Ge C, Zhao Z, Lai Y, Boules H, Phimphilai M, Yang X, Karsenty G, Franceschi RT. (2005). Cooperative interactions between activating transcription factor 4 and Runx2/Cbfa1 stimulate osteoblastspecific osteocalcin gene expression. *J Biol Chem.* **280**: 30689–30696.
- Yang J, Chang E, Cherry AM, Bangs CD, Oei Y, Bodnar A, Bronstein A, Chiu CP, Herron GS. (1999). Human endothelial cell life extension by telomerase expression. *J Biol Chem.* **274**(37): 26141-26148.
- Yang H, Curinga G, Giachelli CM. (2004). Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro. *Kidney Int.* **66**: 2293–2299.
- Yang D, McCrann DJ, Nguyen H, St Hilaire C, DePinho RA, Jones MR, Ravid K. (2007). Increased polyploidy in aortic vascular smooth muscle cells during aging is marked by cellular senescence. *Aging Cell.* **6**: 257-260.
- Yen, Y.P., Tsai, K.S., Chen, Y.W., Huang, C.F., Yang, R.S., and Liu, S.H. (2012). Arsenic induces apoptosis in myoblasts through a reactive oxygen species-induced endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction pathway. *Arch. Toxicol.* **86**: 923-933.
- Yoshida T.; Owens GK. (2005). Molecular Determinants of Vascular Smooth Muscle Cell Diversity. *Circ. Res.* **96**: 280-291.
- Zebboudj AF, Shin V, Boström K. (2003). Matrix GLA protein and BMP-2 regulate osteoinduction in calcifying vascular cells. *Journal of Cellular Biochemistry.* **90**: 756-765.

Ziegler EE, Filer LJ (eds.). (1996). Present Knowledge in Nutrition. Washington, DC: ILSI, (Páginas: 1–684).

Zipkin I, Zucas SM, Lavender DR, Fullmer HM, Schiffmann E, Corcoran BA. (1970). Fluoride and calcification of rat aorta. *Calcif Tissue Res.* **6**(3): 173-82.

Zhu J, Wang H, Bishop JM, Blackburn EH. (1999). Telomerase extends the lifespan of virus-transformed human cells without net telomere lengthening. *PNAS U S A.* **96**(7): 3723-3728.



