



Universitat de Lleida

# La ausencia de VDR en CMLV previene la calcificación vascular en ERC: potencial rol del miR-145a

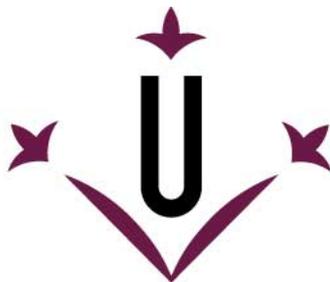
Maite Caus Enríquez

<http://hdl.handle.net/10803/671528>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**Universitat de Lleida**

## **TESI DOCTORAL**

# **La ausencia de VDR en CMLV previene la calcificación vascular en ERC: potencial rol del miR-145a**

**Maite Caus Enríquez**

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la Universitat  
de Lleida  
Programa de Doctorat en Salut

Director/a  
José Manuel Valdivielso Revilla  
Milica Božić Stanojević

Tutor/a  
José Manuel Valdivielso Revilla

2021



*Al men tiet Jose,  
padrins i idios*





"Potser, finalment, són les ombres  
l'únic que ens lliga de peus a terra."

Josep M Ciskrella



Resúmenes



La calcificación vascular (CV) es una complicación muy prevalente en la enfermedad renal crónica (ERC) y se asocia con la alta morbilidad y mortalidad en estos pacientes. El receptor de la vitamina D (VDR) se ha considerado que tiene un rol importante en la diferenciación osteoblástica de las células de musculo liso vascular (CMLV), aunque el mecanismo preciso aún no es claro.

La capacidad de VDR para influenciar la expresión de varios microRNAs (miRNAs), así como la gran cantidad de miRNAs presentes en CMLV, nos hizo prestar atención a estas pequeñas moléculas como posibles reguladoras del cambio fenotípico de las CMLV.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la deficiencia de VDR en la calcificación vascular en ERC y la posible implicación del miR-145a en este proceso.

Confirmamos un incremento de tinción inmunohistoquímica de VDR juntamente con unos niveles más altos de calcio en arterias epigástricas de pacientes con ERC comparado con arterias de donantes sanos. Así como también, ratones con nefrectomía 5/6 mostraban altos niveles de calcio arterial y tinción inmunohistoquímica de VDR comparado con los ratones controles.

Los ratones *knockout* condicionales para VDR en CMLV (Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup>) sujetos a una nefrectomía y tratados con dieta alta en fosforo y calcitriol, mostraron niveles significativamente disminuidos de contenido de calcio, de expresión de osteopontina y lamin A, así como unos niveles más altos de expresión de SOST en arteria comparado con los ratones Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> con el mismo tratamiento. Además, los ratones Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> con ERC y CV, mostraron una disminución significativa del miR-145a comparado con los ratones con Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup>. *In vitro*, las CMLV VDRwt con medios calcificantes mostraron niveles más altos de calcio que las CMLV VDRko, junto con un incremento de OPN. Los niveles del miR-145a disminuían en CMLV con condiciones calcificantes, tanto en VDRwt como en VDRko, contrariamente a los resultados *in vivo*. Mediante la transfección del miR-145a detectamos un ligero descenso del calcio y la expresión de OPN en condiciones calcificantes. Concluimos que la eliminación de VDR de las CMLV previene la calcificación vascular en ERC y que los mecanismos que regulan esta CV pueden involucrar al miR-145a.



La calcificació vascular (CV) es una complicació molt prevalent en la malaltia renal crònica (MRC) i s'associa amb una alta mobilitat i mortalitat en pacients amb MRC. El receptor de la vitamina D (VDR) s'ha considerat que té un rol important en la diferenciació osteoblàstica de les cèl·lules de múscul llis vascular (CMLV), tot i que el mecanisme concret encara no està clar. A més a més, la capacitat de VDR per influir en l'expressió de varis microRNAs (miRNAs), així com la gran quantitat de miRNAs presents en les CMLV, ens fa enfocar-nos en aquestes petites molècules com importants reguladores de la diferenciació i modulació fenotípica de les CMLV.

L'objectiu d'aquest estudi va ser avaluar l'efecte de la deficiència de VDR en la calcificació vascular en MRC i la possible implicació del miR-145a en aquest procés.

Vam confirmar un increment de tinció immunohistoquímica de VDR juntament amb un nivells augmentats de calci en arteries epigàstriques de pacients amb MRC comparat amb arteries de donants sans. Els ratolins amb nefrectomia 5/6 també mostraven alts nivells de calci arterial i de tinció immunohistoquímica de VDR comparat amb els ratolins controls.

Els ratolins *knockout* condicionals per VDR en CMLV (Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup>) sotmesos a una nefrectomia i tractats amb dieta alta en fòsfor i calcitriol van mostrar nivells significativament més baixos de contingut de calci, expressió d'osteopontina i lamin A, així com uns nivells més alts d'expressió de SOST comparat amb ratolins Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> amb el mateix tractament. A més a més, els ratolins Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> amb ERC i CV mostraven significativament nivells més baixos d'expressió arterial del miR-145a comparat amb els ratolins amb una eliminació específica de VDR en CMLV. *In vitro*, les CMLV VDR<sup>wt</sup> tractades amb medis calcificants mostraven nivells més alts de calci que les CMLV VDR<sup>ko</sup>, juntament amb un increment de OPN a nivell de mRNA i proteïna. Els nivells del miR-145a disminuïen en CMLV amb condicions calcificants, tant en VDR<sup>wt</sup> com en VDR<sup>ko</sup>, contràriament als resultats *in vivo*. Mitjançant la transfecció del miR-145a vam detectar un lleuger descens de la calcificació i de l'expressió de OPN en condicions calcificants.

Concloem que l'eliminació del VDR de les CMLV protegeix enfront la calcificació vascular en MRC i que els mecanismes que regulen aquesta CV poden involucrar al miR-145a.



Vascular calcification (VC) is a highly prevalent complication of chronic kidney disease (CKD) and, when present, is associated with the higher morbidity and mortality in CKD patients. Vitamin D receptor (VDR) has been proposed to have an important role in the osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells (VSMCs); nevertheless the precise mechanism is unclear. The potential of VDR to influence widespread microRNAs (miRNAs) expression, as well as a myriad of miRNAs present in VSMCs drew attention to these small molecules as important regulators of VSMCs differentiation and phenotypic modulation. The aim of this study was to evaluate the effect of VDR deficiency on vascular calcification in CKD and the possible involvement of miR-145a in this process.

We confirmed an increase of VDR immunostaining together with higher calcium in epigastric arteries from CKD patients compared with arteries from control non-CKD donors. We next analysed arteries from mice subjected to 5/6 nephrectomy. CKD affected mice showed higher levels of calcium content and VDR immunostaining in their arteries compared with control mice.

VSMC-VDR conditional knockout mice (Cre<sup>+</sup> VDR<sup>lox/lox</sup>) subjected to a subtotal nephrectomy and treated with high phosphate diet plus calcitriol showed significantly lower levels of vascular calcium content, osteopontin and lamin A expression, as well as markedly higher levels of SOST expression compared with their counterparts (Cre<sup>+</sup>VDR<sup>wt/wt</sup>) on the same treatment. Cre<sup>+</sup>VDR<sup>wt/wt</sup> mice affected by CKD and presenting VC showed significantly lower levels of expression of arterial miR-145a compared with mice with targeted deletion of VDR in VSMCs. *In vitro*, VDR<sup>wt</sup> VSMCs treated with calcification medium demonstrated higher levels of calcification than VDR<sup>ko</sup> VSMCs, alongside an increased OPN. Levels of miR-145a decreased in VSMC with calcification conditions, both in VDR<sup>wt</sup>, which developed calcification, and in VDR<sup>ko</sup> in which we didn't detect calcium previously, contrarily to *in vivo* results. Through miR-145a transfection we detect a slight decrease in calcium and OPN expression in calcification conditions

We conclude that VSMC's VDR elimination prevents vascular calcification in CKD and that the mechanisms regulating VC might involve miR-145a, which warrant further investigations in this direction.



Índice de

contenidos



## 1.INTRODUCCIÓN

<b>1.1</b>	<b><i>Enfermedad Renal Crónica</i></b>	<b>3</b>
1.1.1	Etapas de la enfermedad renal crónica	4
1.1.2	Epidemiología	7
1.1.3	Factores de riesgo en la ERC	10
1.1.4	Complicaciones de la ERC	11
1.1.5	Homeostasis del metabolismo mineral	12
1.1.6	Metabolismo mineral en la ERC	14
<b>1.2</b>	<b><i>Calcificación vascular</i></b>	<b>16</b>
1.2.1	Estructura vascular	16
1.2.2	Tipos de calcificación vascular	17
1.2.2.1	Calcificación de la capa media: esclerosis de Mönckeberg	18
1.2.3	Activadores de la calcificación	20
1.2.4	Inhibidores de la calcificación	23
<b>1.3</b>	<b><i>Vitamina D</i></b>	<b>25</b>
1.3.1	Síntesis de la vitamina D	25
1.3.2	Receptor de la vitamina D (VDR)	27
1.3.3	Acciones de la vitamina D	29
1.3.3.1	Acciones clásicas	29
1.3.3.2	Acciones no clásicas	30
1.3.3.2.1	Vitamina D y calcificación vascular	31
<b>1.4</b>	<b><i>MicroRNAs</i></b>	<b>35</b>
1.4.1	Síntesis y procesamiento	35
1.4.2	miRNAs y calcificación vascular	37
1.4.3	miRNAs regulados por VDR	39

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

<b>3.1</b>	<b><i>Estudio In Vivo</i></b>	<b>49</b>
3.1.1	Muestras de arterias epigástricas humanas	49
3.1.2	Mantenimiento y cría de los ratones	50
3.1.3	Generación del modelo murino KO condicional de VDR en CMLV	50
3.1.4	Generación del raton reportero Myh11-CreER <sup>T2</sup> mT/mG	52
3.1.5	Genotipado de ratones	53
3.1.6	Administración de <i>Tamoxifen</i>	56
3.1.7	Modelo de enfermedad renal crónica y calcificación vascular en ratones	57
3.1.8	Recogida de órganos, sangre y orina	58
3.1.9	Extracción de DNA de la arteria y verificación del genotipo	58
3.1.10	Análisis bioquímicos: BUN, calcio y fósforo en suero y orina	59
3.1.11	Histología e inmunohistoquímica	59
3.1.12	Cuantificación de calcio arterial	60
3.1.12.1	Cuantificación del calcio por el método o-cresolfatleína	60
3.1.12.2	Detección de calcificación en secciones de parafina de tejido	61
3.1.13	Análisis de expresión génica de miRNAs y mRNAs	61
3.1.13.1	Extracción de RNA total en tejido	61
3.1.13.2	Síntesis de cDNA (RT-PCRE)	62
3.1.13.3	PCR a tiempo real (qPCR)	63
3.1.13.4	Predicción de genes diana para miRNAs	65

3.1.14	Análisis de proteínas	65
3.1.14.1	Soluciones	65
3.1.14.2	Extracción de proteínas	65
3.1.14.3	Western Blot	66
<b>3.2</b>	<b>Estudio In Vitro</b>	<b>68</b>
3.2.1	Cultivo de CMLV de ratón	68
3.2.2	Mantenimiento del cultivo primario de CMLV	68
3.2.3	Congelación, almacenaje y descongelación de CMLV	69
3.2.4	Inmunohistoquímica de fluorescencia para $\alpha$ -actina de musculo liso	69
3.2.5	Experimentos de calcificación en CMLV	70
3.2.6	Determinación del contenido de calcio	70
3.2.7	Extracción de RNA de CMLV y síntesis de cDNA	70
3.2.8	Análisis de proteínas	71
3.2.9	Transfección de mímics de miRNAs en CMLV	71
3.2.10	Predicción de dianas de miRNAs Transfección de mímics de miRNA	72
<b>3.3</b>	<b>Análisis estadístico</b>	<b>73</b>
<b>4. RESULTADOS</b>		
<b>4.1</b>	<b>Evaluación de la expresión de VDR en arterias calcificadas</b>	<b>77</b>
4.1.1	La expresión de VDR aumenta en arterias calcificadas de humanos afectados por ERC	77
4.1.2	La expresión de VDR aumenta en las arterias calcificadas de ratones con ERC	78
<b>4.2</b>	<b>Generación del ratón KO condicional para VDR en CMLV y papel de VDR en el desarrollo de CV en ERC in vivo</b>	<b>79</b>
4.2.1	Delección específica de VDR en las CMLV de los ratones KO condicionales	79
4.2.2	Generación del modelo de enfermedad renal crónica	81
4.2.3	La ausencia de VDR de CMLV previene la calcificación vascular en enfermedad renal crónica	85
4.2.4	Efecto de la ausencia de VDR en CMLV en la expresión de marcadores osteogénicos	87
4.2.5	Efecto de la ausencia de VDR en CMLV en la inflamación arterial en enfermedad renal crónica	91
<b>4.3</b>	<b>Análisis del efecto de la ausencia de VDR en CMLV en calcificación vascular In vitro</b>	<b>93</b>
4.3.1	Estudio de calcificación en CMLV VDRwt y VDRko	93
4.3.2	Análisis de genes osteogénicos en experimentos de calcificación In vitro	95
<b>4.4</b>	<b>Implicación de ciertos microRNAs en la CV mediada por VDR in vivo e in vitro</b>	<b>97</b>
4.4.1	Estudio de microRNAs in vivo	97
4.4.2	Estudio de microRNAs in vitro	99
4.4.2.1	Análisis de la calcificación in vitro tras la recuperación de los niveles de miR-145a mediante transfección	100
<b>5. DISCUSIÓN</b>		
<b>6. CONCLUSIONES</b>		

# Abreviaturas



## A

**ACR:** Ratio albúmina-creatinina

**ADN:** Ácido desoxidoribonucleico

**AGO:** Proteína Argonauta

**AINES:** Antiinflamatorios no esteroideos

**ALP:** Fosfatasa alcalina

**ANCA:** Anticuerpo citoplásmico anti-neutrófilos

## C

**Ca:** Calcio

**CaBP:** Proteína de unión a calcio citosólico

**Cbfa1:** (o Runx) Core binding factor alpha 1

**CKD-MBD:** Chronic kidney disease-mineral bone disease

**CMLV:** Células de músculo liso vascular

**CPP:** Partículas primarias calciproteicas

**Cyp24:** 24-hidroxilasa

**Cyp27b1:** 1 $\alpha$ -hidroxilasa

**CV:** Calcificación vascular

**CKD:** chronic kidney disease (= ERC)

## E

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**ERC:** Enfermedad renal crónica

## B

**BMPs:** Proteína morfogenética ósea

**BUN:** Nitrógeno ureico en sangre

## D

**DAB:** 3,3'-diaminobenzidine

**DBD:** Dominio de unión a DNA

**DBP:** Proteína de unión a vitamina D

**DEP:** Pirocarbonato de dietilo

**DNA:** (o ADN) Ácido desoxirribonucleico

## F

**FBS:** Suero bovino fetal

**FGF23:** Factor de crecimiento fibroblástico 23

## G

**GPT:** Glándula paratiroidea

## I

**IFG:** Índice de filtrado glomerular  
(=TFG,IFR,GFR)

**IL-6:**

**IL-1b:**

## L

**LBD:** Dominio de unión a ligando

## N

**NCXI:** Intercambiador  $Na^+/Ca^+$

**Nx:** Nefrectomia

## P

**P:** Fósforo

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PFA:** Paraformaldehido

**Pit-1:** Cotransportador de fosfato dependiente de sodio

**PMCA1:** ATPasa de calcio

**Pmp:** Pacientes por millón de población

**PRKRA:** Protein kinase interferón-inducible double stranded RNA dependent activator

## H

**HCl:** Acido clorhídrico

**HTA:** Hipertensión arterial

**HPT2:** Hiperparatiroidismo secundario

**HVI:** Hipertrofia ventricular izquierda

## K

**KDIGO:** Kidney Disease Improving Global Outcomes

**KO:** Knock out

## M

**MC:** Medio calcificante

**MGP:** Proteína de matriz gla

**MN:** Medio normal

## O

**OCN:** Osteocalcina

**OPG:** Osteoprotegerina

**OPN:** Osteopontin

**Osx:** osterix

## R

**RANK:** receptor activador del factor nuclear  $\kappa$  B

**RANKL:** Ligando de Rank

**RISC:** RNA-induced silencing complex

**RNA:** (o ARN) Ácido ribonucleico

**RT:** Transcripción reversa

**Runx2 (o Cbfa1):** Runt-related transcription factor 2

**RXR:** Receptor del acido retinoico

**PTH:** Hormona paratiroidea

## S

**SDS:** Dodecilsulfato sódico

**SEM (o EEM):** Error estándar de la media

**SOST:** Esclerostina

## V

**VDR:** Receptor de la Vitamina D

**VDREs:** Elementos de respuesta a vitamina D

## T

**TBP:** Proteína Tata Box

**TEA:** Tasa Excreción Albúmina

**TNF:** Factor de necrosis tumoral

**TRBP:** TAR RNA-binding protein

**TRS:** Tratamiento renal substitutivo

**TRPV:** Transcient receptor potential catión channel

## 1

**1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>:** (o también 1,25D) 1,25-dihidroxicolecalciferol

**25(OH)D<sub>3</sub>:** 25-hidroxitaminaD<sub>3</sub> o calcidiol.



1

# Introducción



---

## 1.1 Enfermedad Renal Crónica

---

La **enfermedad renal crónica** (ERC) es un término general para definir un conjunto de enfermedades que presentan anomalías en la estructura o funciones de los riñones, presentes por más de tres meses, con implicaciones en la salud. Las guías KDIGO 2012 (*Kidney Disease Improving Global Outcomes*), han sido un paso importante para reconocer la importancia de la ERC ya que la definen, evalúan y clasifican. A continuación (*Tabla 1*) se muestran los criterios, cuya presencia de uno o más (independientemente del diagnóstico clínico) definen la presencia de ERC<sup>1</sup>.

### Los criterios de ERC

(alguno de los siguientes durante más de 3 meses)

<b>Marcadores de daño renal (uno o más):</b>	Albuminuria ( $TEA \geq 30 \text{mg}/24 \text{ horas}$ ; $TEA \geq 30 \text{mg}/\text{g creatinina}$ [ $\geq 3 \text{mg}/\text{mmol}$ ] creatinina)  Anomalías en sedimentos urinarios  Anomalías de electrolitos u otros debido a desordenes tubulares  Anomalías detectadas por histología  Anomalías estructurales detectadas por imagen  Historia de trasplante renal
<b>IFG disminuido</b>	IFG < $60 \text{ml}/\text{min}/1.73 \text{m}^2$

---

**Tabla 1: Criterios de ERC.** Abreviaturas: TEA, tasa excreción albúmina; IFG (también TFG, GFR, IFR), índice de filtrado glomerular Adaptado de KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease<sup>1</sup>.

### 1.1.1 Etapas de la enfermedad renal crónica

Recientemente, se ha establecido una nueva clasificación para pronosticar la ERC en base a la causa, estadio del índice de filtración glomerular (IFG) y estadio de albuminuria. Por esto es necesario:

a) Asignar la causa de ERC basada en la presencia o ausencia de enfermedad sistémica y la localización de hallazgos anatomopatológicos en el riñón.

	<b>Ejemplos de enfermedades sistémicas que afectan el riñón</b>	<b>Ejemplos de enfermedades primarias del riñón</b>
<b>Enfermedades glomerulares</b>	Diabetes, enfermedades autoinmunes sistémicas, infecciones sistémicas, drogas, neoplasia.	Glomerulonefritis, glomeruloesclerosis, nefropatía membranosa.
<b>Enfermedades tubulointersticiales</b>	Infecciones sistémicas, enfermedades autoinmunes, drogas, toxinas ambientales, neoplasias, sarcoidosis.	Infecciones del tracto urinario, piedras, obstrucción.
<b>Enfermedades vasculares</b>	Aterosclerosis, hipertensión, isquemia, vasculitis sistémica, microangiopatía trombótica...	Displasia fibromuscular, vasculitis renal asociada a ANCA.
<b>Enfermedades quísticas y congénitas</b>	Enfermedad renal poliquística, síndrome de Alport, síndrome de Fabry.	Displasia renal, enfermedad quística medular, podocitopatías.

**Tabla 2. Clasificación de la ERC basada en la presencia o ausencia de enfermedad sistémica y la ubicación en el riñón de hallazgos anatomopatológicos. Abreviaturas: ANCA, anticuerpo citoplásmico anti-neutrófilos. Adaptado de KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease<sup>1</sup>.**

b) Asignar categoría de tasa de filtrado glomerular (IFG) como se indica:

Categorías IFG en ERC		
Categoría IFG	IFG (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	Términos
G1	≥90	Normal o alto
G2	60-89	Levemente disminuido
G3a	45-59	Medio a moderadamente disminuido
G3b	30-44	Moderadamente a severamente disminuido
G4	15-29	Severamente disminuido
G5	<15	Fallo renal

En ausencia de evidencia de daño renal, ni la categoría G1 ni G2 cumple los criterios de CKD.

**Tabla 3. Categorías de índice de filtrado glomerular en ERC.** Abreviaturas: IFG, índice filtrado glomerular. Adaptado de KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease<sup>1</sup>.

c) Asignar una categoría de albuminuria como se indica:

Categorías de albumina en ERC				
Categoría	TEA (mg/24h)	ACR		
		(mg/mmol)	(mg/g)	Términos
A1	<30	<3	<30	Normal o medianamente incrementado
A2	30-300	3-30	30-300	Moderadamente incrementado
A3	>300	>30	>300	Muy incrementado

**Tabla 4. Categorías de albúmina en ERC.** Abreviaturas: TEA, tasa excreción albúmina; ACR, ratio albúmina-creatinina. Adaptado de KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease<sup>1</sup>.

En base a las divisiones de estadios según el índice de filtración glomerular y de albuminuria, podemos predecir el riesgo de morbi-mortalidad y de progresión de la enfermedad, según KDIGO 2012, estableciéndose los distintos grados mostrados a continuación:

- 1) Bajo riesgo (verde): si no hay lesión renal no se puede catalogar como ERC
- 2) Riesgo moderadamente aumentado (amarillo)
- 3) Riesgo alto (naranja)
- 4) Riesgo muy alto (rojo)

				Albuminuria Estadios, descripción e intervalo (mg/g)				
				A1		A2		A3
				Óptimo y alto-normal		Alto		Muy alto y nefrótico
				<10	10-29	30-299	300-1999	≥2000
FG Estadios, (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	G1	Alto y óptimo	>105					
			90-104					
	G2	Leve	75-89					
			60-74					
	G3a	Leve-moderado	45-59					
	G3b	Moderado-Grave	30-44					
	G4	Grave	15-29					
G5	Fallo renal	<15						

**Tabla 5. Clasificación de los riesgos relativos según el índice de filtrado glomerular y albuminuria.** Las unidades de albúmina son mg/g y son aproximadamente 10 veces los niveles expresados en mg/mmol. Fuente: Documento consenso sobre la enfermedad renal crónica<sup>2</sup>.

### 1.1.2 Epidemiología

La ERC es un problema emergente a nivel mundial (*Figura 1*) con una prevalencia estimada de 11,8% en mujeres y 10,4% en hombres, aunque hay diferencias muy amplias relacionadas con las áreas geográficas, género y también variables económicas<sup>3</sup>.

España es uno de los países europeos con mayor prevalencia de ERC. El estudio ENRICA, recientemente, ha situado la prevalencia en 15,1%, por encima de la estimada por *The Global Kidney Health Atlas*. En total, más de 7 millones de personas la padecen, de las cuales 61.000 están en tratamiento renal sustitutivo (TRS) y la supervivencia global para estos pacientes en diálisis es de un 12,9% a los diez años. En cuanto a la mortalidad, es una de las principales causas de muertes en el mundo occidental: su peso como causa de muerte en España ha aumentado un 30% en la última década. En 2016 fallecieron 4.700 personas con TRS y se estima que la atención a esta enfermedad representa alrededor del 3% del gasto sanitario español<sup>4</sup>.



**Figura 1. Prevalencia de la enfermedad Renal Crónica a nivel mundial.** Fuente: Dossier La Enfermedad Renal Crónica en España 2020, Sociedad Española de Nefrología<sup>4</sup>.

En el *ERA-EDTA Registry Annual Report 2017* se especifica la prevalencia e incidencia de pacientes por millón de población (pmp) y por países europeos (los participantes en el estudio), las cuales las podemos ver en los siguientes gráficos. En España, concretamente la prevalencia es de 1191 pmp y la incidencia de 129 pmp, siendo el quinto país con más prevalencia de pacientes con TRS. Cataluña es la comunidad

autónoma española con una mayor tasa de prevalencia e incidencia, con 1441 pmp y 168 pmp respectivamente (Figura 2,3)<sup>5</sup>.

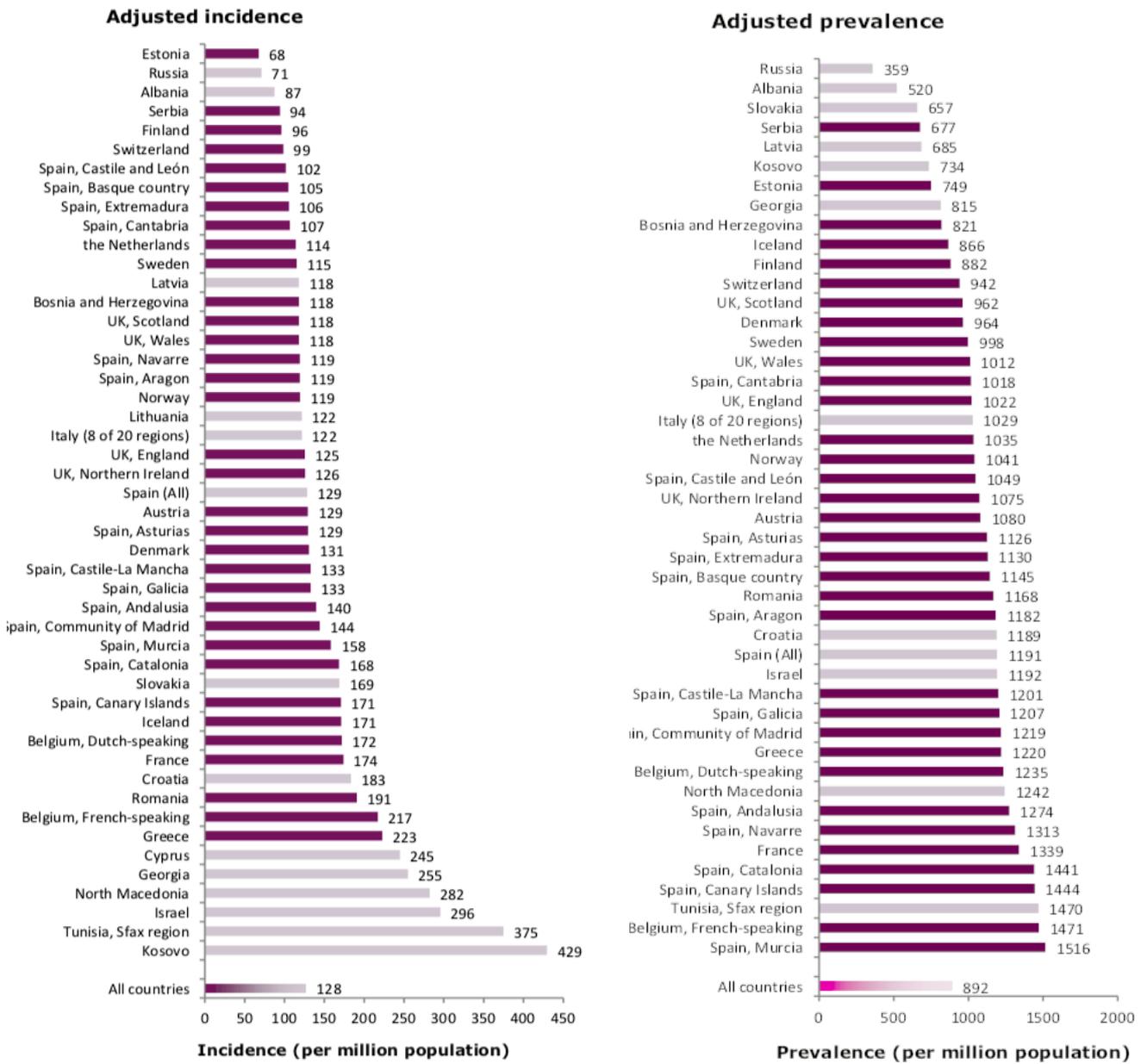
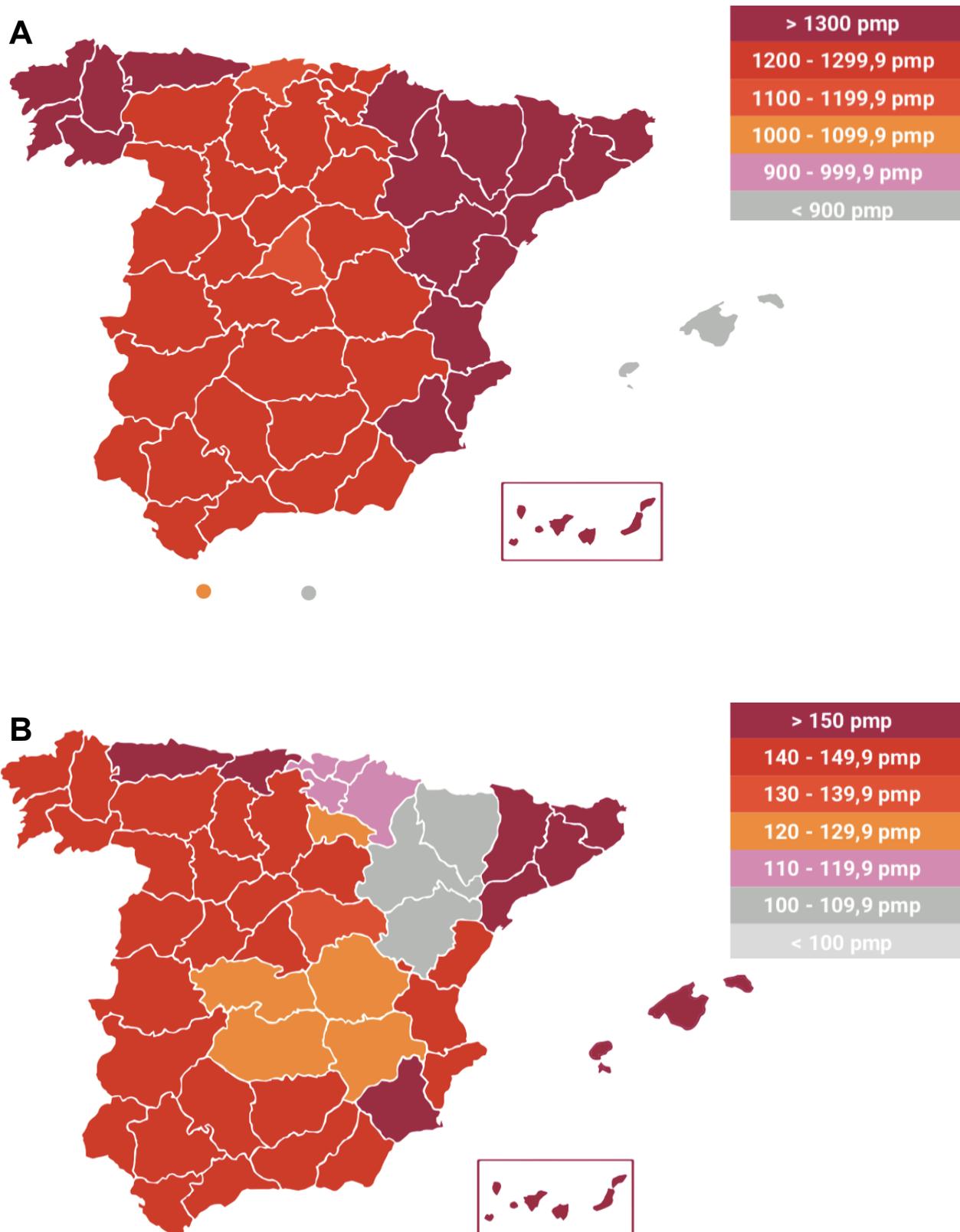


Figura 2. Incidencia y prevalencia por millón de población por países/regiones en 31 diciembre 2017. Fuente: ERA-EDTA Registry Annual Report 2017<sup>5</sup>



**Figura 3. Prevalencia (a) e incidencia (b) por comunidades autónomas de España por pacientes por millón de población. Fuente: Dossier La Enfermedad Renal Crónica en España 2020, Sociedad Española de Nefrología<sup>4</sup>.**

### 1.1.3 Factores de riesgo en la ERC

En cada una de las fases de la enfermedad renal crónica podemos encontrar distintos factores de riesgo que influyen en estas:

#### **Factores de susceptibilidad:** aumentan la posibilidad de desarrollar ERC

- Edad avanzada
- Historia familiar de ERC
- Masa renal disminuida
- Bajo peso al nacer
- Raza negra y otras minorías étnicas
- Hipertensión arterial
- Diabetes
- Obesidad
- Nivel socioeconómico bajo

#### **Factores iniciadores:** pueden iniciar directamente el fallo renal

- Enfermedades autoinmunes
- Infecciones sistémicas
- Infecciones urinarias
- Litiasis renal
- Obstrucción de las vías urinarias bajas
- Fármacos nefrotóxicos (principalmente AINES)
- Hipertensión arterial
- Diabetes

#### **Factores de progresión:** pueden empeorar y acelerar el deterioro de la función renal

- Proteinuria persistente
- Hipertensión arterial mal controlada
- Diabetes mal controlada
- Tabaquismo
- Dislipidemia
- Anemia
- Enfermedad cardiovascular asociada
- Obesidad

#### **Factores de estadio final:** incrementan la morbimortalidad en situación de fallo renal

- Dosis baja de diálisis
- Anemia
- Hipoalbuminemia
- Derivación tardía a nefrología

*Tabla 6. Factores de riesgo en la ERC. Fuente: documento de consenso sobre la enfermedad renal crónica<sup>2</sup>.*

Algunos de ellos, como la diabetes, obesidad, hipertensión, tabaquismo y dislipidemia son modificables, es decir, con su control, podemos evitar el inicio de daño renal, e incluso favorecer la regresión de la enfermedad en fases iniciales<sup>2</sup>.

#### **1.1.4 Complicaciones de la ERC**

Los pacientes con ERC son más susceptibles a desarrollar una variedad de complicaciones relacionadas con la pérdida de la función endocrina y exocrina de los riñones. Algunas de estas complicaciones se detallan a continuación<sup>1</sup>:

##### **a) Anemia**

Los pacientes con ERC pueden padecer anemia debido a la producción inadecuada de eritropoyetina endógena, que es la hormona responsable de la diferenciación y maduración de los precursores de la serie roja. La anemia aparece en estadios precoces de la ERC y en estadios más avanzados alrededor del 90% de los pacientes presentan esta complicación<sup>2</sup>.

##### **b) Acidosis**

La acidosis metabólica crónica está asociada con un incremento del catabolismo proteico, enfermedad urémica ósea, gasto muscular, inflamación crónica, deterioro de la homeostasis de la glucosa, deterioro de la función cardíaca, progresión de la ERC e incremento de la mortalidad<sup>1</sup>.

##### **c) Enfermedad cardiovascular**

La enfermedad cardiovascular es una complicación frecuente en los pacientes en diálisis donde podemos distinguir tres lesiones importantes: la hipertrofia del ventrículo izquierdo (HVI), la aterosclerosis y la calcificación vascular (CV). Esta última se explicará en detalle en el punto siguiente.

En primer lugar, la *hipertrofia del ventrículo izquierdo* es un mecanismo de adaptación del músculo cardíaco a un exceso mantenido de trabajo por una sobrecarga de presión o volumen<sup>6</sup>. La sobrecarga de presión es debida al aumento de presión arterial, la rigidez de las arterias o la estenosis aortica. Es importante destacar que el riñón influye en la presión arterial mediante dos mecanismos: regulando el contenido de líquido del organismo y

mediante la producción de sustancias vasoactivas con efectos locales y sistémicos. Cuando hay un trastorno en alguno de estos mecanismos se desarrolla hipertensión arterial (HTA)<sup>7</sup>. Por otro lado, la sobrecarga de volumen es inducida por la hipervolemia crónica, anemia o circulación hiperdinámica.

Las consecuencias de la HVI son la disfunción sistólica y diastólica desarrollando una insuficiencia cardíaca congestiva, cardiopatía isquémica por aumento en la demanda de oxígeno y arritmias<sup>6</sup>.

Otra complicación vascular en estos pacientes es la *aterosclerosis*, es decir, la formación de placas de ateroma en la íntima de las arterias debido a un proceso inflamatorio y que pueden provocar un síndrome oclusivo. Las consecuencias de esta son obstrucciones a diferentes niveles, como las arterias coronarias, las arterias cerebrales, las arterias periféricas, etc.<sup>6</sup>

#### **d) Alteraciones del metabolismo óseo mineral**

Otra complicación muy frecuente en pacientes con ERC son las alteraciones en el metabolismo del calcio y fósforo que se asocian con diversos tipos de enfermedad ósea (osteodistrofia renal), con hiperparatiroidismo secundario a la ERC, presencia de calcificaciones coronarias, vasculares y valvulares; todo ello se define como CKD-MBD (*Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder*).

Se ha descrito que la manifestación bioquímica más temprana es el aumento de FGF23, como respuesta inicial en los estadios precoces de la ERC, incluso cuando los niveles de vitamina D, PTH, calcio y fosforo aun están en un rango normal<sup>8</sup>. A medida que la enfermedad renal avanza, este incremento en FGF-23 produce una disminución de los niveles de vitamina D, un incremento de los niveles de PTH y hiperfosfatemia<sup>8</sup>.

#### **1.1.5 Homeostasis del metabolismo mineral**

Para entender estos desordenes metabólicos es imprescindible, en primer lugar, comprender el funcionamiento normal del metabolismo mineral, que controla la homeóstasis de calcio (Ca) y fósforo (P) y que involucra:

- a) *Cuatro órganos*: el riñón, la glándula paratiroidea, el hueso y el intestino.

- b) *Tres hormonas*: 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25D), la hormona paratiroidea (PTH) producida por las células principales de la glándula paratiroidea (GPT) y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF23) producido por el hueso.
- c) Flujo de calcio y fósforo entre cada uno de los órganos y el torrente sanguíneo.

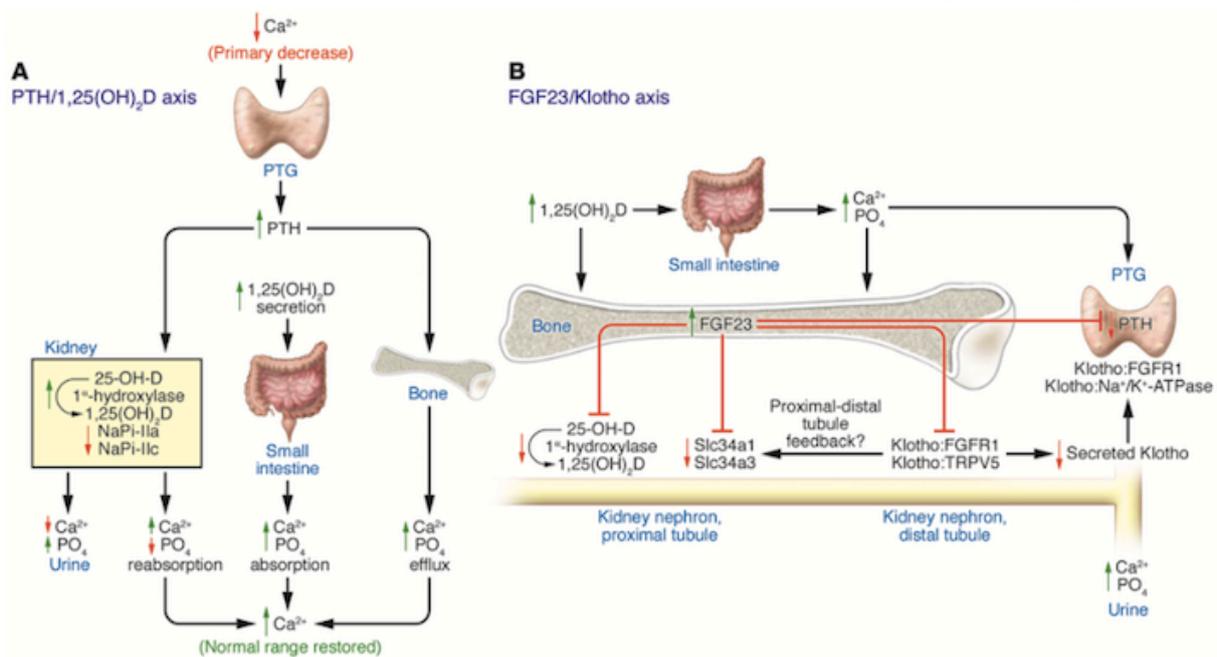
Es importante controlar los dos ejes que son el del calcio/1,25D/PTH y el del fósforo/1,25D/FGF23 (*Figura 4*), donde en los dos casos la forma hormonal de la vitamina D (1,25D) juega un papel importante.

La GPT actúa como un sensor muy sensible de los niveles de calcio en sangre y en situación de hipocalcemia empieza a secretar la PTH que estaba acumulada en la glándula. Si la hipocalcemia persiste, se induce nueva síntesis de PTH, la cual irá acompañada finalmente de un aumento de la proliferación de las células paratiroideas para poder aportar suficiente PTH y aumentar los niveles de calcio hasta niveles normales. En primer lugar la PTH tiene como diana el túbulo renal distal para incrementar la reabsorción de calcio y el túbulo proximal, para disminuir la reabsorción de fósforo y estimular actividad de la 1 $\alpha$ -hidroxilasa (Cyp27b1) y así aumentar la producción de 1,25D. La acción de la 1,2D en el intestino es estimular la absorción intestinal de calcio y fosforo de la dieta. El déficit de 1,25D puede ocasionar hiperparatiroidismo secundario.

En el caso que no haya suficiente calcio en la dieta, la PTH actúa sobre el hueso, para obtener el calcio que se necesita y corregir los niveles en la circulación a partir de la desmineralización del hueso. Cuando los niveles se normalizan, el calcio y la 1,25D suprimen la secreción de PTH y la proliferación de las células de la GPT. Por lo tanto los efectos de la PTH directos en los riñones y el hueso, junto con las acciones de la 1,25D restauran los niveles de calcio normal.

El segundo eje, P/1,25D/FGF23 tiene la función de evitar que los mecanismos usados para la corrección de calcio no resulten en elevaciones de fosforo en sangre que puedan causar calcificaciones en tejidos blandos como arterias o el mismo riñón. Por esto, la 1,25D o los aumentos de fósforo son los que hacen aumentar la producción de FGF23 en el hueso. Este actúa en el riñón aumentando la eliminación urinaria de fosforo y suprimiendo la producción de 1,25D para evitar que el intestino absorba más calcio y

fosforo y se comprometa el equilibrio. De esta forma se normalizan los niveles de fosforo. FGF23 también podría directamente influir en la GPT para reducir la excreción de PTH<sup>9</sup>.



**Figura 4. Esquema de la regulación del metabolismo mineral.** A) eje calcio/1,25D/PTH y B) eje fósforo/1,25D/FGF23  
Fuente: Quarles LD 2008<sup>9</sup>.

### 1.1.6 Metabolismo mineral en la ERC

En los enfermos renales encontramos distintas alteraciones en este sistema:

En las primeras etapas de la ERC, los niveles de FGF23 son los primeros que aumentan como adaptación fisiológica para mantener los niveles de fosfato séricos y evitar la hiperfosfatemia, y esto conducirá a una fosfaturia y disminución de la producción de vitamina D<sup>10</sup>. La pérdida progresiva de nefronas hará que las acciones de FGF23 juntamente con la secreción PTH no sean suficientes y que las concentraciones de fosforo sérico aumenten, por lo que resulta con una *hiperfosfatemia*<sup>11</sup>.

Además, hay una serie de eventos como: a) formación de sales de calcio-fosfato que conlleva una reducción del calcio sérico y reducción de la absorción de calcio debido a la disminución de la función renal (*hipocalcemia*); b) el efecto inhibitorio del Pi sobre la enzima 1 $\alpha$ -hidroxilasa en el riñón que provoca también una *disminución de 1,25D* y, c) disminución de la masa renal viable con la disminución de la actividad 1 $\alpha$ -hidroxilasa y por tanto una disminución de la síntesis de vitamina D, favoreciendo más unos niveles bajos en suero. Todos ellos resultan en una hipocalcemia e inician una cascada de eventos que

lleva a una desregulación de la hormona paratiroidea y consecuentemente un *hiperparatiroidismo secundario (HPT2)*<sup>12</sup>.

También podemos detectar alteraciones morfológicas en el hueso debido a esta desregulación en la homeostasis mineral y podemos encontrar calcificaciones extraesqueléticas como resultado del metabolismo mineral y óseo descarrilado, pero también, por las terapias usadas para corregir las anomalías<sup>1</sup>.

En estos pacientes, para tratar el hiperparatiroidismo secundario se administran suplementos de calcio, vitamina D y quelantes de fosfatos. La administración de vitamina D se ha visto que funciona incrementando los niveles de calcio sérico y también por medio de su acción directa en la GPT suprimiendo los niveles de PTH<sup>13</sup>. Aun así, el efecto de la vitamina D en la absorción de calcio y fósforo del intestino y la resorción del hueso puede provocar complicaciones como hipercalcemias y hiperfosfatemias, con sus efectos secundarios como calcificaciones extraesqueléticas.

Por esto, se usan análogos de la vitamina D, como el paricalcitol, que tiene también el efecto en la GPT para disminuir las concentraciones séricas de PTH pero no provoca hipercalcemia y hiperfosfatemia<sup>14</sup>. El tratamiento con paricalcitol se ha asociado con una mejor supervivencia<sup>15</sup>.

---

## 1.2 Calcificación vascular

---

La principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con enfermedad renal crónica es la enfermedad cardiovascular, en especial la calcificación vascular. Esta complicación tiene un papel importante en los pacientes con ERC incluso en las primeras etapas de la enfermedad, provocando un incremento de la rigidez vascular y una disminución de la función de los vasos. Eso se asocia con un aumento de la velocidad de onda pulso y presión, con el consecuente deterioro de la distensibilidad arterial, aumento de postcarga que favorecen la hipertrofia ventricular izquierda y la perfusión coronaria comprometida<sup>16</sup>.

### 1.2.1 Estructura vascular

Podemos encontrar distintos tipos de calcificación arterial. Para ello es importante primero tener en cuenta la estructura de las capas de los vasos sanguíneos:

- **Túnica adventicia:** constituida por *tejido conjuntivo laxo* (fibroblastos y colágeno). Sirve como anclaje del vaso a los tejidos que lo rodean.
- **Túnica media:** formada por *células musculares lisas* (CMLV), fibras elásticas y la *lámina elástica externa* (fibras elásticas y colágenas en proporción variable) que la separa de la adventicia. Es la principal responsable de las propiedades mecánicas de la pared arterial.
- **Túnica íntima:** formada por el *endotelio* (células endoteliales que tapizan la luz del vaso y actúan como barrera), el *subendotelio*, que está constituido por tejido conjuntivo y por último, la *lámina elástica interna*, que es una membrana que contiene una red de fibras elásticas y la separa de la capa media<sup>17,18</sup>.

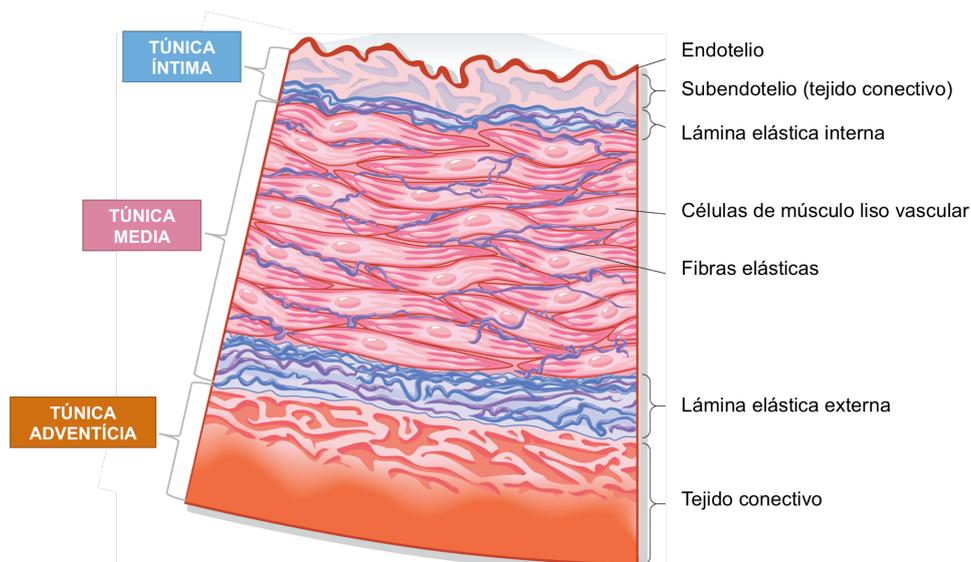


Figura 5. Estructura de la pared arterial. Adaptado de Encyclopædia Britannica, Inc.

## 1.2.2 Tipos de calcificación vascular

Se pueden distinguir cuatro tipos de calcificación vascular basándonos en su localización, la asociación con placa de ateroma o el modo de formación:

- **Calcificación pasiva:** calcificación de tejidos blandos u órganos como resultado del producto anormal de Ca/P.
- **Calcificación activa,** la podemos dividir en tres tipos:
  - o **Calcificación de las válvulas cardíacas,**
  - o **Calcificación de la capa íntima:** asociada a la placa de ateroma y la secuencia de eventos relacionados como disfunción endotelial, un aumento de la deposición de lípidos y el infiltrado de células inflamatorias,
  - o **Calcificación de la capa media:** conocida como *esclerosis de Mönckeberg* (descrita en 1903). Como resultado de la mineralización de las fibras elásticas, degeneración de CMLV, y un incremento de la expresión de genes osteogénicos se produce un cambio de fenotipo en las células de músculo liso vascular hacia células parecidas a osteoblastos. Es independiente de la aterosclerosis pero pueden coexistir. Se observa frecuentemente en pacientes con anomalías metabólicas como hipervitaminosis D, ERC y diabetes.<sup>19,20,21</sup>

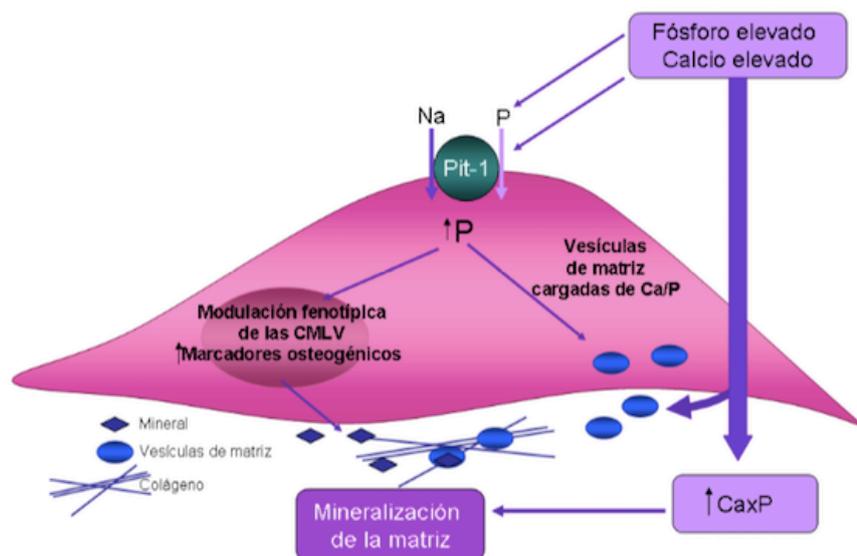
### 1.2.2.1 Calcificación de la capa media: esclerosis de Mönckeberg

En el proceso de calcificación vascular intervienen diferentes mecanismos:

En primer lugar, en el mecanismo pasivo, los niveles altos de Ca y P aumentarán la formación y precipitación de cristales de bioapatita en la matriz extracelular<sup>22</sup>. Estos cristales de fosfato cálcico pueden interactuar y activar monocitos y macrófagos que después producirán citoquinas que promueven aún más la calcificación<sup>19</sup>.

Sin embargo, la calcificación no es solo este proceso pasivo, sino que es un proceso activo extremadamente regulado de una forma parecida a la mineralización y metabolismo del hueso, y que incluye un cambio fenotípico de las CMLV a células óseas, la activación de genes asociados a la diferenciación ósea, apoptosis, liberación de vesículas extracelulares y senescencia celular<sup>22,19</sup>.

Un factor importante es la hiperfosfatemia, que afectará a las CMLV, estimulando la entrada y acumulación de fósforo dentro de la célula a través del cotransportador de fosfato dependiente de sodio (Pit-1). Este proceso será una señal para la expresión de genes osteogénicos (fosfatasa alcalina, BMP-2 Runx2, osteocalcina, osteopontina) y disminución de los inhibidores de calcificación. Estas CMLV padecen una desdiferenciación fenotípica, pasando de un fenotipo contráctil a uno de sintético y que lleva a una formación de matriz mineralizada, cartílago y hueso. A continuación, estas CMLV-osteoblastos secretarán moléculas minerales (vesículas de matriz, proteínas ligadoras de calcio, fosfatasa alcalina y matriz extracelular rica en colágeno), lo que crea un ambiente permisivo para la deposición de minerales como Ca y P<sup>19</sup>. Todos estos factores llevan a la transformación de la célula para ser susceptible de calcificación (*Figura 6*).



**Figura 6. Modelo de los efectos del calcio y fósforo elevados en la mineralización de las CMLV.** Adaptado de Giachelli C.M. et al.<sup>16</sup>

Además, estas células padecen procesos de inflamación y estrés oxidativo que provocarán apoptosis celular y formación de vesículas con contenido citoplasmático y membrana celular<sup>20</sup>. Este proceso está contrarrestado por inhibidores locales o circulantes de la calcificación como fetuína A o la proteína de matriz-Gla, cuyas concentraciones y funciones disminuyen en la ERC y, por esto, la pérdida de estas moléculas influye en la calcificación<sup>19,16</sup>.

Recientemente, también se ha visto que los microRNAs pueden regular muchos procesos celulares como la calcificación vascular. Se han descrito varios microRNAs candidatos en regular este proceso, los cuales se detallarán más adelante.

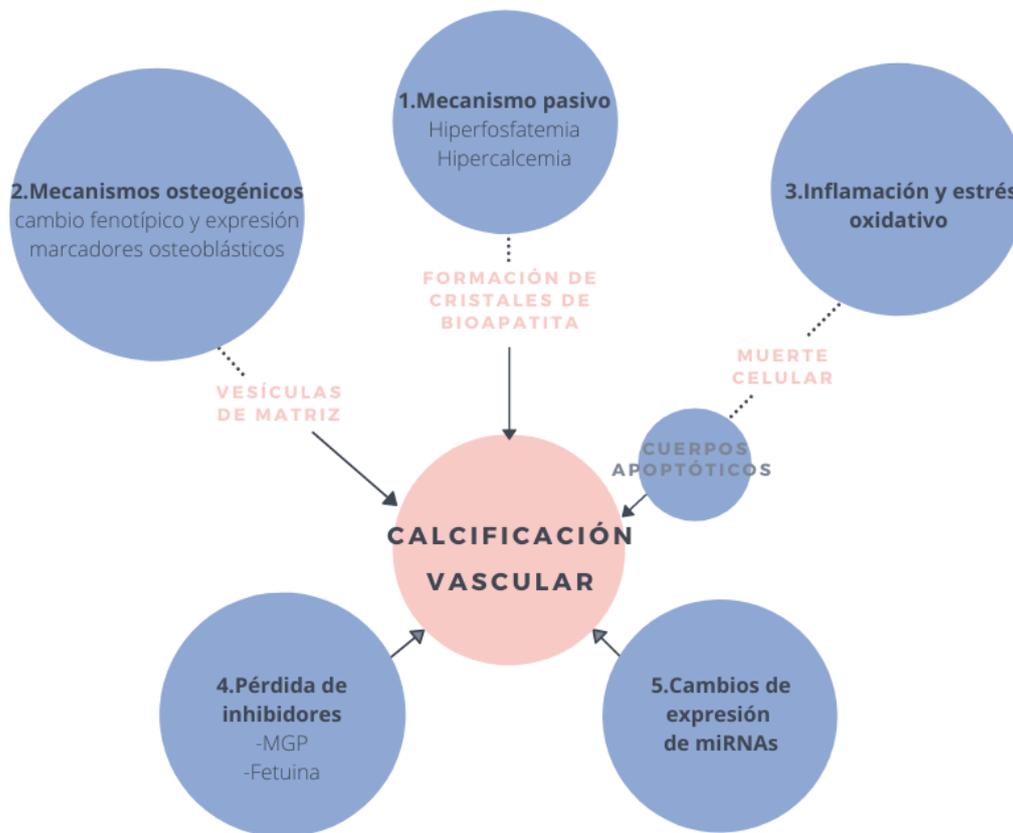


Figura 7. Mecanismos involucrados en el proceso de calcificación vascular. Fuente: Elaboración propia.

### 1.2.3 Activadores de la calcificación

Tal y como hemos mencionado anteriormente, en la calcificación vascular se produce un gran aumento de expresión de marcadores de diferenciación osteoblástica debido a la hiperfosfatemia, pero además, se han identificado un amplio número de factores relacionados con la uremia que también tienen la capacidad de inducir genes osteogénicos, de transformación osteoblástica y de secreción de algunas proteínas de matriz ósea en la pared de los vasos y tejidos blandos<sup>23</sup>. Algunas de las moléculas que favorecen la calcificación vascular son:

**1) Fosfatasa alcalina (ALP):** es uno de los marcadores fenotípicos de los osteoblastos y se ha descrito como esencial en el proceso de calcificación vascular. Puede actuar sobre los liberadores de fosfato provocando la secreción de fosfato inorgánico<sup>20</sup>. Se ha descrito que tanto las citoquinas inflamatorias<sup>24</sup> como la vitamina D<sup>25</sup> inducen su activación, influyendo en la mineralización.

**2) Core binding factor alpha 1 (Cba1) o Runx2:** es un factor de transcripción esencial en la diferenciación osteoblástica, expresión de genes de matriz ósea y

consecuentemente mineralización ósea. Runx2 induce la expresión de importantes genes de la línea osteoblástica como la osteocalcina, osteopontina o ALP. Durante la mineralización de las CMLV se ha demostrado que hay un aumento de Runx2 en cultivos con medio con  $\beta$ -glicerofosfato (comparable con la situación al final de la ERC)<sup>20</sup>. El fosfato<sup>26</sup> y las toxinas urémicas<sup>27</sup> incrementan su expresión.

**3) RANKL:** es una proteína producida por la línea osteoblástica y células T activas y promueve la formación, diferenciación y activación de osteoclastos permitiendo el aumento de la resorción y pérdida de hueso mediante la estimulación de su receptor específico RANK que se expresa en un número de células más reducido como los progenitores y osteoclastos maduros, las células T activas y las células dendríticas. La activación de RANK inicia la cascada de señalización intracelular de NF- $\kappa$ B, un complejo proteico que funciona como factor de transcripción que finalmente modula la expresión de diferentes genes como, por ejemplo BMP4<sup>20</sup>. Su expresión está modulada por varias citoquinas, glucocorticoides y PTH<sup>28</sup>.

**4) Bone morphogenic proteins:** las BMPs son un grupo de proteínas que forman parte de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ). Mediante la unión a un heterodímero de receptores transmembrana, actúan y provocan la translocación nuclear de factores de transcripción Smad modificando la transcripción de los genes diana que finalmente inducen la formación ectópica de hueso. BMP2 y BMP4 se han descrito como mediadores de la calcificación vascular porque están implicados en la mineralización y en la inducción de la inflamación local. La proteína de matriz Gla (MGP) inhibe el efecto de BMP2 en la calcificación vascular<sup>20</sup>.

**5) Osteocalcina:** La osteocalcina es un polipéptido proteico de 49 aminoácidos producido principalmente en los últimos estadios de la diferenciación osteoblástica y liberado a la circulación cuando el hueso nuevo se forma, por esto se considera un marcador de recambio óseo<sup>29</sup>. Se ha demostrado que sus niveles aumentan en la diferenciación osteogénica de CMLV y que tiene funciones de estimulador y diferenciador de la mineralización activando Runx2, Sox9, ALP y el contenido mineral. Se ha mostrado una correlación entre la calcificación arterial y la elevación de osteocalcina en ratas tratadas con vitamina D<sup>30</sup>.

**6) Lamin A:** las proteínas Lamin A/C, codificadas por el gen *Lmna*; son las mayores componentes de la capa nuclear y se expresan principalmente en células de origen mesenquimal como tejido adiposo, hueso y cardiovascular. Tanto la Lamin A como la C están involucradas en la organización de la cromatina, regulación del ciclo celular, transcripción génica y señalización celular. La forma inmadura de Lamin A, la prelamin A, se puede acumular debido al envejecimiento, y, como los pacientes de ERC tienen muchas características del síndrome de envejecimiento acelerado, estudiar la expresión de lamin A/C podría ser útil para explicar, por ejemplo, la calcificación vascular. Algunos estudios apuntan la prelamin A y lamin A/C como factores importantes de la diferenciación osteoblástica y se cree que también podrían estar promoviendo la diferenciación de las CMLV a células osteoblásticas. También se ha descrito que Lamin A/C pueden ser necesarias para una eficaz unión nuclear y actividad transcripcional de Runx2<sup>31</sup>.

**7) Osterix (Osx):** es un factor de transcripción que pertenece a la familia de las proteínas de especificidad (Sp) y dentro de estas se conoce como Sp7. Tiene la función esencial de diferenciar osteoblastos para que se produzca la mineralización ósea<sup>32</sup>. Los ratones con deficiencia de *Osx* acumulan preosteoblastos detenidos en su diferenciación<sup>33</sup>. Se ha identificado como diana de Runx2<sup>34</sup>.

**8) Osteopontina (OPN):** es miembro de la familia de proteínas SIBLING (*small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein*) reguladoras de la mineralización del hueso y dientes. Sus mecanismos en la regulación de la calcificación vascular aún no están completamente resueltos<sup>35</sup>. Por un lado en algunos estudios, como el de *Giachelli et al*, vieron que ratones OPN<sup>-/-</sup> no mostraban calcificaciones, pero si los cruzaban con ratones MGP<sup>-/-</sup> (OPN<sup>-/-</sup>, MGP<sup>-/-</sup>) estos mostraron una calcificación más elevada que los ratones solo MGP<sup>-/-</sup>, indicando que OPN es un inhibidor inducible de la calcificación vascular *in vivo*<sup>36</sup>. Pero en otros estudios, OPN se incluye como gen osteoblástico, cuya expresión aumenta en cultivos de CMLV tratados con medios calcificantes<sup>31</sup>. Se ha relacionado esta función dual con las modificaciones post transcripcionales: OPN incrementa la mineralización vascular de las CMLV, mientras que OPN fosforilado es un potente inhibidor de la calcificación vascular<sup>37</sup>.

### 1.2.4 Inhibidores de la calcificación

En condiciones normales las células de los vasos expresan inhibidores de calcificación y, si hay una pérdida de estos como en el caso de la ERC, puede producirse una calcificación espontánea. Algunos de los inhibidores que se han descrito son<sup>20</sup>:

**1) Matrix Gla Protein (MGP):** se expresa constitutivamente en las CMLV y en células endoteliales pero en arterias calcificadas disminuye su expresión y los niveles séricos son menores<sup>20</sup>. MGP es una proteína que depende de vitamina K y pertenece a una familia de proteínas extracelulares de unión a minerales llamada Gla. Estos residuos Gla tienen alta afinidad para iones calcio, fosfato, y cristales de hidroxapatita. Aún así, el mecanismo exacto de inhibición de la CV se desconoce, aunque se sabe que es sintetizada por varios tejidos incluido las CMLV<sup>38</sup>.

Se ha descrito que la MGP protege de la calcificación arterial a través de varios mecanismos: a) tiene una alta afinidad para cristales de hidroxapatita formados de nuevo y anula su acumulación en la pared arterial; b) después de unirse a estos cristales, activa los macrófagos arteriales y promueve la fagocitosis y apoptosis del complejo MGP-hidroxapatita y, por último, c) MGP directamente inhibe la unión de *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2) a su receptor y consecuentemente disminuye su función<sup>39</sup>. Para ser activa, la MGP tiene que ser fosforilada y carboxilada; la carboxilación es dependiente de vitamina K y la fosforilación es necesaria para su secreción<sup>40</sup>.

**2) Fetuin A:** También se conoce como glicoproteína alfa2-Heremans-Schmid y es la proteína sérica más potente como inhibidor de la calcificación. Cuando está expuesta a altas concentraciones de calcio y fosfato forma las partículas primarias calciproteínas (CPP) que contienen fosfato cálcico y lo mantienen en solución para prevenir que precipite. En pacientes con ERC se han encontrado bajas concentraciones de fetuin A<sup>35</sup>.

**3) Klotho:** es una proteína transmembrana que actúa como co-receptor (juntamente con el receptor de FGF) del factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23) y tiene un papel importante en el equilibrio del calcio-fosfato. La señalización a través de FGF23 y Klotho reduce la reabsorción de fosforo disminuyendo los co-transportadores de sodio fosfato tipo-2 en el túbulo proximal y también la síntesis de la vitamina D. Además, la forma de Klotho soluble, actúa como factor endocrino ejerciendo sus funciones mediante su

actividad glicosilasa y se ha visto implicado en la inhibición de la señalización por Wnt así como también el mantenimiento de la integridad endotelial<sup>35</sup>.

**4) Osteoprotegerin (OPG):** es una proteína que se expresa de forma endógena en las CMLV y actúa neutralizando el receptor de RANKL y TRAIL para regular la diferenciación osteoblástica. RANKL es producido por las células T activadas y estimula a RANK, lo cual permite la diferenciación y activación de los osteoclastos que aumentan la resorción ósea y pérdida de hueso. Además OPG es receptor de TRAIL, factor de necrosis tumoral, el cual se ha encontrado en áreas calcificadas y es un potente inductor de apoptosis<sup>41</sup>. Como se ha visto incrementado en pacientes con calcificaciones vasculares no está muy claro su significado como biomarcador y si su elevación refleja, quizá, un incremento para combatir la calcificación<sup>35</sup>.

**5) Esclerostina (SOST):** Se ha descrito como un inhibidor de la señalización por la vía canónica Wnt/ $\beta$ -catenina en el proceso de formación de hueso<sup>42,43</sup>. En general el papel de SOST en la transdiferenciación de las CMLV y en el desarrollo de la calcificación vascular no es muy conocido, pero su función más descrita es su mecanismo de *feedback* negativo para prevenir la calcificación excesiva<sup>43</sup>. La reducción de SOST incrementa la expresión de marcadores osteoblásticos y promueve la formación de hueso<sup>43,44</sup>. En un estudio de calcificación con células de musculo liso vascular humanas mostraron que SOST era capaz de disminuir la expresión de Runx2 y restaurar la actividad de la  $\alpha$ -actina de musculo liso<sup>44</sup>.

---

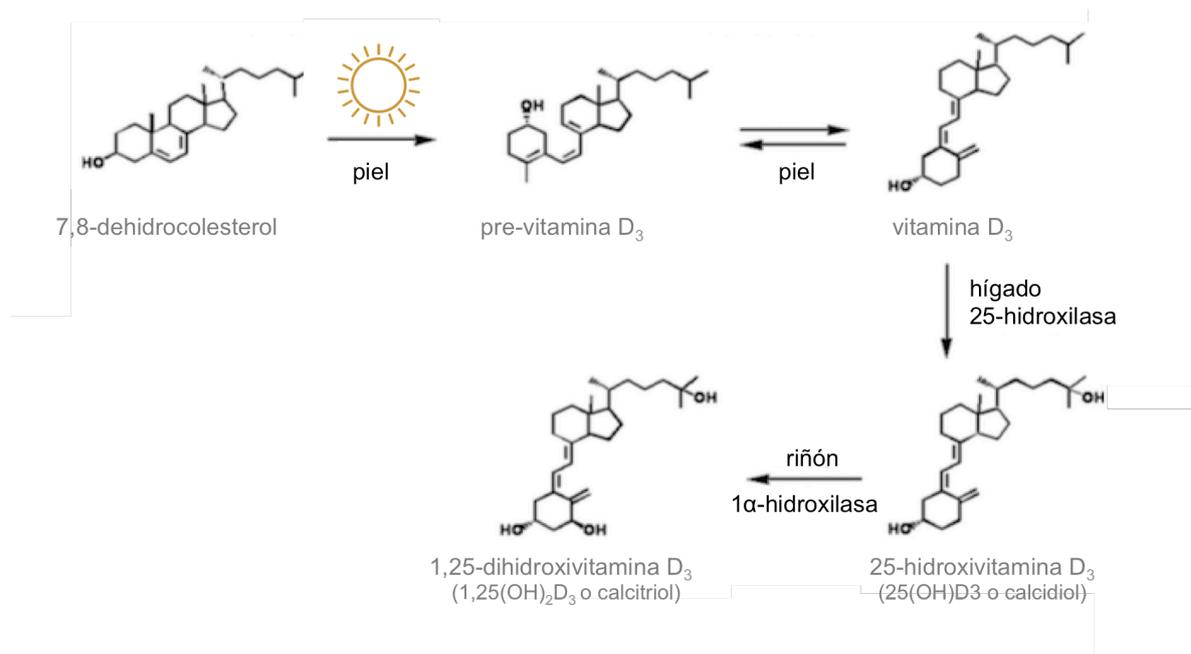
## 1.3 Vitamina D

---

La vitamina D es una hormona esteroidea que, tal y como hemos descrito anteriormente, tiene una función importante en el metabolismo mineral y, en la enfermedad renal, sus niveles disminuyen debido a la disminución de la función renal.

### 1.3.1 Síntesis de la vitamina D

La vitamina D se sintetiza a través de distintos pasos (*Figura 8*). En primer lugar la vitamina D<sub>3</sub> se forma en la piel a través de la bioactivación del 7,8-dehidrocolesterol o se ingiere a través de la dieta y se transporta al hígado para sufrir un primer paso en su activación<sup>45</sup>. En la piel, la vitamina D<sub>3</sub> se produce por una conversión fotolítica del 7,8-dehidrocolesterol inducida por la luz UV a previtamina D<sub>3</sub>, seguido de una isomerización térmica a vitamina D<sub>3</sub><sup>46</sup>. Para terminar con la activación, la vitamina D<sub>3</sub> sufre una hidroxilación del carbono 25, principalmente el hígado. Sin embargo hay otros tejidos como piel, intestino y riñón que también tienen esta función. Tras esta hidroxilación se formará 25(OH)D<sub>3</sub> (calcidiol), que es el metabolito principal que se encuentra en sangre y que se usa para determinar el estado de vitaminosis D en una población<sup>45</sup>. El último paso para la activación, en el cual se forma calcitriol a partir de calcidiol, se da principalmente en el riñón a través de la enzima 25(OH)D-1 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP27B1), localizada en la membrana mitocondrial interna<sup>47</sup>. Después de este paso, la vitamina D ya está activa. El riñón no es el único tejido que puede convertir calcidiol en calcitriol, tanto las células endoteliales como las CMLV tienen actividad CYP27B1, juntamente con la expresión del receptor de la vitamina D (VDR)<sup>48</sup>. Por lo tanto, existe una producción local para que el calcitriol actúe como regulador paracrino de ciertas funciones, aunque esta normalmente no contribuirá a los niveles circulantes de calcitriol<sup>49</sup>.



**Figura 8. Síntesis de la vitamina D a partir del 7,8-dehidrocolesterol. Adaptado de Dusso 2005<sup>50</sup>**

Los niveles de la vitamina D activa, se regulan por la síntesis (mediante 1 $\alpha$ -hidroxilasa que es estimulada por la PTH) pero también por la degradación, mediante la enzima 24-hidroxilasa, que es la responsable de la hidroxilación de la 25(OH)D<sub>3</sub> y de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> para formar 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> y 1,24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, respectivamente. La enzima 24-hidroxilasa (CYP24) es una enzima mitocondrial que catalizará la adición de un grupo hidroxil en el carbono 24 de la vitamina D. Se ha detectado expresión de la 24-hidroxilasa en riñón, intestino, hueso, placenta, piel y macrófagos. En el riñón, la PTH inhibe la expresión de 24-hidroxilasa<sup>51</sup>.

Los metabolitos de la vitamina D son moléculas lipofílicas que deben transportarse en la circulación unidas a proteínas plasmáticas. La proteína de unión a vitamina D (DBP) es la más importante de ellas, con una alta afinidad con el orden 25(OH)D<sub>3</sub> = 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> > 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> > vitamina D<sub>3</sub><sup>52</sup>.

Se ha sugerido que solo una pequeña parte de los metabolitos que no están unidos a proteínas son los que entran de forma pasiva en las células diana para ser metabolizados o para hacer su actividad biológica. Como la mayoría están unidos a DBP, esto hace que tengan un acceso limitado a las células diana<sup>53</sup>. Los niveles de DBP no están regulados por vitamina D pero están reducidos en enfermedad hepática, síndrome nefrótico y malnutrición y incrementan durante el embarazo y terapia con estrógenos. Aun así, la

concentración de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  libre permanece constante cuando los niveles de DBP varían.

La  $25(\text{OH})\text{D}_3$  se filtra libremente por el glomérulo y para que entre en las células de túbulo proximal es necesario el receptor megalina, que facilita la entrada de vitamina D unida a DBP. Una vez dentro de las células de túbulo proximal, la  $25(\text{OH})\text{D}_3$  se puede liberar para que la  $1\alpha$ -hidroxilasa la convierta en  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , ya sea para mantener la producción de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o, para reciclarla de nuevo a la sangre para mantener los niveles de  $25(\text{OH})\text{D}_3$  y que las  $1\alpha$ -hidroxilasas extrarenales la puedan convertir también en  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ <sup>54</sup> (Figura 9).

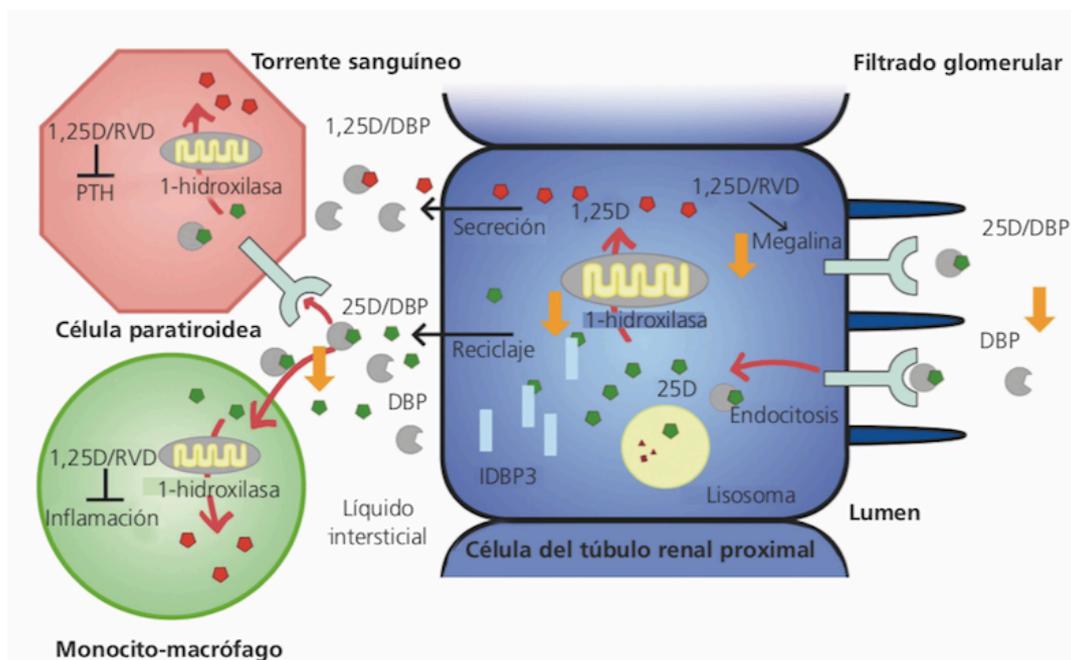


Figura 9. Mecanismo de entrada de la 25D en la célula del túbulo renal para su activación. Fuente: Bover 2015<sup>55</sup>

### 1.3.2 Receptor de la vitamina D (VDR)

La mayoría de las acciones biológicas del calcitriol se dan a través de la unión al receptor de alta afinidad, VDR, miembro de la superfamilia de receptores nucleares para hormonas esteroideas, que actúa como un factor de transcripción activado por ligando<sup>50</sup>. Cuando la vitamina D se une al receptor, se produce una heterodimerización con el receptor del ácido retinoico (RXR) y, posteriormente, este heterodímero se une a los elementos de respuesta a vitamina D (VDREs) en los promotores de los genes diana y recluta otras proteínas nucleares en el complejo transcripcional (coreguladores). Este complejo,

modula la transcripción de los genes diana, ya sea aumentando o disminuyendo su expresión (Figura 10). Entre estos genes podemos encontrar osteopontina, CYP27B1, PTH, etc.<sup>56</sup>

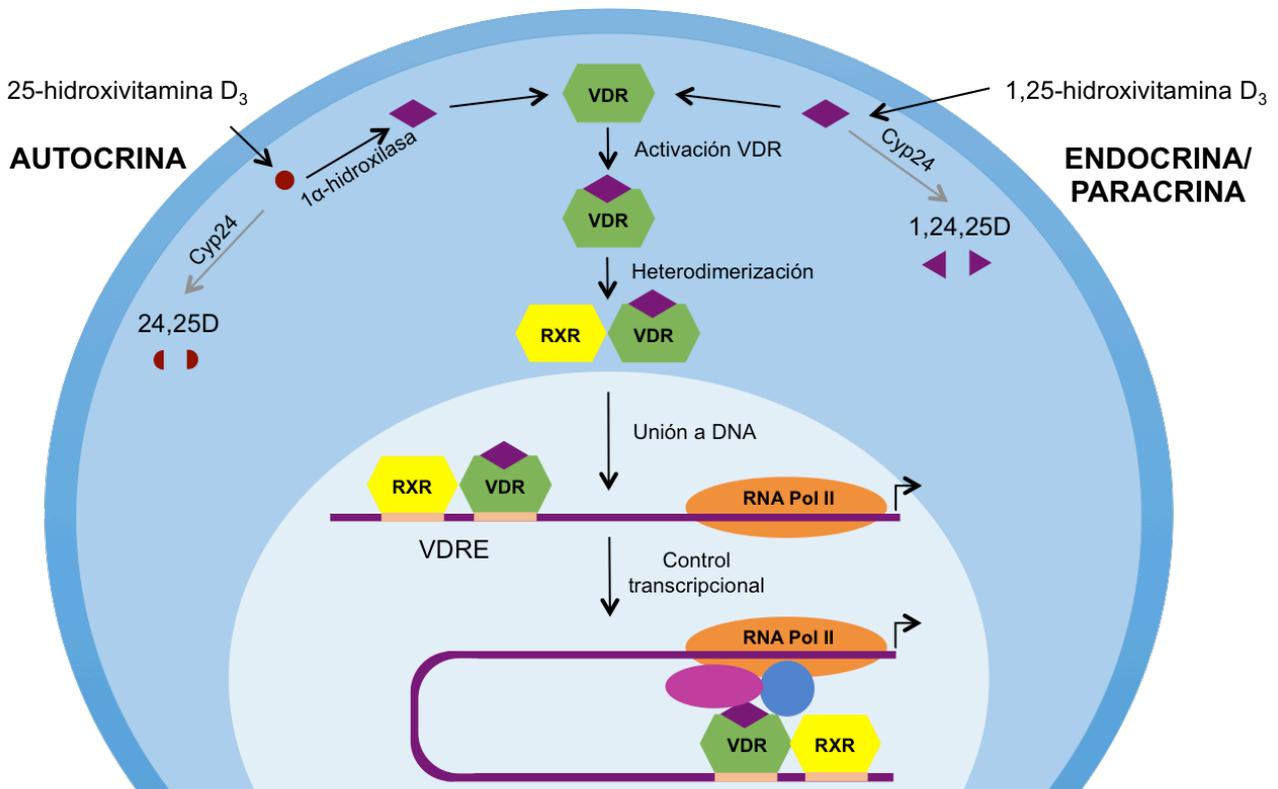


Figura 10. Heterodimerización del receptor de la Vitamina D y unión a los VDREs. Adaptado de Dusso 2005<sup>50</sup>.

La estructura del gen de VDR consta de distintas regiones (Figura 11), con funciones determinadas cada una:

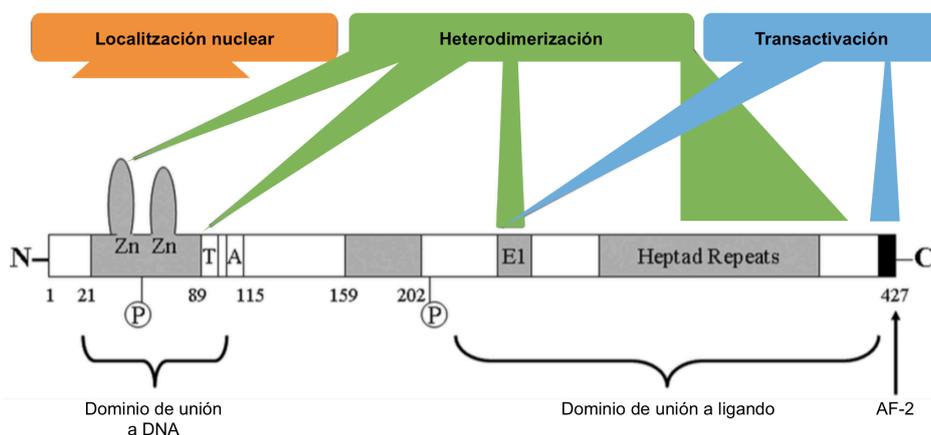


Figura 11. Dominios del gen VDR. Adaptado de Dusso 2005<sup>50</sup>.

- El *dominio de unión a ligando* (LBD): es el responsable de la unión de alta afinidad de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. En el extremo c-terminal de este, encontramos el AF-2, conocido como dominio de activación de la función 2 dependiente de ligando. Este produce el mayor

cambio conformacional de la estructura de VDR cuando se une el ligando para reclutar las proteínas responsables de su translocación del citoplasma al núcleo, como el complejo de iniciación de la transcripción (RNA polimerasa II) y coactivadores transcripcionales nucleares que promueven una remodelación de la cromatina y transcripción de genes.

-El *dominio de unión a DNA* (DBD): en la parte N-terminal, está muy conservado entre los receptores esteroideos nucleares. Formado por dos dedos de zinc, responsables de la interacción de alta afinidad con secuencias específicas de DNA en la región promotora de los genes diana para  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , nombrados *vitamin D-response elements* (VDREs). Mutaciones en la región de los dedos de zinc resultan en una unión defectuosa, asociadas con los fenotipos clínicos más severos de la resistencia a vitamina D<sup>50</sup>. En el LBD hay un clúster de cinco aminoácidos básicos entre los dos dedos de zinc, cuatro de ellos cargados positivamente. Se hipotetiza que éstos son los que hacen el contacto con el DNA, siendo además esta región, crucial para la localización nuclear del receptor. También se ha demostrado que las superficies de dimerización de VDR con RXR se encuentran en uno de los dedos de zinc<sup>57</sup>. Algunos de los genes que se ha identificado que son activados por vitamina D son osteocalcina, osteopontina,  $\beta 3$  integrina, p21, etc.

### **1.3.3 Acciones de la vitamina D**

#### **1.3.3.1 Acciones clásicas**

La vitamina D es esencial para mantener normales los niveles de calcio extracelulares juntamente con el riñón, el hueso, la glándula paratiroidea y el intestino, donde sus acciones son:

-*Intestino*: la vitamina D es necesaria para que el intestino absorba de la dieta calcio y fosfato ya que estimula los canales de calcio apicales (TRPV6 o TRPV5) para que el calcio entre en la célula; también la proteína de unión a calcio citosólico (CaBP; calbindina) que facilita los movimientos de calcio a través de la célula, y, finalmente, la ATPasa de calcio (PMCA1) presente en la membrana basolateral y el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^+$  (NCX1) que bombean calcio de la célula hacia el torrente sanguíneo<sup>58</sup>.

*-Hueso:* La vitamina D es esencial para el desarrollo y mantenimiento del esqueleto y su deficiencia produce raquitismo en animales jóvenes y osteomalacia en animales adultos. Juntamente con el VDR son necesarios tanto para la formación de hueso osteoblástico como para la resorción ósea osteoclástica. En el caso de la osteoclastogénesis, la vitamina D, regula el receptor RANK incrementando su expresión e inhibe la expresión de OPG. La interacción de RANKL con su receptor RANK promueve la maduración de las células progenitoras de osteoblastos a osteoclastos maduros. Todo esto se traduce en un aumento de la osteoclastogénesis y la actividad osteoclástica<sup>59</sup>.

*-Glándula paratiroidea:* Se sabe que el sistema endocrino de la vitamina D es un potente modulador de la función paratiroidea. Una deficiencia de vitamina D resulta en hiperplasia tiroidea y una incrementada síntesis y secreción de PTH, mientras que la administración de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inhibe la síntesis de PTH y el crecimiento de la glándula. Así, la terapia con vitamina D se ha demostrado efectiva para tratar el hiperparatiroidismo secundario de la enfermedad renal crónica<sup>60</sup>. Sin embargo, estudios posteriores son más críticos en el papel de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en el control del crecimiento celular de la glándula paratiroidea ya que en estudios con ratones deficientes para  $1\alpha$ -hidroxilasa a los que se les normalizaron de los niveles de calcio en suero, mostraron normalización de los niveles de PTH aunque no de hiperplasia<sup>61</sup>.

*-Riñón:* en el riñón el efecto de la vitamina D es controlar su propia homeostasis inhibiendo la  $1\alpha$ -hidroxilasa, estimulando la 24-hidroxilasa y induciendo la expresión de megalina en el túbulo proximal, para mejorar la reabsorción de calcio renal<sup>50</sup>. Aún así la implicación de la vitamina D en el manejo renal de calcio y fósforo continúa siendo controvertido debido al efecto simultáneo de la vitamina D en la PTH sérica y en la absorción de calcio y fósforo intestinal, los cuales afectan la tasa de filtrado de los dos iones<sup>62</sup>.

### **1.3.3.2 Acciones no clásicas**

Se ha demostrado que aparte de estas funciones clásicas, la vitamina D también tiene acciones no clásicas en otros órganos, debido a la presencia de VDR en muchos tipos celulares. Algunas de estas acciones son:

- La *regulación de la proliferación y la diferenciación celular*: en estudios de cáncer de pecho y colon se le asocia un papel protector, igual que en leucemias, donde es capaz de inhibir la proliferación de la células cancerígenas y estimular la diferenciación celular<sup>63,64</sup>.

-La *regulación de la apoptosis*: puede tener efectos tanto proapoptóticos como antiapoptóticos, importantes en el desarrollo y función normal del tejido y también en la inhibición del crecimiento en distintos canceres<sup>50</sup>.

- Capacidad de *modular la respuesta inmune*: controlando infecciones, enfermedades autoinmunes y una mejor tolerancia al trasplante, que se atribuye a los efectos pro-diferenciadores de los monocitos-macrófagos, células presentadoras de antígeno, células dendríticas y linfocitos<sup>50</sup>.

- *Potencial terapéutico en la piel*: en lesiones psoriásicas se ha visto una mejora con tratamientos con vitamina D. El complejo vitamina D-VDR es esencial para el desarrollo normal de la piel y el pelo<sup>65</sup>.

- *Inhibe el sistema renina-angiotensina*: se ha encontrado una asociación entre los niveles de vitamina D, la presión arterial y la actividad de la renina en plasma. Ratones sin VDR tienen incrementos en la expresión de renina y angiotensina II plasmática que causan hipertensión e hipertrofia cardíaca<sup>66</sup>.

#### **1.3.3.2.1 Vitamina D y calcificación vascular**

Algunas de estas funciones no clásicas de la vitamina D se han estudiado en el sistema cardiovascular y, específicamente en las CMLV, células de principal interés en este trabajo, ya que se ha demostrado que la vitamina D está muy implicada en la salud cardiovascular en los enfermos renales.

Algunos enfermos, se caracterizan por presentar disfunción arterial que implica una disminución de la distensibilidad arterial, la cual se puede atribuir tanto a una disfunción de las células endoteliales como de las CMLV. Ambos tipos celulares tienen capacidad de respuesta a vitamina D y además pueden sintetizar vitamina D a nivel local. Esto nos hace pensar que la vitamina D puede tener un papel importante en la función arterial.

En las CMLV se ha descrito que los niveles de VDR están sobre regulados por 1,25D, ya que la 1,25D aumenta los niveles de mRNA y proteína, indicando que la vía de VDR es totalmente funcional en estas células<sup>67</sup>. Sus acciones en las CMLV son promover una proliferación excesiva y calcificación, cosa que provoca rigidez en la arteria<sup>45</sup>. Sin embargo, el papel de la vitamina D en la proliferación de las CMLV es un tema de debate constante, ya que muchos estudios muestran como la vitamina D aumenta la proliferación de las CMLV<sup>67,68</sup>, mientras que otros que afirman lo contrario<sup>69</sup>.

Igual pasa en su papel en la calcificación vascular, el cual ha estado ampliamente estudiado. En los primeros trabajos se demostró que altas dosis de vitamina D incrementaban la calcificación de la túnica media de las arterias<sup>14,25</sup>. *Jono et al.* ya postularon que la vitamina D podría tener un efecto directo en las CMLV, estimulando el flujo de calcio al interior. Comprobaron que excesos de vitamina D inducían calcificación vascular tanto en animales de experimentación como en células humanas. Además, apuntaron que las CMLV tienen un sistema autocrino/paracrino que regula el metabolismo del calcio y que la vitamina D afecta a este sistema local para estimular su acción en la calcificación vascular<sup>25</sup>. A pesar de eso, hay otros estudios que muestran una relación inversa entre los niveles de calcitriol y la calcificación vascular<sup>14</sup>.

En la primera situación, en casos de altos niveles de vitamina D, esta promueve la calcificación a través del aumento de los niveles de calcio y fosforo libres, y un aumento del producto CaxP. Por otro lado, en CMLV bovinas *in vitro* se ha descrito que la vitamina D induce directamente la mineralización vía VDR de una forma dosis-dependiente. Así, altos niveles de vitamina D inducen el cambio fenotípico de las CMLV, ya que empiezan a expresar marcadores osteoblásticos, (Runx2, osterix, Ocn, BMP2 y OPN) e incrementan la actividad fosfatasa alcalina<sup>25,14,70</sup>. Además, otros estudios sugieren, que aumentos de vitamina D estimulan la expresión de metaloproteasas (MMPs), conocidas promotoras de la calcificación<sup>71</sup>.

En el estudio de *Jono et al.* en CMLV bovinas, se demostró que la vitamina D incrementaba de forma dramática la expresión de OPN (que presenta un elemento de respuesta a vitamina D) solo en las CMLV calcificadas. Este estudio concluye que las dosis farmacológicas de vitamina D estimulan la calcificación vascular con un efecto directo en las CMLV<sup>25</sup>.

*Han et al.*, posteriormente, demostraron que hay una cooperación funcional entre VDR y Runx2, en la regulación mutua de sus expresiones, de la expresión de genes

osteogénicos y en la deposición mineral en calcificación vascular. Describen que en modelos de ratón KO para VDR o Runx2 la calcificación vascular está disminuida sin incrementos en la expresión de marcadores osteoblásticos en las arterias<sup>70</sup>.

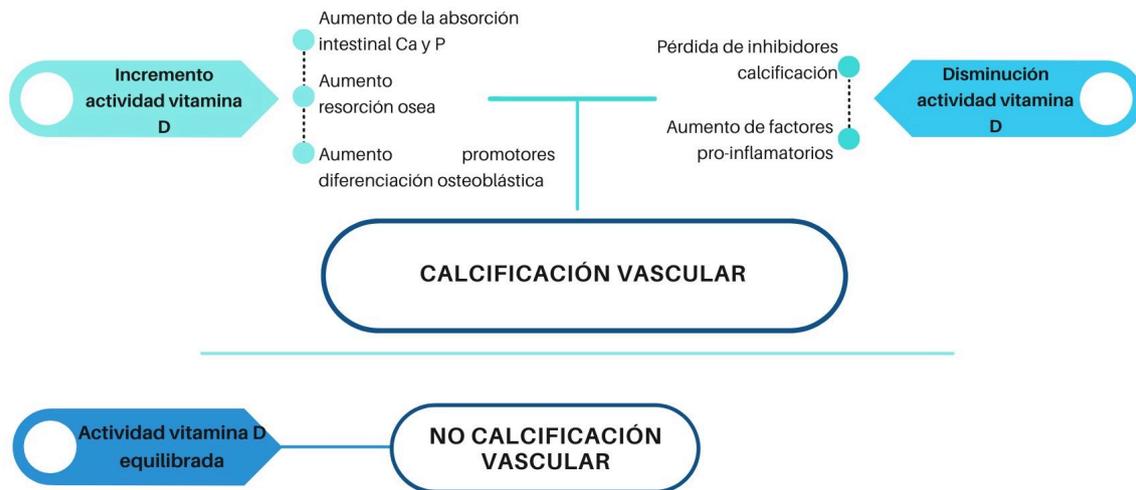
Además, Runx2 se ha encontrado que también regula la transcripción de OPN en algunos tipos celulares mediante la interacción sinérgica con VDR<sup>72</sup>.

Por todo esto, el modelo de ratón con calcificación vascular inducida por vitamina D es considerado uno de los modelos más robustos de calcificación. Así, dosis de 500.000 IU/kg/día pueden producir calcificación severa de la túnica media de la aorta tras 7 días de tratamiento<sup>73</sup>.

Por otro lado, se ha comprobado que la deficiencia de vitamina D también es un estímulo deletéreo para eventos de calcificación vascular. En modelos de rata urémica se ha detectado calcificación en la túnica media de las arterias aun con bajos niveles de calcio y vitamina D<sup>74</sup>. Los mecanismos por los cuales la deficiencia de vitamina D promueve también el desarrollo de la calcificación vascular no están claros, pero se han descrito unos niveles incrementados de los factores pro-inflamatorios como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleukina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleukina-6 (IL-6) y la vía de señalización Msx2-Wnt, que contribuyen a la mineralización vascular y la resorción ósea<sup>75,76,77</sup>. Además se pierde la inhibición del proceso de diferenciación osteogénica ya que, por ejemplo, niveles normales de vitamina D reducen la expresión de Runx2<sup>77</sup>.

Los resultados clínicos refuerzan la idea que los niveles de vitamina D fisiológicos son necesarios para prevenir la activación de mecanismos procalcificantes, y su perturbación con un exceso de suplementación o disminución llevan a la patogénesis, indicando el doble impacto de la vitamina D en la vasculatura<sup>76</sup>.

También es importante destacar que los niveles de vitamina D plasmática pueden no reflejar los niveles vasculares, dado que los dos tipos de células de las arterias tienen capacidad de sintetizarlo. Así, los niveles de vitamina D arterial pueden ser más altos que los circulantes, debido a una activación de la síntesis local<sup>45</sup>.



**Figura 12. Efectos del aumento o disminución de los niveles de la vitamina D en la calcificación vascular.**  
*Fuente: Elaboración propia.*

---

## 1.4 MicroRNAs

---

Los microRNAs son pequeñas moléculas de RNA procesados a partir de regiones de RNA más largas que son capaces de regular el procesamiento postranscripcional del RNA, gracias al apareamiento de bases con el mRNA complementario. Aproximadamente el 30% de los genes humanos están regulados por mecanismos que dependen de microRNAs<sup>78</sup>. Un solo microRNA puede regular unos 200 mRNA involucrados en distintas vías de la célula y, además, un transcrito de mRNA puede ser regulado por varios microRNAs<sup>79</sup>.

Los microRNAs pueden controlar muchos procesos celulares, intervienen en procesos de tumorigénesis como inflamación, regulación del ciclo celular, diferenciación, respuesta a estrés, invasión y apoptosis. Además también pueden regular la hematopoyesis, cardiogénesis, diferenciación osteogénica, etc.<sup>80</sup>

### 1.4.1 Síntesis y procesamiento

En la biogénesis y procesamiento de los microRNAs (*Figura 13*) podemos diferenciar la vía canónica de generación de microRNAs, pero también se han descrito otras vías alternativas, llamadas no canónicas, aunque el producto de estas últimas no cumplirían la definición de microRNAs.

Si nos fijamos en la vía canónica, el proceso para la formación de los microRNAs, se inicia con la transcripción del DNA genómico. La RNA polimerasa-II es la responsable de la transcripción de los miRNAs primarios o pri-miRNAs, los cuales tienen una estructura en forma de bucle que será reconocida por el complejo microprocesador formado por una molécula de RNase II Drosha y el cofactor DGCR8, y este generará el pre-miRNA<sup>81</sup>.

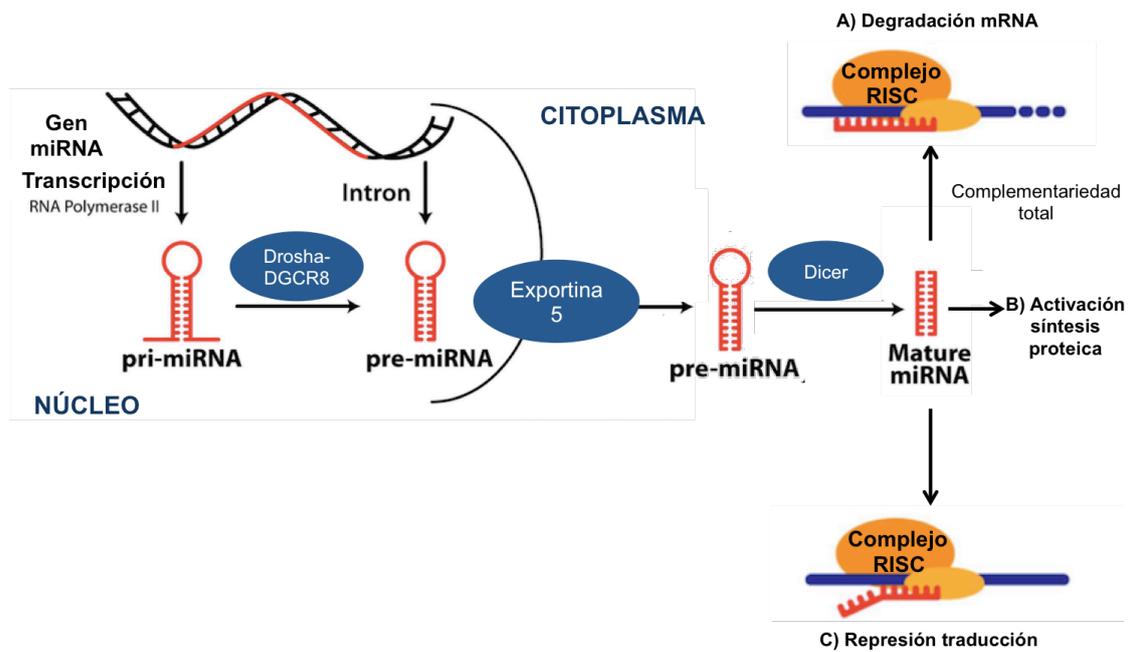


Figura 13. Síntesis y procesamiento de los miRNAs. Adaptado de Ryan 2015<sup>82</sup>

Estos pre-miRNAs pasan del núcleo al citoplasma a través de la exportina-5 y una vez en el citoplasma son reconocidos por el complejo de procesamiento formado por Dicer y TRBP (*TAR RNA-binding protein*) y la proteína quinasa activadora dependiente de ARN de cadena doble inducible por interferón PRKRA (*protein kinase interferon-inducible double stranded RNA dependent activator*). Este complejo eliminará el *loop* característico del pre-miRNA generando un dúplex de microRNA maduro de unos 21-26 nucleótidos, formado por una cadena madura de microRNA y su cadena complementaria<sup>83</sup>.

Posteriormente, este dúplex interactúa con la proteína Argonauta (AGO) 2 y formarán el complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*). Una cadena del dúplex será eliminada de AGO, mientras que la otra será la cadena madura o guía, responsable de dirigir el silenciamiento, uniéndose a la región 3'UTR del mRNA diana<sup>81</sup>.

En función de la complementariedad perfecta o incompleta de la cadena del miRNA con su mRNA, inducirá la degradación del mRNA (cuando es perfecto) o reprimirá la traducción si es parcial<sup>84</sup>. Además también se ha visto recientemente que también pueden aumentar la activación de estos mRNAs<sup>85</sup>.

La complementariedad de bases entre el miRNA y su diana ocurre principalmente a través de la región de siembra del miRNA, que va del segundo al octavo (2-8) nucleótido del extremo 5' del miRNA y la secuencia complementaria del extremo 3'UTR del mRNA<sup>86</sup>.

A parte de esta región, se ha visto que los 6-mers de las posiciones 4-9 a 5-10 fueron también de los más enriquecidos en un estudio de complementariedad, aunque se encuentran fuera de la región de siembra canónica, por esto los nucleótidos del 4-10 de los miRNAs se han considerado como la región de siembra extendida, ya que se unen con los sitios diana de los genes con ratios similares a los de las regiones de siembra canónicas<sup>87</sup>.

Hay evidencias que los miRNAs pueden mantenerse de forma estable en fluidos del cuerpo, incluida la saliva, orina, leche materna y sangre. Pueden estar empaquetados en exosomas o microvesículas, también mediante lipoproteínas de alta densidad (HDL) o unidas a AGO2. De las tres formas se protegen de la degradación y se garantiza su estabilidad. Pueden reflejar el tejido o célula de origen mediante ciertas proteínas de superficie específicas. Por esto, los miRNAs exosomales muestran un buen potencial como biomarcadores no invasivos de enfermedades<sup>88</sup>.

#### 1.4.2 miRNAs y calcificación vascular

En los últimos años, ha sido ampliamente estudiado el papel de los microRNAs en la disfunción cardiovascular para identificar dianas terapéuticas, así como prevenir o tratar las enfermedades vasculares<sup>89</sup>. Parece que los miRNAs juegan un papel importante en la rigidez arterial y la calcificación a través de la modulación de vías críticas y moléculas como TGF- $\beta$ 1, BMP, Ang II, MMP, Runx2, entre otras.

Algunos microRNAs que se ha descrito que promueven la calcificación vascular son, por ejemplo, el **mir-21**, que está regulado positivamente por OPN y provoca un incremento de fibrosis, mediante la disminución de PTEN y SMAD7, mientras que incrementa las vías de señalización de ERK y AKT<sup>90</sup>. *Mackenzie et al.* también postularon que el **mir-221** y **mir-222** promueven la calcificación y la diferenciación osteoblástica mediante la regulación de Pit1<sup>91</sup> y descensos del **mir-297a**, según *Zheng et al.* provocan un aumento de FGF-23, lo cual también favorece la calcificación<sup>92</sup>. En CMLV de rata, una sobreexpresión del **mir-29b** resultó en una disminución de los niveles de la proteína MMP2 y esto llevó a una disminución de la calcificación vascular<sup>93,94,95</sup>. Aunque, contrariamente, también se ha descrito que, mir-29b se encuentra sobreexpresado durante la diferenciación osteoblástica, promoviendo la osteogénesis mediante la regulación negativa directa de

varios inhibidores de la diferenciación osteoblástica (ACVR2A, CTNNBIP1 y HDAC4)<sup>96</sup>. Se han detectado niveles circulantes incrementados en ERC del **mir-146a**,<sup>97</sup> y se lo ha relacionado con la aterosclerosis y osteoclasteogenesis<sup>98</sup>. *Liu et al*<sup>99</sup> demostraron que el **mir-32** incrementa la calcificación en CMLV de ratón induciendo la expresión de BMP2, Runx2, OPN, MGP y ALP mediante la inhibición de la actividad PTEN y, consecuentemente activando PI3K-Akt. Finalmente, el **mir-3960** y **mir-2861**, se ha confirmado que directamente inhiben HDAC5 (*histone deacetylase*) y Hoxa2 (Homeobox A2), respectivamente, para incrementar los niveles de Runx2 en las CMLV. Tanto HDAC5 como Hoxa2 reprimen la expresión de Runx2 en condiciones normales<sup>100</sup>.

Por otro lado, también hay microRNAs que influirán positivamente para prevenir la calcificación vascular. En primer lugar el **mir-145** y **miR-143** están considerados de los miRNAs más importantes que afectan el cambio de fenotipo de las CMLV regulando factores de transcripción cruciales, incluyendo KLF4 y Myocd. Su deficiencia regula negativamente el tono vascular y promueve un cambio de las CMLV a un fenotipo desdiferenciado<sup>101</sup>. Se ha descrito que el mir-145 promueve el fenotipo diferenciado de las CMLV, la expresión de genes contráctiles como  $\alpha$ -SMA y disminuye la rigidez arterial inhibiendo la señalización por TGF- $\beta$ <sup>102</sup>. La exposición de CMLV humanas a niveles patofisiológicos de fosfato inorgánico (Pi) disminuye la expresión de mir-143 y mir-145<sup>93</sup>. De forma parecida, el **miR-135a**, es un potencial supresor de la diferenciación osteogénica ya que también reprime KLF4<sup>103</sup>. Por otro lado, el **miR-125b** modula la calcificación arterial regulando el factor de transcripción sp7 (osterix) ya que se ha comprobado que la inhibición de éste incrementa Runx2 y promueve la transdiferenciación osteoblástica<sup>104,105</sup>. De la misma forma, el **mir-133a**, **mir-204** y **mir-20** son también reguladores negativos de la diferenciación osteogénica de las CMLV ya que también impiden la calcificación inhibiendo Runx2<sup>106,107</sup>, al igual que **mir-30b-c**<sup>108</sup>. Por otro lado, el **mir-155** promueve un fenotipo proliferativo de las CMLV regulando negativamente la expresión de eNOS<sup>109</sup> y además inhibe la vía de señalización por BMP y el sistema renina-angiotensina<sup>93</sup>. Este microRNA se encuentra disminuido en aortas torácicas de ratas con ERC comparadas con ratas normales<sup>110</sup>. El **mir-18a** promueve el fenotipo contráctil e incrementa las proteínas  $\alpha$ -SMA y SM22a inhibiendo el gen diana syndecan4<sup>111</sup>. Finalmente el **mir-29a/b** también disminuye la calcificación de las CMLV reprimiendo ADAMTS-7<sup>112</sup>.

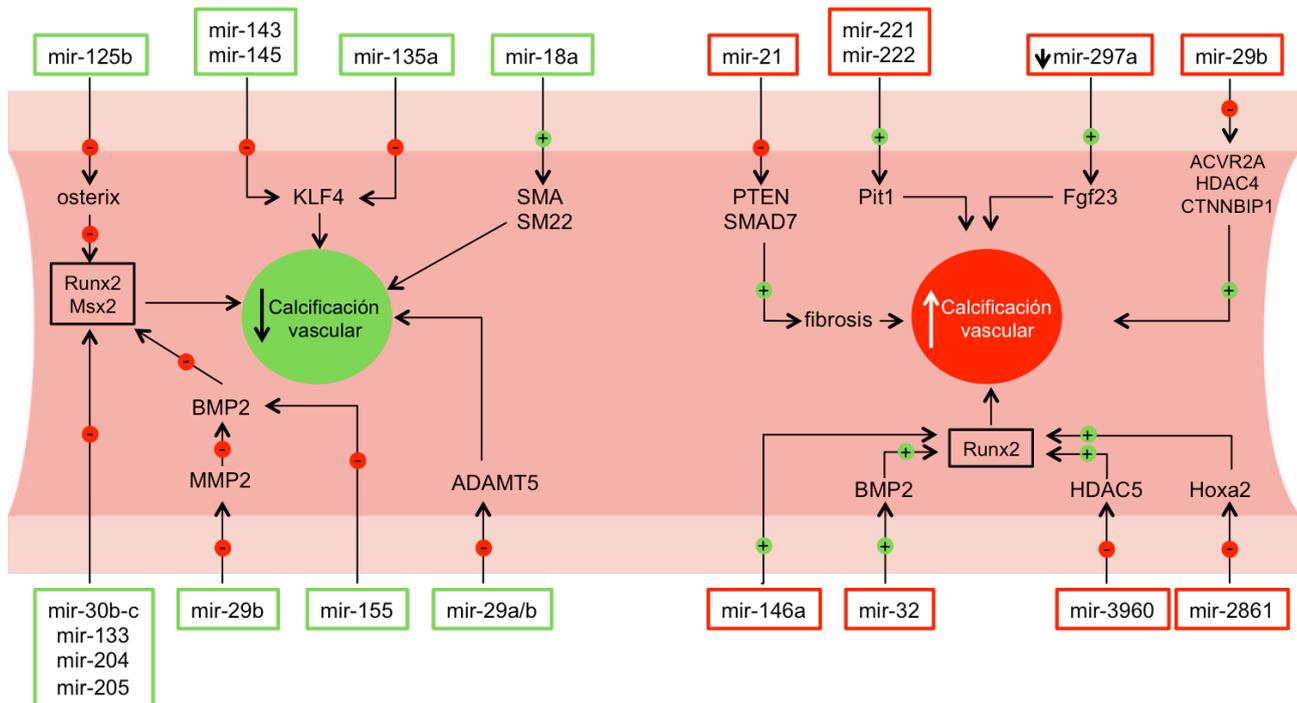


Figura 14. microRNAs involucrados en el proceso de calcificación vascular. Fuente: Elaboración propia

### 1.4.3 miRNAs regulados por VDR

Des del descubrimiento de los microRNAs, se ha considerado VDR como un potente regulador de estos non-coding RNA, aunque los sitios diana de unión de VDR difieren significativamente en función de los tipos celulares<sup>113</sup>. Hay varios mecanismos por el cual VDR puede regular los miRNAs, ya sea mediante la regulación de la maquinaria de procesamiento de miRNAs por los agonistas de VDR (VDRAs), como se ha demostrado entre calcitriol y Dicer<sup>114</sup>, o mediante el control transcripcional directo por la unión del heterodímero VDR/RXR a secuencias específicas del DNA en el promotor del gen, que se llaman *vitamin D response elements* (VDREs), regulando así, la maduración de los miRNAs<sup>115,116,117</sup>.

Un 3-5% de los genes humanos están regulados por la vitamina D directa o indirectamente, y esto incluye los miRNAs, que tienen un papel muy importante en las enfermedades, sobretodo en el desarrollo de cánceres<sup>116</sup>, dado que la regulación de los microRNAs por VDR es importante para el control del crecimiento celular. En varios tipos de cánceres como próstata, colon, pulmón, ovario, pecho, melanoma y leucemia se ha confirmado que los miRNAs están regulados por 1,25D<sup>118</sup>. Se han descrito muchos efectos antitumorales, por ejemplo en las células del estroma de próstata, dónde han

identificado que los **mir-126**, **miR-154** y **miR-21** contribuyen en la actividad anti-tumoral de la vitamina D regulando directa o indirectamente genes involucrados en la carcinogénesis<sup>119</sup>. *Huang et al.* confirmaron que el **miR-145** estaba inducido por vitamina D en células de cáncer gástrico y mediaba los efectos antiproliferativos y de regulación de genes por vitamina D, en estas células. Por lo cual, el miR-145 puede ser una diana terapéutica para el tratamiento de este cáncer<sup>116</sup>. Por otro lado, *Díaz et al.*, también en cáncer gástrico, describieron como dianas de la vitamina D el **mir-146a**, **miR-22**, **miR-222** y **miR-203** ya que detectaron variaciones en estos como consecuencia de la acción de la vitamina D<sup>120</sup>.

En la colangitis biliar primaria, *Milkiewicz et al.*, postularon que como resultado de una reducción de la expresión de VDR, no hay un feedback de inhibición negativo y se inicia una respuesta inflamatoria. Esta está causada por un aumento en la expresión del **miR-155** que lleva a una supresión excesiva de SOCS1 (supresor de la señalización de citoquinas)<sup>121</sup>.

*Panizo et al.* analizaron algunos miRNAs relacionados con el proceso fibrótico, para estudiar cómo podían estar implicados en la prevención de la fibrosis de miocardio mediada por VDR. Demostraron que el mantenimiento de los niveles de expresión cardiacos de **miR-29b** y **mir-30c** con tratamiento con VDRA puede contribuir a los efectos antifibróticos de estos activadores en la fibrosis cardiaca inducida por uremia. Además, detectaron una expresión reducida del miR-29b y miR-30c en corazones de ratas con fallo renal crónico. Algunos de los genes diana para mir-29b son colágeno tipo I y IV y MMP-2, entre otros. Por lo tanto los agonistas de VDR pueden regular la transcripción de miRNAs, convirtiéndolos en unos potenciales agentes terapéuticos<sup>122</sup>.

Se conoce poco de la interacción entre 1,25D y miRNAs en las células del hueso. *Lisse et al.* en su estudio identificaron el **miR-637** capaz de mediar una respuesta regulatoria de la vitamina D en osteoblastos, ya que a través de este, VDR es capaz de controlar los niveles de osterix<sup>123</sup>. *In vitro*, el **miR-542** suprime la diferenciación osteogénica y promueve la apoptosis de los osteoblastos vía BMP7/PI3K; *in vivo*, este inhibe la formación del hueso<sup>124</sup>. También se ha visto que el **miR-335** modula la vía de señalización Wnt y promueve la osteogénesis actuando sobre el inhibidor de Wnt directamente, DKK1<sup>125</sup>.

Aunque hay numerosos estudios, los miRNAs no están bien caracterizados en células óseas y los mecanismos de las interacciones con VDR durante el desarrollo del hueso no están del todo descritos. Además, *Zhao et al.* también encontraron que tres microRNAs

(**miR-146b**, **miR-140** y **miR-322**) respondían a la estimulación con vitamina D. El mir-146b está involucrado en desordenes relacionados con el hueso, el mir-322 tiene un papel vital en la diferenciación osteoblástica y el mir-140 se expresa en células involucradas en el desarrollo del hueso<sup>15</sup>. No hay estudios que relacionen la modulación de microRNAs por VDR en CMLV en el proceso de calcificación vascular.



2

Hipótesis y

objetivos



La calcificación vascular es una complicación importante en pacientes con enfermedad renal crónica. Las CMLV tienen un papel fundamental en este proceso ya que supone la transdiferenciación de estas a un fenotipo con características osteogénicas. La vitamina D u otros componentes que se unen y activan el VDR son comúnmente usados para prevenir el hiperparatiroidismo secundario que ocurren en la ERC. Debido a la presencia de VDR en las CMLV, la vitamina D juntamente con su receptor, se han postulado como una de las mayores causas que pueden promover la calcificación vascular. Nuestra hipótesis se basa en que la eliminación del VDR en las CMLV protege en frente la calcificación vascular (CV) en ERC. Por lo que definimos los siguientes objetivos:

1. Investigar la expresión de VDR en arterias calcificadas de humanos y ratones afectados con ERC.
2. Generación del ratón *knock out* condicional para VDR en CMLV e investigación del papel de VDR en el desarrollo de calcificación vascular en ERC *in vivo*.
3. Analizar el efecto de la ausencia del VDR en CMLV en la calcificación vascular *in vitro*.
4. Investigar la implicación de ciertos microRNAs en la calcificación vascular mediada por VDR *in vivo* e *in vitro*.



3

Materiales y

métodos



---

### 3.1 Estudio *In Vivo*

---

Todos los experimentos con animales fueron previamente aprobados por el Comité de Ética Animal de la Universidad de Lleida acorde con la guía del Consejo Europeo de Investigación para el cuidado y uso de animales de laboratorio y siguiendo las directrices legales estatales y autonómicas:

- *Real Decreto 53/2013*, 1 de febrero, de normas básicas aplicables para la protección de animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.
- *Ley 6/2013*, de 11 de junio, es la modificación de la ley 32/2007 de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.
- *Ley 5/1995*, 21 de junio de la Generalitat de Catalunya para la protección de animales usados en experimentación y otras finalidades científicas.
- *Decret 214/1997*, 30 julio, que desarrolla la ley anterior, modificado mediante dos decretos posteriores 286/1997 y 164/1998.

Los estudios con muestras humanas se han realizado de acuerdo con la Declaración de Helsinki y las leyes nacionales y locales (*Ley 14/2007* y *Real Decreto 1716/2011*). El procedimiento del estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital Universitario Central de Asturias y todos los participantes firmaron el consentimiento informado antes de su inclusión en el estudio, dando así permiso para el uso de forma anónima de sus datos médicos para investigación.

#### 3.1.1 Muestras de arterias epigástricas humanas

El estudio incluye muestras de arterias de ocho pacientes con ERC y nueve donantes con función renal normal, no fumadores y sin diabetes ni enfermedad vascular. Las muestras de arterias se obtuvieron durante el procedimiento de trasplante (en el caso de los pacientes con ERC) o durante la extracción del órgano en el caso de los donantes, después de firmar el consentimiento informado.

### 3.1.2 Mantenimiento y cría de los ratones

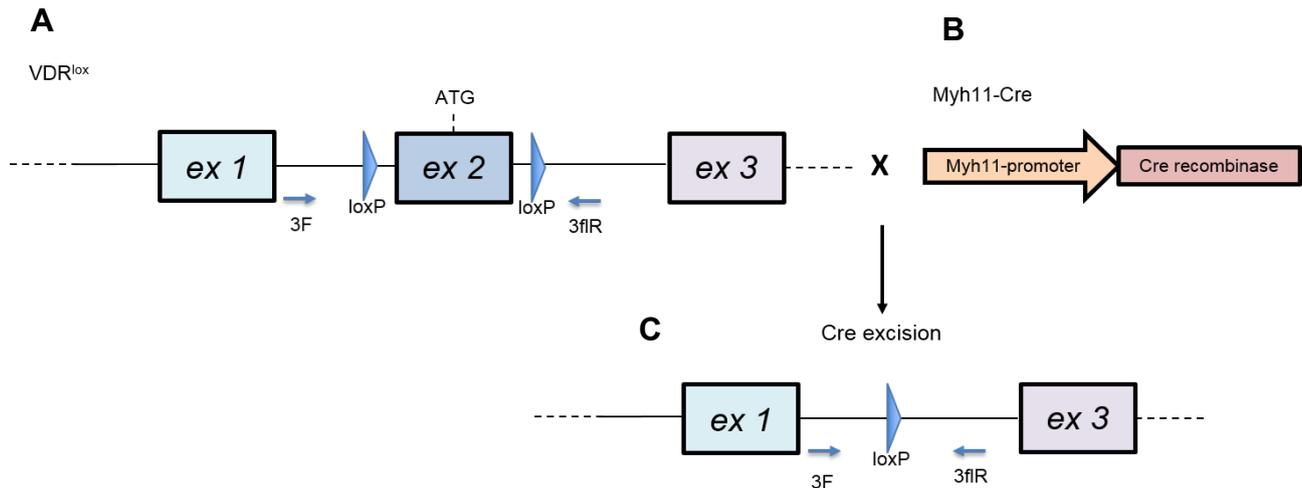
Los ratones se estabularon en el área convencional del animalario de roedores de la Universitat de Lleida. Disponían de comida y agua *ad libitum* y estaban sometidos a un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad a 20°C y humedad del 50%. Durante los primeros meses la dieta era la estándar para roedores (0,6% calcio, 0,8% fósforo y 0,6 UI/g vitamina D3 con 2,9 kcal/g) de *Harlan Teklad*.

En el caso de los ratones VDRko, usados en los experimentos *in vitro*, con un fondo genético B6CBA fueron cruzados más de 8 veces con ratones C57BL/6J y desde entonces se ha mantenido la colonia por más de 12 años. Los VDRko fueron alimentados con una dieta de rescate con alto calcio y fósforo (TD-96348, 20% lactosa, 2% Ca, 1,25% P; *Harlan Teklad, Madison, WI; USA*) para prevenir la hipocalcemia. Se usaron ratones machos de dos meses y sus correspondientes controles VDRwt, como grupo control en los experimentos *in vitro*.

### 3.1.3 Generación del modelo murino KO condicional de VDR en CMLV

El modelo usado en la parte *in vivo* de este estudio fue un ratón *knock out* (KO) condicional de VDR, específico para células de músculo liso vascular (Myh11-CreVDR<sup>lox/lox</sup>). Se obtuvo cruzando hembras con un fondo genético Swiss129 y el gen de VDR floxeado (VDR<sup>lox/lox</sup>) (generados por *Geert Carmeliet et al.*; Universidad de Leuven<sup>126</sup>) con machos Myh11-CreER<sup>T2</sup> con fondo genético C57BL/6J proporcionados por el Departamento de Biología Vascular e Inflamación del CNIC.

La Cre-recombinasa (CreER<sup>T2</sup>) en estos ratones (solo machos) se encuentra debajo el control del promotor de la cadena pesada 11 de la miosina de músculo liso (Myh11-CreER<sup>T2</sup>) y, por esto, solo estará activa en las células de musculo liso vascular<sup>127</sup>. En estas, detectará las secuencias LoxP que se han introducido en el genoma de los ratones, concretamente en el gen de VDR y se producirá la recombinación para finalmente eliminar el exón 2 del gen de VDR. Por lo tanto, solo habrá eliminación de la parte del gen localizada entre dos sitios loxP, en este caso VDR, en el tejido donde se expresa la enzima Cre-recombinasa que se induce al inyectar *Tamoxifen* en el animal (*Figura 15*).



**Figura 15. Inactivación específica del gen VDR en las CMLV.** a) representación esquemática de los exones 1-3 e intrones del alelo VDR con el exón 2 floxeado, b) construcción diana en el promotor de la cadena pesada de la miosina (Myh11-promoter), c) Alelo VDR después de la escisión del exón 2. Adaptado de Tomer Meir et al, 2009.

De esta forma, podemos controlar el tejido y el tiempo en el que se produce la eliminación del gen diana y, al eliminar VDR en edad adulta, evitamos que la falta de este gen durante el desarrollo celular pueda ocasionar otros problemas y alteraciones en otras vías metabólicas. En este caso solo los machos son portadores de la Myh11-Cre-ER<sup>T2</sup>, por esto, los ratones usados en el experimento son solamente machos.

Realizando los cruces necesarios entre heterocigotos, obtuvimos los ratones machos con los genotipos necesarios para el estudio Cre<sup>+</sup> VDR<sup>wt/wt</sup> y Cre<sup>+</sup> VDR<sup>lox/lox</sup>.

VDR fue eliminado de las CMLV usando el sistema CRE-loxP recombinasa inducido por *Tamoxifen* (1,5 mg/día durante 5 días), en ratones de dos meses de edad. Los dos genotipos usados para el experimento (Cre<sup>+</sup> VDR<sup>wt/wt</sup> y Cre<sup>+</sup> VDR<sup>lox/lox</sup>) fueron inyectados con *Tamoxifen* y, los controles fueron grupos de cada genotipo sin *Tamoxifen*.

### 3.1.4 Generación del ratón reportero Myh11-creER<sup>T2</sup> mT/mG

Para confirmar la actividad Cre-recombinasa específica de tejido se usó un ratón reportero, obtenido mediante el cruce del ratón con la Cre recombinasa específica de tejido (Myh11-creER<sup>T2</sup>) con el ratón reportero mT/mG (Gt(ROSA)26Sortm4<sup>(ACTB-tdTomato,EGFP)<sup>Luo/J</sup></sup>) proporcionado por el laboratorio de Patología Oncologica del IRBLleida. La característica del ratón doble-fluorescente mT/mG (Muzumdar et al., 2007) es que contiene un casete de expresión en el cual se insertó la proteína de membrana tdTomato (mT) y una cola de poliadenilació (pA) flanqueadas por secuencias LoxP. El resultado son animales que expresan mT en todas sus células de forma constitutiva pero cuando se activa la Cre recombinasa este casete será eliminado y permitirá la expresión de la proteína de membrana verde EGFP (mG). Así, en los tejidos donde tiene acción la Cre-recombinasa (activada por *Tamoxifen*) podemos detectar una fluorescencia verde y en los que no actúa continua siendo roja después de inyectar *Tamoxifen* (Figura 16).

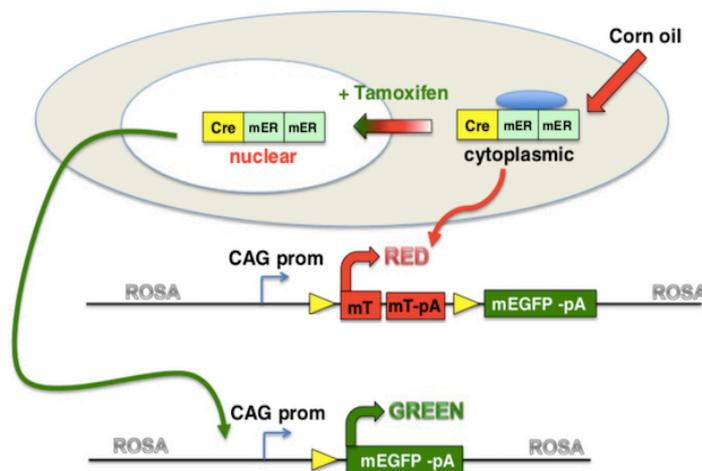


Figura 16. Representación esquemática del ratón reportero mTmG. Adaptado de Stefen Offermans 2014.

Para activar la Cre recombinasa, los ratones se trataron con *Tamoxifen* durante cinco días (1,5 mg/día)<sup>128</sup> y un mes y medio después de las inyecciones los animales fueron sacrificados.

#### 3.1.5 Genotipado de ratones

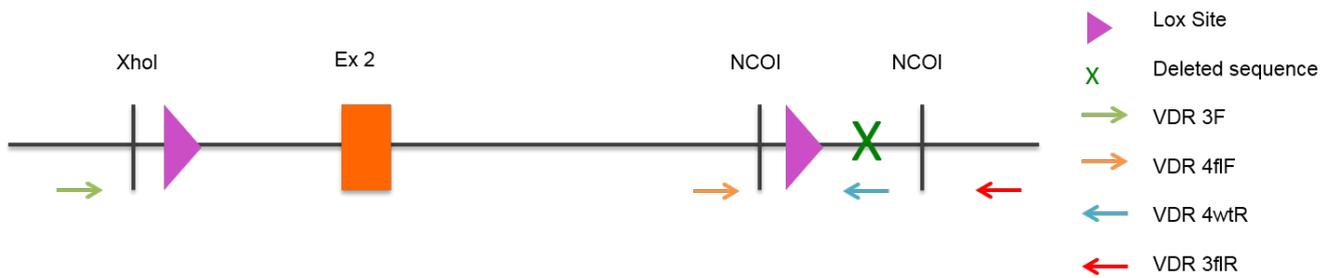
A los veintiún días de edad, ya podemos determinar el sexo de los ratones y genotiparlos. Para genotiparlos es necesario aislar el DNA genómico de las colas de los ratones. Se cortó un trozo pequeño de la cola de cada ratón y los ratones se marcaron mediante cortes en las orejas, siguiendo siempre el mismo patrón de marcaje para poderlos identificar posteriormente.

Las colas se digirieron con una mezcla de proteinasa K (*Sigma-Aldrich*) a 1 mg/ml y Buffer de genotipado (100 mM Tris pH 8,5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,2%SDS) a 45°C durante toda la noche. El día siguiente se centrifugaron las muestras a máxima velocidad y 4°C durante 10 minutos y seguidamente se recuperó el sobrenadante. A continuación, se precipitó el DNA con 500 µl de etanol 100% frío, se invirtió el eppendorf una docena de veces hasta observar los hilos de DNA y seguidamente se centrifugo durante 10 minutos a máxima velocidad a 4°C. Finalmente, se eliminó el sobrenadante por decantación, se dejó secar el pellet durante 15 minutos y seguidamente se resuspendió con 500 µl de agua MQ.

Una vez finalizada la extracción de DNA de cada ratón, se determina el genotipo de cada uno para VDR mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Sabemos que todos los ratones machos serán positivos para el gen de Myh11-CreERT2, pero para confirmar que son transgénicos para el gen de la Cre inducible específica de musculo liso vascular, realizamos la PCR correspondiente. En la cual podremos detectar dos bandas (de 200 y 300 bp) en el caso que sea positiva o solo una si es negativa (200 bp).

En el caso del gen VDR podemos encontrar distintos genotipos y por ello hay que realizar las distintas PCRs de VDR. Es necesario tener en cuenta la construcción del gen con las dianas de restricción (*Figura 17*). Al generar el alelo VDR lox un pequeño fragmento de DNA fue eliminado por la existencia de dos sitios de restricción NCOI, cercanos uno del otro (fueron usados para insertar los sitios loxP)<sup>129</sup>. Este fragmento (X) es suprimido en el alelo VDR lox pero continua presente en el alelo VDR wt.



**Figura 17. Construcción del exón 2 del gen VDR con los sitios LoxP introducidos y ubicación de los cebadores utilizados. Adaptado de Tomer Meir et al, 2009.**

Para la detección de cada banda tenemos que tener en cuenta:

- Detección banda *wild type*: se basa en la presencia de los fragmentos flanqueados por NCOI en el alelo WT. VDR4fIF y VDR4wtR son los cebadores necesarios para amplificar esta banda *wild type*. En los ratones floxeados esta no se detecta porque ha desaparecido. Obtenemos un producto de PCR de 368 bp.
- Detección de la banda lox: La ausencia del fragmento flanqueado por NCOI en el alelo lox es el que se usa para detectar la banda lox en la PCR. Los cebadores que se usan son nombrados VDR4fIF y VDR3fIR. El producto de PCR será de 250 bp.
- Detección de la banda escindida: para comprobar la eliminación de VDR en las arterias es necesario detectar la banda Cre-excised, que se basa en la detección de la secuencia entre los loxP. Los cebadores usados son VDR3F y VDR3fIR. Encontraremos esta banda en los ratones donde VDR estaba floxeado por loxP y que ha sido eliminado por la Cre-recombinasa después de su activación con *Tamoxifen*. El producto de PCR será de 300 bp.

Realizamos las distintas PCRs mezclando la mix que contenía Buffer 10X (sin magnesio), MgCl (50 mM), dNTPs (10 mM), cebadores (10  $\mu$ M) y Taq polimerasa (Biotools) y el DNA de cada ratón.

Las secuencias de los cebadores usados son:

Nombre cebador	Secuencia (5' a 3')
<b>Gen VDR</b>	
<b>3fIR</b>	AGC GAC ACT CTT GGT CTG GTT CC
<b>4fIF</b>	TTT GGC CTT TCT GCT TGC CTC TTC
<b>4wtR</b>	TCA GTT GAT ATC CCT GGG AGG C
<b>Gen Myh11-CreERT2</b>	
<b>Cre 1</b>	TGA CCC CAT CTC TTC ACT CC
<b>Cre 2</b>	AAC TCC ACG ACC ACC TCA TC
<b>Cre 3</b>	AGT CCC TCA CAT CCT CAG GTT

Tabla 7. Secuencias de los cebadores usadas para el genotipado de los ratones

Los programas de PCR son los siguientes:

Banda VDR wt	Banda VDR lox	Myh11-CreERT2
95°C 5 min	95°C 5 min	94°C 3 min
95°C 30 sec	95°C 30 sec	94°C 30 sec
65°C 1 min x 40 ciclos	60°C 1 min x 40 ciclos	58°C 45sec x 32 ciclos
72°C 1 min	72°C 1 min	74°C 1min 30 sec
72°C 7 min	72°C 1 min	70°C 10 min
4°C	4°C ∞	4°C ∞

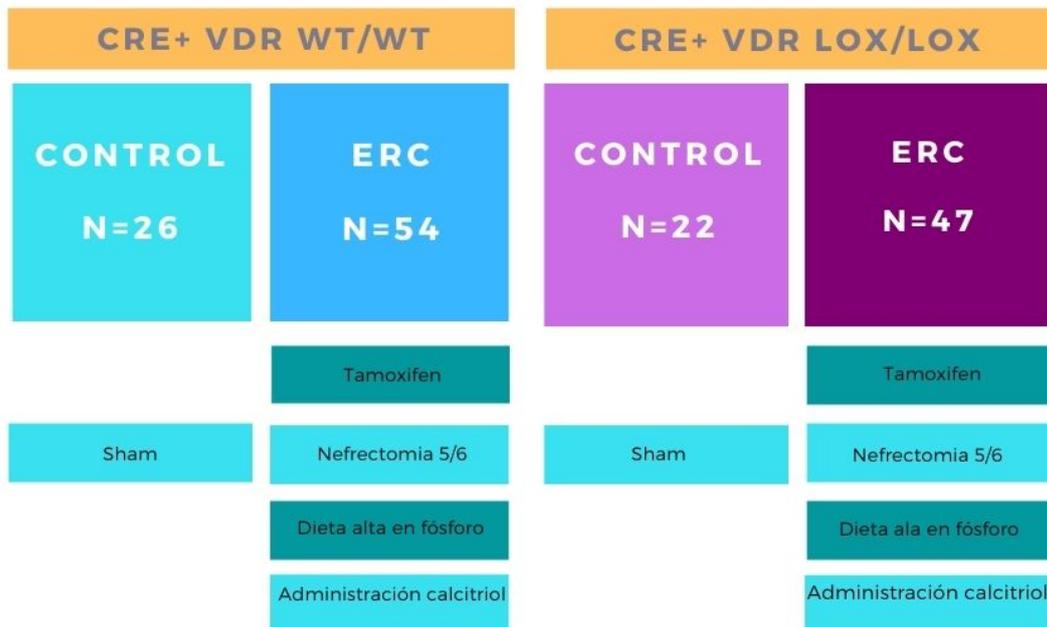
Tabla 8. Programas de PCR para detectar VDRwt, VDRlox y Myh11-CreERT2.

Los productos obtenidos en las PCRs y el marcador de peso molecular (*Biotools 100 bp DNA ladder*) junto con el tampón de carga Orange G, se analizaron mediante separación electroforética en gel de agarosa al 1,5% y las bandas se visualizaron por tinción con SYBR® SAFE (*Invitrogen*).

### 3.1.6 Administración de *Tamoxifen*

Una vez tuvimos los ratones genotipados, los ratones machos con el genotipo Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> y CRE+ VDR<sup>lox/lox</sup> fueron los seleccionados para inyectarles *Tamoxifen*, a los dos meses de edad para posteriormente empezar el estudio. Para preparar el *Tamoxifen* (*Sigma-Aldrich*) este se disolvió, en primer lugar con etanol al 100% y seguidamente con Corn oil (*Sigma-Aldrich*) hasta tener una concentración final de 15 mg/ml. Finalmente se vortió y calentó a 37°C para terminar de disolverlo y posteriormente administrarlo en los ratones, mediante una inyección intraperitoneal diaria de 1,5 mg por ratón durante 5 días. En cuanto a la dosis de *Tamoxifen*, en la mayoría de estudios habíamos comprobado que usaban una dosis única de 0,5 mg/día, pero tal como describe C. *Marchesi et al.* (2013) para que este sea efectivo en la eliminación de genes en CMLV, es mejor usar la dosis de 1,5 mg/día durante 5 días. Por esto, en base a la bibliografía publicada, esta última fue la elegida para usar en nuestro estudio.

El número de ratones totales usados en el experimento se indica en la *figura 18*. Es importante destacar no hay muestras de todos los ratones, ya que la arteria es una muestra muy limitante y se han dividido las muestras en los distintos experimentos.



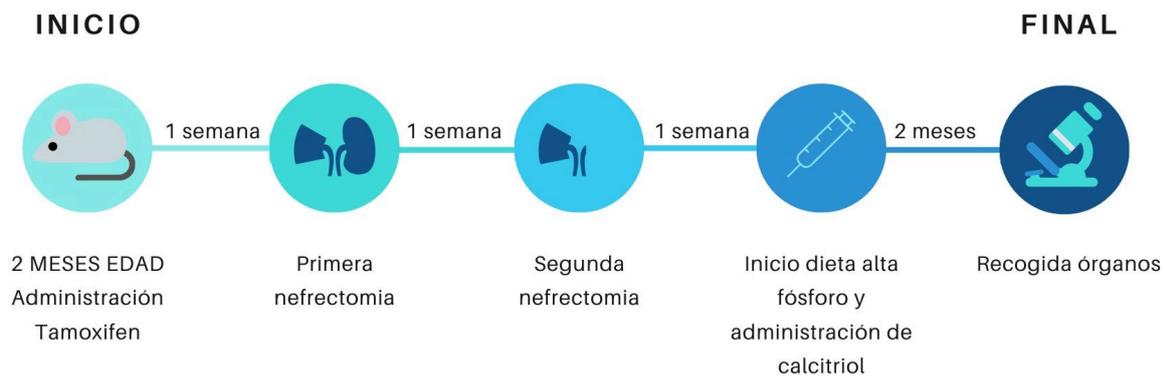
**Figura 18. Grupos de ratones:** los ratones se distribuyeron en cuatro grupos, dos grupos control y dos grupos experimentales con los dos genotipos respectivamente.

#### 3.1.7 Modelo de enfermedad renal crónica y calcificación vascular en ratones

La semana siguiente a la administración de *Tamoxifen*, los ratones de los dos genotipos fueron sometidos a una nefrectomía subtotal, que consiste en la eliminación del 75% de la masa renal. Para realizar la operación, los animales previamente fueron anestesiados con isoflurano (mediante vaporizador, al 3% para la inducción y mantenimiento al 2% junto con flujo de oxígeno de 0,5-1 l/min), además se les administró analgésico intraperitoneal inmediatamente (*Buprenorfina hidrocloreuro 0,05 mg/kg*) y también después de 24 horas de la nefrectomía. La intervención consiste, en primer lugar, en la extirpación equivalente a 2/3 partes del riñón izquierdo mediante la electrocauterización del polo superior e inferior del riñón. Para realizarlo se hizo un pequeño corte al ratón, se localizó, separó y descapsuló el riñón y finalmente se cauterizó la correspondiente masa renal. Una semana después, se realizó la extirpación total del riñón derecho, descapsulándolo, haciendo un clamp para ligar la arteria y así, finalmente, poder extraer todo el riñón.

Los ratones controles de cada genotipo se sometieron a una cirugía *sham*, que consistió en una simulación de la misma cirugía practicada a los ratones del grupo experimental pero sin extirparles el riñón, solo haciéndoles un corte y cosiendo posteriormente, para así igualar el estrés quirúrgico entre los distintos grupos.

Una semana después de la última nefrectomía, los ratones empezaron una dieta alta en fósforo durante dos meses (0,6% Ca y 0,9% P, *C1031 modificada, Altromin*). Es necesario conservar la comida a 4°C y administrarla a los ratones en pequeñas dosis porque se oxida fácilmente. Se pesaron el día del inicio de la dieta y además, también se les administró Calcitriol (*Kern pharma*) durante estos dos meses, 3 veces por semana a una dosis de 500 ng/kg/día, se determinó esta concentración después de estudios previos del grupo para inducir calcificación. La administración de Calcitriol fue necesaria porque los ratones no desarrollan calcificación vascular solo con dieta alta en fósforo.



**Figura 19. Cronología del diseño experimental In vivo.**

### 3.1.8 Recogida de órganos, sangre y orina

Después de los dos meses con dieta alta en fósforo e inyecciones de calcitriol, los animales se sacrificaron, se recogió la sangre mediante punción cardiaca, el corazón y se extrajo la arteria torácica desde la válvula cardiaca hasta la bifurcación iliaca. Esta se dividió en cinco partes iguales para el posterior estudio de DNA, calcio, RNA, proteínas (que se congelaron en nitrógeno líquido) e inmunohistoquímica. Para procesar en parafina o criopreservación se fijó en PFA 4%.

Durante las 24 horas antes de sacrificarlos, se recogió la orina de todos los ratones mediante jaulas metabólicas (*Tecniplast*) del animalario de roedores de la Universidad de Lleida. Así como también se midió la cantidad de comida y agua que ingirieron durante estas 24 horas y el peso al final del experimento.

### 3.1.9 Extracción de DNA de la arteria y verificación del genotipo

Una vez extraídas las arterias, el primer paso fue verificar de nuevo el genotipo para proseguir con el estudio. Para sacar el DNA de la arteria, seguimos el mismo procedimiento explicado anteriormente con el genotipado mediante trozos de cola de los ratones. Una vez tuvimos el DNA purificado, se realizaron las PCRs correspondientes, dos de las cuales son las misma que las usadas para genotipar las colas (*Lox* y *Wt*) y, además, se añadió también la PCR para la banda escindida ya que en este caso el estudio es de la arteria y en las células de músculo liso vascular son el único sitio donde la *Cre*-recombinasa se activa para eliminar el gen *VDR*. El programa de PCR de la banda escindida es el siguiente:

CRE-excised band		
95°C	5 min	
95°C	30 sec	
65°C	1 min	x 40 ciclos
72°C	1 min	
72°C	7 min	
4°C	∞	

Tabla 9. Programa de PCR cre-excised.

Las secuencias de los cebadores usados son:

Nombre cebador	Secuencia
<b>3fIR</b>	AGC GAC ACT CTT GGT CTG GTT CC
<b>3F</b>	CAC AAC AGT CAG AGG CAG TAA GCA AAG C

Tabla 10. Secuencias de los cebadores usados en la PCR cre-excised.

### 3.1.10 Análisis bioquímicos: BUN, calcio y fósforo en suero y orina

Para medir la urea y BUN en suero se usó el kit Urea 37 (*Spinreact*). A partir de la medida de urea en suero se obtuvieron los niveles de BUN (mg/dl). El fósforo (P) y calcio (Ca) en orina y suero, se analizaron en el servicio de análisis clínicos de l'Hospital Arnau de Vilanova mediante el método de molibdato para fósforo y o-cresolftaleína complexona para calcio (*Roche/Hitachi modular analytics*).

### 3.1.11 Histología e inmunohistoquímica

Los cortes en parafina de las arterias humanas y de ratón se procesaron para tinción inmunohistoquímica con anti-VDR, anti-OPN, anti-SOST y anti-Runx2 después de la desparafinación y rehidratación, antígeno retrieval y bloqueo con BSA 3%. Se incubaron con los anticuerpos correspondientes toda la noche a 4°C. Después de lavar con PBS, las muestras se trataron con el correspondiente anticuerpo secundario biotinilado (30 min,

RT) (*kit Vector Vectastain Universal ABC PK-6200*) seguido del complejo avidina-biotina-peroxidasa (30 min, RT) y DAB como cromógeno (10 min, RT) (*Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA*). Los cortes fueron teñidos con Hematoxilina de Mayer para visualizar los núcleos. Finalmente, las muestras fueron deshidratadas y montadas con medio DPX (*VITROCLUD®*). Muestras sin incubación con el anticuerpo primario se usaron como control negativo de la inmunohistoquímica para tener en cuenta la unión no específica del anticuerpo secundario.

Proteína	Origen	Dilución	Almacenaje	Compañía	Referencia
VDR	Conejo	1/100	4°C	Santa Cruz	Sc-1008
OPN	Cabra	1/50	-20°C	R&D Systems (bio-technique)	AF-808
Runx2	Conejo	1/50	-20°C	Novus Biological	NBP1-01004
SOST	Cabra	1/50	-20°C	R&D Systems (bio-technique)	AF-1589
Anti-goat IgG biotinylated antibody		1/25	4°C	Vector Laboratories	PK-4005
Biotinylated universal antibody		1/50	4°C	Vector Laboratories	PK-6200

*Tabla 11. Anticuerpos primarios y secundarios usados en inmunohistoquímica de tejido.*

Las arterias de los ratones reporteros también fueron fijadas en PFA 4%, deshidratadas mediante la incubación overnight con sacarosa 30% a 4°C y después congeladas en medio de congelación OCT. Se usaron criosecciones de 8 µm de tejido de arteria y riñón para determinar el cambio de expresión de fluorescencia mT/mG. La fluorescencia se visualizó mediante microscopio confocal (*Olympus Fluoview FV1000*) y los núcleos se marcaron con *Hoechst*.

### 3.1.12 Cuantificación de calcio arterial

#### 3.1.12.1 Cuantificación del calcio por método o-cresolftaleína

El tejido arterial fue decalcificado con HCl (1 N), usando el *TissueLyser LT* (*Quiagen, Hilden, Germany*), y posteriormente incubado con agitación a 4°C toda la noche. El contenido de calcio del sobrenadante fue cuantificado colorimétricamente usando el

método o-cresolftaleína complexona, mientras que el contenido de proteínas del pellet fue determinado mediante el *DC protein assay kit* (*bio-RAD, Hercules, CA, USA*). El contenido de calcio arterial fue normalizado por la cantidad de proteína y expresado en nanogramos de calcio por miligramos de proteína (ng Ca/mg proteína).

#### **3.1.12.2 Detección de calcificación en secciones de parafina de tejido**

Los depósitos de calcio en secciones de aorta en parafina fueron teñidos con la solución Rojo de Alizarina (*Sigma*). Primero, las muestras fueron desparafinadas, rehidratadas y teñidas con Rojo de Alizarina 2 % durante 5 minutos. Después de la tinción, las muestras se deshidrataron con acetona, acetona-xileno (1:1) y montadas con medio de montaje (*VITROCLUD®*).

#### **3.1.13 Análisis de expresión génica de miRNAs y mRNAs**

##### **3.1.13.1 Extracción de RNA total en tejido**

El RNA total fue extraído de las arterias mediante el RNA isolation kit (*Macherey-Nagel*). En primer lugar se disgregó el tejido usando el *TissueLyser LT* (*Quiagen, Hilden, Germany*), se enfriaron los eppendorf con las *beads* en hielo seco 15 minutos y después se añadió el tejido congelado. Seguidamente se añadieron 350 µl del buffer RA1 suplementado con 1% de Triton-X-100 y 1% de β-mercaptoetanol, se hicieron 5 ciclos de 1 minuto a 50 Hz en el *TissueLyser LT* y entre medio de cada minuto se mantuvieron un minuto en hielo. El líquido con el tejido disgregado se traspasó en un nuevo eppendorf (tratado con agua DEP) y se le añadió 590 µl de agua libre de RNAsas, 10 µl de proteinasa K y se mezcló pipeteando. A continuación se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y 10 minutos a 55°C. Después se centrifugaron 3 minutos a 10.000 g y el sobrenadante se traspasó en un nuevo eppendorf. En el siguiente paso se añadió 0,5 volúmenes de etanol para homogeneizar el lisado y se mezcló vorteando. 700 µl de la mezcla se añadieron en la columna de *RNA NucleSpin®* y se centrifugó 30 s a 8.000 g para que el RNA quedara retenido en la columna. Se repitió el paso poniendo el resto de mezcla que faltaba y volviendo a centrifugar. Por último se siguieron los pasos marcados en el protocolo, añadir 350 µl de buffer MDB y centrifugar a 11.000 g 1 minuto; añadir 95 µl de la mezcla de Reaction Buffer for rDNase y rDNase reconstituida e incubar 15 minutos a temperatura ambiente; añadir 200 µl de Buffer RAW2 en la columna, centrifugar 30 s a 11.000 g; añadir 600 µl de buffer RA3 en la columna y centrifugar 30 s a 11.000 g;

añadir 250 µl de buffer RA3 y centrifugar 2 minutos a 11.000 g y finalmente, eluir el RNA en 20 µl de agua libre de RNAsas. La concentración final de RNA fue determinada mediante el espectrofotómetro Nanodrop (*ND-100*).

### 3.1.13.2 Síntesis de cDNA (RT-PCR)

La transcripción reversa (RT) del mRNA total para obtener cDNA, se realizó mediante el “*1st strand DNA synthesis kit for RT-PC (AMV)*” de Roche Diagnostics cat N° 11483188001. 1 µg de RNA se usó para la reacción juntamente con la mix y se puso en el termociclador siguiendo el protocolo establecido (10 minutos a 25°C, 1 hora a 42°C y 5 minutos a 99°C para activar la enzima). El cDNA sintetizado se usó en el paso siguiente, la PCR a tiempo real.

En los estudios de microRNAs, la transcripción reversa es específica para los microRNAs que queremos analizar y se hizo mediante el *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, USA)*, siguiendo las instrucciones del fabricante y juntamente con el pool de los cebadores específicos que se había preparado previamente (RT Primer Pool) para cada microRNA (*Tabla 14*).

A continuación se puso en el termociclador siguiendo el protocolo establecido (*Tabla 12*):

Paso	Tiempo	Temperatura
Hold	30 min	16°C
Hold	30 min	42°C
Hold	5 min	85°C
Hold	∞	4°C

*Tabla 12. Programa de PCR para obtención del cDNA específico de miRNAs.*

En el caso del tejido arterial, como tiene concentraciones bajas de miRNAs una vez teníamos el producto de la RT se realizó una preamplificación de este.

Para esta usamos la *TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosistemas)*, agua, el pool de las sondas (PreAmp Primer Pool) junto con el producto de la RT y se realiza la reacción de preamplificación en el termociclador con los siguientes ciclos:

Paso	Tiempo	Temperatura
Hold	10 min	95°C
Hold	2 min	55°C
Hold	2 min	72°C
Cycle (12 cycles)	15 sec	95°C
	4 min	60°C
Hold	10 min	99.9°C
Hold	∞	4°C

Tabla 13. Programa de PCR para la preamplificación del producto de RT-PCR.

### 3.1.13.3 PCR a tiempo real (qPCR)

La expresión relativa de distintos genes se analizó mediante la metodología *Taqman*. Para la reacción usamos las sondas específicas *Taqman* de los genes que queríamos analizar, juntamente con agua y la *Taqman® Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG (Applied Biosystems)* y las muestras de cDNA obtenidas en los pasos anteriores. Las sondas usadas se especifican en la *Tabla 14*. Como gen control se usó la proteína tata box (TBP), en el caso de estudios de mRNA y U6 para estudios de miRNAs, dado que la expresión de estos no se ve alterada por la vitamina D ni enfermedad renal.

En los estudios de microRNAs, se usaron las sondas específicas *TaqMan® miRNA assays* junto con la *TaqMan® Universal PCR Master Mix II (Applied Biosystems)*, agua y el cDNA preamplificado obtenido en el paso anterior.

Las PCRs a tiempo real se realizaron mediante el equipo *QuantStudio™ 7 Flex System (Applied Biosystems)*. La expresión de los genes fue calculada usando el método  $\Delta\Delta C_t$  de cuantificación relativa.

### Sondas de expresión génica TaqMan (*Taqman Gene expresión assays*)

Referencia	Gen	Especie	Compañía
Mm.PT.58.8581722	Vitamin D receptor (VDR)	Ratón	Integrated DNA Technologies (IDT)
Mm00446971_m1	TBP	Ratón	Applied biosystems
Mm00436767_m1	Osteopontin (Spp1 o OPN)	Ratón	Applied biosystems
Mm00501584_m1	Runx2 / Cbf	Ratón	Applied biosystems
Mm04208528_m1	Sclerostin (SOST)	Ratón	Applied biosystems
Mm.PT.58.32674923	MGP	Ratón	Integrated DNA Technologies (IDT)
Mm.PT.58.5329269	SM22a	Ratón	Integrated DNA Technologies (IDT)
Mm.PT.58.10419414	BMP2	Ratón	Integrated DNA Technologies (IDT)
Mm.PT.58.12742897	LaminA (Lmna)	Ratón	Integrated DNA Technologies (IDT)
Mm00434228_m1	Il-1 $\beta$	Ratón	Applied biosystems
Mm00446190_m1	IL-6	Ratón	Applied biosystems
Mm00441724_m1	Tgf $\beta$ 1	Ratón	Applied biosystems
Mm00521722_m1	DICER 1	Ratón	Applied biosystems
Mm01310009_m1	DROSHA	Ratón	Applied biosystems

### Sondas Taqman miRNAs (*classic TaqMan<sup>TM</sup> microRNA assays*)

ID sonda ( <i>assay ID</i> )	Nombre sonda ( <i>Assay name</i> )	Compañía	Secuencia miRNA maduro
002278	Mir-145a-5p	Applied biosystems	GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU
000419	Mir-30c-5p	Applied biosystems	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC
000413	Mir-29b-3p	Applied biosystems	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU
002571	Mir-155-5p	Applied biosystems	UUA AUGCUAAUUGUGAUAGGGGU
000468	Mir-146a-5p	Applied biosystems	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU
000200	Cel-mir-39	Applied biosystems	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG
001973	U6 snRNA	Applied biosystems	GTGCTCGCTTCGGCAGCACATATACTAAAATT GGAACGATACAGAGAAGATTAGCATGGCCCC TGC GCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGC GTCCATATTTT

**Tabla 14. Sondas usadas en las qPCR.** \*Los classic TaqMan<sup>TM</sup> Micro RNA Assays están formados por un cebador para usar en la reacción de transcripción reversa (RT Primer Pool) y una sonda que se usa tanto en el PreAmp primer pool (en el paso de preamplificación) como en la qPCR. Tenemos que tener en cuenta que con el mismo ID del assay podemos encontrar las sondas TaqMan miRNA clásicas y las sondas para TaqMan advanced miRNA y en nuestro caso usamos las clásicas, que tendrás los cebadores específicos de los microRNAs para la retrotranscripción.

#### 3.1.13.4 Predicción de genes diana para miRNAs

Los posibles sitios de unión en la región 3'UTR del mRNA de genes diana fueron identificados usando las secuencias de nucleótidos de los miRNAs y mRNAs extraídas de *mirBASE* y *UCSC Genome Browser* respectivamente. La unión entre los miRNAs y el mRNA diana se puede dar mediante la región de siembra canónica del miRNA (interacción mediante algunos nucleótidos de la posición 1-8 del extremo 5' del miRNA) o la región de siembra extendida, que se diferencia de la región canónica, no es tan frecuente y comprende los nucleótidos del 4 al 10.

#### 3.1.14 Análisis de proteínas

##### 3.1.14.1 Soluciones

- **Buffer de lisis NP-40:** 20 mM Tris, pH 7,4, 140 mM NaCl, 10% Glicerol, 1% Ca-630.
- **Buffer de lisis SDS:** 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 2% SDS; 1% Na-deoxycholate; 1% Igepal; 0,5  $\mu$ M EDTA.
- **Tampón de carga LB2X:** 50mM Tris 1M pH 6,8, 4% SDS, 0,2% Bromophenol blue, b-mercaptoethanol 144 mM, 20% glicerol.
- **TRIS-HCl:** 0,12 g Tris se diluyeron en 20 ml de 0,9% NaCl y el pH se ajustó a 8,8 o 6,8 con 5% de HCl.
- **Tampón de electroforesis:** 1,92 M glicina, 250 mM Tris, 10% Lauryl Sulfate (SDS1%); pH 8.3.
- **Tampón de transferencia 10X:** 1,92 M Glicina; 250 mM Tris; pH 8,3. En el momento de su uso, se usa 1X con un 10% de metanol.
- **TBS 20X:** 146,1 g NaCl, 48,44 g Tris y H<sub>2</sub>O hasta 1L, pH 7,4. En el momento de su uso se prepara 1L de solución 1X de TBS y añadimos 1ml de Tween para obtener TBST1X.

##### 3.1.14.2 Extracción de proteínas

El tejido aórtico fue disgregado y homogeneizado mediante el *TissueLyser LT* (*Quiagen, Hilden, Germany*). Previamente las *stainless steel beads* se colocaron en los eppendofs para que se enfriaran y a continuación se transfirió el tejido congelado y 100  $\mu$ l de buffer NP-40 suplementado con 2mM PMSF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> y coctel inhibidor de proteasas. Se hicieron cuatro ciclos para homogeneizar (50 Hz, 1 minuto) y entre medio de los ciclos 1 minuto en hielo, seguido de tres ciclos en nitrógeno líquido y al baño a 37°C y entre medio

se vortearon las muestras. El sobrenadante fue recogido después de centrifugar 10 minutos a 11.000 g y 4°C. La concentración de proteínas fue determinada mediante el *DC protein assay kit* (Bio-Rad, Manassas, VA, USA).

### 3.1.14.3 Western Blot

Para analizar las proteínas mediante western blot, se usaron 20 µg de proteína de cada muestra. En primer lugar se hirvieron las muestras a 95°C durante 5 minutos juntamente con el tampón de carga (LB 2X) y a continuación las proteínas se separaron mediante un gel de electroforesis al 8% o 10% de acrilamida (SDS-PAGE) en condiciones reductoras, durante dos horas a 80V.

	Gel separador (1,5mm)		Gel concentrador (1,5mm)
	8%	10%	4%
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	3,75ml	3,28ml	1,525ml
<b>30% AA</b>	2,15ml	2,64ml	0,325ml
<b>1.5M Tris-HCl, pH 8.8</b>	2,02ml	2ml	0,625ml
<b>10% SDS</b>	81µl	80µl	25µl
<b>10% APS</b>	81µl	80µl	25µl
<b>TEMED</b>	4,85µl	8µl	5µl

*Tabla 15. Geles usados para Western Blot.*

A continuación, las proteínas fueron transferidas a una membrana PVDF (*Immobilon-P; Milipore, Billerica, MA, USA*) durante 1 h a 70V. Posteriormente se realizó el bloqueo de las membranas para evitar las uniones inespecíficas, para ello las membranas se incubaron durante 1 hora en leche en polvo al 5% diluida en tampón salino TRIS con Tween 20 (TBST).

Las membranas se incubaron con el correspondiente anticuerpo primario toda la noche a 4°C y al día siguiente, después de lavados con TBST, se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente. La unión fue detectada usando el kit de detección quimioluminiscente *HRP ECL Advanced* (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) o el *EZ ECL* (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel). Las membranas fueron observadas mediante el sistema de imagen *QuemiDoc* (BioRad) y el programa *Quantity One* (BioRad). Finalmente, las bandas con

inmunoreactividad positiva fueron cuantificadas por densitometría y comparadas con la expresión del control de carga adecuado usando el software *ImageJ*.

Proteína	Origen	Dilución	Almacenaje	kDa	Compañía
VDR	Conejo	1:1000	4°C	48-53	Santa Cruz (sc-1008)
OPN	Goat	1:1000	-20°C	44	R&D Systems, biotechne
RunX2	Rabbit	1:1000	-20°C	50	Novus biological
GAPDH	Mouse	1:10.000	-20°C	37	Abcam
Anti-rabbit IgG-HRP	Cabra	1:10.000	-20°C		Cell Signaling
Anti-mouse IgG-HRP	Cabra	1:10.000	-20°C		Jackson Immuno Research

**Tabla 16. Anticuerpos primarios y secundarios usados en análisis de Western blot.**

---

## 3.2 Estudio *In Vitro*

---

### 3.2.1 Cultivo de CMLV de ratón

Las células de musculo liso vascular de ratones (CMLV) fueron aisladas de ratones deficientes para VDR (VDRko) y los correspondientes wild-type (VDRwt), de dos meses de edad. Los ratones fueron anestesiados con isoflurano juntamente con oxígeno y seguidamente se les extrajo la arteria aortica y se guardó en PBS (tampón fosfato salino estéril) complementado con penicilina (200U/ml), estreptomycin (200 µg/ml) y amfotericina en hielo (4.000 µg/ml). Después, en la campana de flujo laminar, en condiciones estériles, las arterias se lavaron con PBS, se limpiaron, se cortaron en pequeños anillos y se pusieron en una placa de 6 pocillos que previamente habíamos cubierto con fibronectina (100 µg/ml; *Sigma*). Los explantes se mantuvieron con medio DMEM (*GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*) suplementado con un 20% de FBS (suero fetal bovino inactivado), penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml en una atmosfera húmeda a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> y 98% de humedad. Después de dos semanas las células ya habían migrado desde los explantes y cuando la placa ya estaba confluyente se tripsinizó para plantar las células en una placa más grande y poder empezar con los experimentos.

### 3.2.2 Mantenimiento del cultivo primario de CMLV

Para los experimentos se usaron CMLV desde el segundo pase al séptimo. Cuando estaban confluentes, se lavaron con PBS y después se dividieron con tripsina/EDTA 5 minutos al incubador a 37°C para que se despegaran de la superficie de la placa. Después se recogieron con medio y se plantaron de nuevo en placas, haciendo una dilución 1:3. Previamente a dividir las, las placas se habían cubierto con gelatina 0,2% (*Sigma*).

#### 3.2.3 Congelación, almacenaje y descongelación de CMLV

Para congelar las CMLV se tripsinizaron, se centrifugaron y después se resuspendieron en medio frío que contenía 90% de FBS y 10% de DMSO por vial. Los criotubos se mantuvieron durante 48h a -80°C y después se trasladaron a nitrógeno líquido (-196°C) para almacenaje prolongado.

Para descongelarlas, los criotubos se calentaron a 37°C y inmediatamente se diluyeron en medio de cultivo ya caliente. Después de la centrifugarlas, el pellet de las células se resuspendió en medio de cultivo y las células se plantaron en placas correspondientes.

#### 3.2.4 Inmunohistoquímica de fluorescencia para $\alpha$ -actina de musculo liso

Para asegurarnos que las células que han migrado de los explantes son CMLV, antes de realizar los experimentos, confirmamos que expresaban  $\alpha$ -actina de musculo liso mediante fluorescencia y que tenían una morfología propia de células de musculo liso. Para ello plantamos en placas de 24 pocillos (previamente cubiertas con gelatina) las células de los dos genotipos. Cuando las células estaban casi confluentes, dos días después de plantarlas, se lavaron dos veces con PBS, se fijaron con metanol 100% frío durante 15 min a -20°C y posteriormente se lavaron con PBS frío. A continuación las células fijadas se incubaron con la solución de bloqueo (1% BSA/PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente para bloquear las uniones no específicas. Después se añadió el anticuerpo primario para  $\alpha$ -actina de musculo liso, conjugado con fosfatasa alcalina (*santa cruz, sc-53142*) diluido 1:100 en la solución de bloqueo 1% BSA/PBS toda la noche. Como control negativo se dejaron algunos pocillos sin anticuerpo primario, solo con solución de bloqueo. El día siguiente, se hicieron dos lavados de 5 min con PBS a temperatura ambiente y seguidamente se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario fluorescente Alexa Fluor 546 (*Invitrogen, A11003, goat anti-mouse IgG*) en solución de bloqueo (dilución 1/200), a temperatura ambiente juntamente con el colorante para núcleos Hoechst (1/150) y posteriormente se visualizó en el microscopio de fluorescencia.

### **3.2.5 Experimentos de calcificación en CMLV**

Para los experimentos de calcificación, las células se plantaron en placas de 6 pocillos (40.000 células/pocillo) y fueron tratadas durante 6 días con medio calcificante (MC), DMEM con piruvato sódico (10 mM), 10 mM  $\beta$ -glicerofosfato (*Sigma Aldrich*), 6 mM de cloruro cálcico y 5% de suero de rata normal (NRS). Cada 2-3 días se cambió el medio con los distintos agentes añadidos. Como control, se usó el medio de mantenimiento DMEM con 5% FBS (MN) en los dos tipos celulares (VDRwt y VDRko).

### **3.2.6 Determinación del contenido de calcio**

Los niveles de calcio fueron medidos 6 días después del inicio de los tratamientos. El contenido de calcio total se midió mediante el método o-cresolftaleína complexona tal y como se ha descrito en el apartado in vivo. Brevemente, las células se recogieron con PBS y se centrifugaron. El pellet se incubó con 25  $\mu$ l de HCl 0,6N y vorteadando a 4°C toda la noche. El día siguiente, después de centrifugar, el sobrenadante se recogió para cuantificar el calcio mediante el método o-cresolftaleína complexona y el pellet se usó para cuantificar el contenido de proteína.

Para visualizar los depósitos de calcio, las CMLV se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con formaldehído 10% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de la fijación, las células se lavaron dos veces con agua y a continuación se tiñeron con la solución rojo de Alizarina 40mM (*Sigma A3757*) ajustando el pH, entre 4,1-4,3, durante 20 minutos, después se lavó con agua dos veces y se visualizaron mediante el microscopio Olympus BX50 y el sistema de cámara automático Olympus.

Para cuantificar los depósitos se extrajo el calcio a pH bajo con ácido acético, se neutralizó con hidróxido de amonio y se detectó colorimétricamente a 405 nm mediante espectrofotómetro en placas de 96 pocillos.

### **3.2.7 Extracción de RNA de CMLV y síntesis de cDNA**

En los cultivos celulares primarios, el RNA total de las CMLV fue extraído mediante el reactivo TRIzol (*Molecular Research Center, Inc, USA*) siguiendo las indicaciones del fabricante. En las placas de 6 pocillos en hielo, añadimos 500  $\mu$ l de TRIzol y rascamos para recoger todas las células en un eppendorf. A continuación añadimos 100  $\mu$ l de

cloroformo, mezclamos y lo dejamos 3 minutos a temperatura ambiente para posteriormente centrifugarlo 15 minutos a 14.000 rpm y 4°C. El sobrenadante se traspasó en un nuevo eppendorf (tratado con agua DEP) y se añadieron 250 µl de isopropanol, se invirtieron los eppendorfs y se dejaron 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugaron 10 minutos a 14.000 rpm y 4°C. Después se decantaron las muestras y al pellet se añadió 500 µl de etanol 75%, se vortió y se centrifugo 5 minutos a 4°C y 12.000 rpm. Este último paso se repitió otra vez y se decantó el sobrenadante para quedarnos con el pellet que se dejó secar al aire 15 minutos y finalmente se diluyó el RNA en 20 µl de agua libre de RNAsas.

La concentración final de RNA fue determinada mediante el espectrofotómetro Nanodrop (ND-100).

Para sintetizar el cDNA a partir del RNA obtenido en la extracción se siguió el mismo procedimiento ya explicado anteriormente en la parte de métodos *in vivo* (punto 3.1.13.2) e igualmente en el caso del análisis por qPCR, se siguieron los mismos pasos que en las muestras *in vivo*.

#### 3.2.8 Análisis de proteínas

*In vitro*, los lisados celulares se obtuvieron lavando la monocapa de células con PBS frío, encima de hielo y posteriormente, rascándolas y recogiénolas en búfer SDS. Las células fueron sonicadas y el sobrenadante se recogió y centrifugó 10 minutos a 11.000 g, 4°C. La concentración de proteínas fue determinada mediante el *DC protein assay kit* (Bio-Rad, Manassas, VA, USA). A continuación se realizó el análisis de las proteínas mediante western blot tal y como se ha detallado en el apartado *in vivo* (punto 3.1.14.3).

#### 3.2.9 Transfección de mímics de miRNAs en CMLV

Las CMLV VDRwt y Vdrko en suspensión fueron transfectadas con el mímico del miRNA correspondiente, en este caso el mir-145a-5p (Quiagen) y con un control negativo de la transfección, *Allstars negative control siRNA* (Quiagen), ambos a una concentración final de 50 nM y usando el reactivo *HiPerFect Transfection Reagen* (Quiagen) (1 nM) en placas de 6 pocillos. 24 horas después, el medio fue reemplazado con las distintas condiciones experimentales: Medio normal (5% FBS) y medio calcificante (5% NRS) durante 6 días.

### 3.2.10 Predicción de dianas de miRNAs

Para comprobar las posibles interacciones entre microRNAs y mRNAs de genes usamos distintas herramientas. Nos fijamos en las uniones mediante la región de siembra canónica o extendida, descritas en interacciones entre miRNAs y genes diana. Para ello, primero, mediante la base de datos *mirbase* obtendremos las secuencias de los microRNAs de interés. En estas, seleccionamos las bases 2-10 del extremo 5', ya que se ha descrito que, los microRNAs, pueden interactuar mediante la región de siembra canónica en forma de 6-mer (bases 2-8) o 7-mer (bases 1-8) o también mediante la región de siembra extendida (bases 4-9 o 5-10).

La mayoría de miRNAs se unen al gen diana mediante la región 3'UTR, región no traducida del gen. Por esto, a continuación, mediante la base de datos *UCSC Genome Browser Home* obtenemos la secuencia 3'UTR del posible gen diana que queremos comprobar. En esta, tenemos que buscar parte de la complementariedad con las bases 2-10 de la secuencia del microRNA correspondiente. Hay bases de datos, como *TargetScan* o *Tarbase*, donde están recopiladas muchas de las interacciones descritas o *IntaRna* que detecta las posibles interacciones después de introducir la información correspondiente

---

### 3.3 Análisis estadístico

---

Las diferencias entre grupos se analizaron mediante el estudio estadístico t-test o ANOVA de dos factores. Valores  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se representan con \* si  $p < 0,05$ ; \*\* si  $p < 0,01$  y \*\*\* si  $p < 0,001$ . Todos los datos analizados se expresan como promedio  $\pm$  error estándar de la media (EEM o SEM).

La representación gráfica se hizo mediante el software *GraphPad Prism* versión 6 (*GraphPad Software, La Jolla California USA*).



4

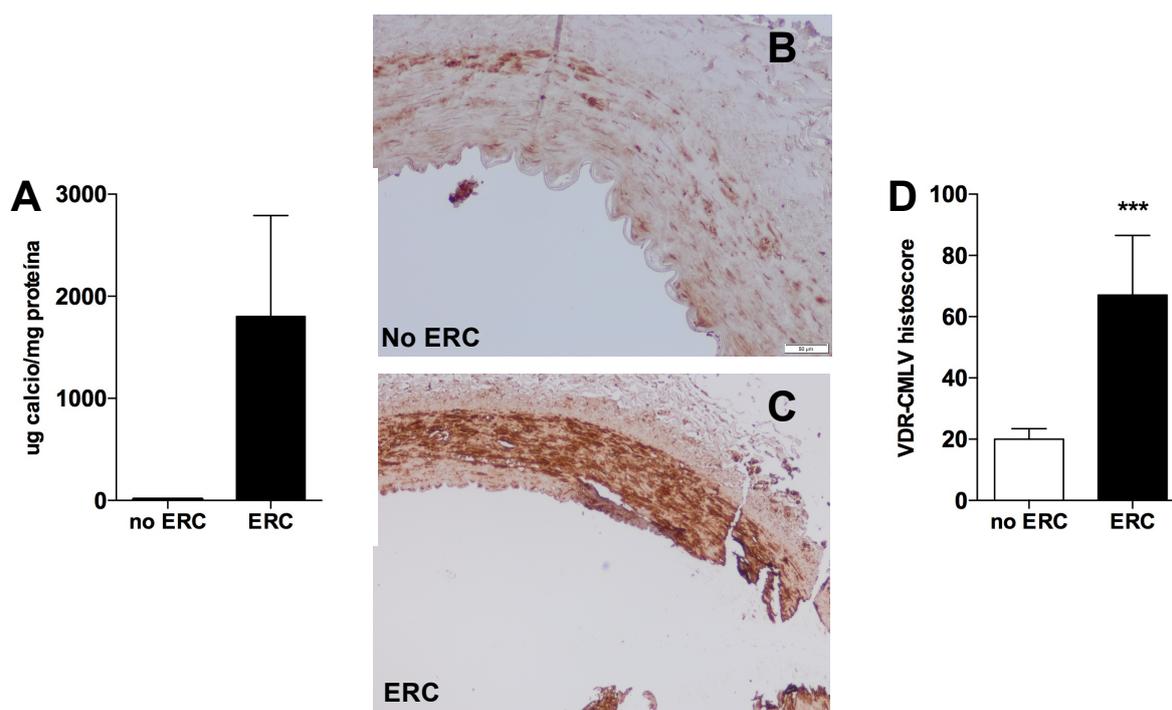
Resultados



## 4.1 Evaluación de la expresión de VDR en arterias calcificadas

### 4.1.1 La expresión de VDR aumenta en arterias calcificadas de humanos afectados por ERC

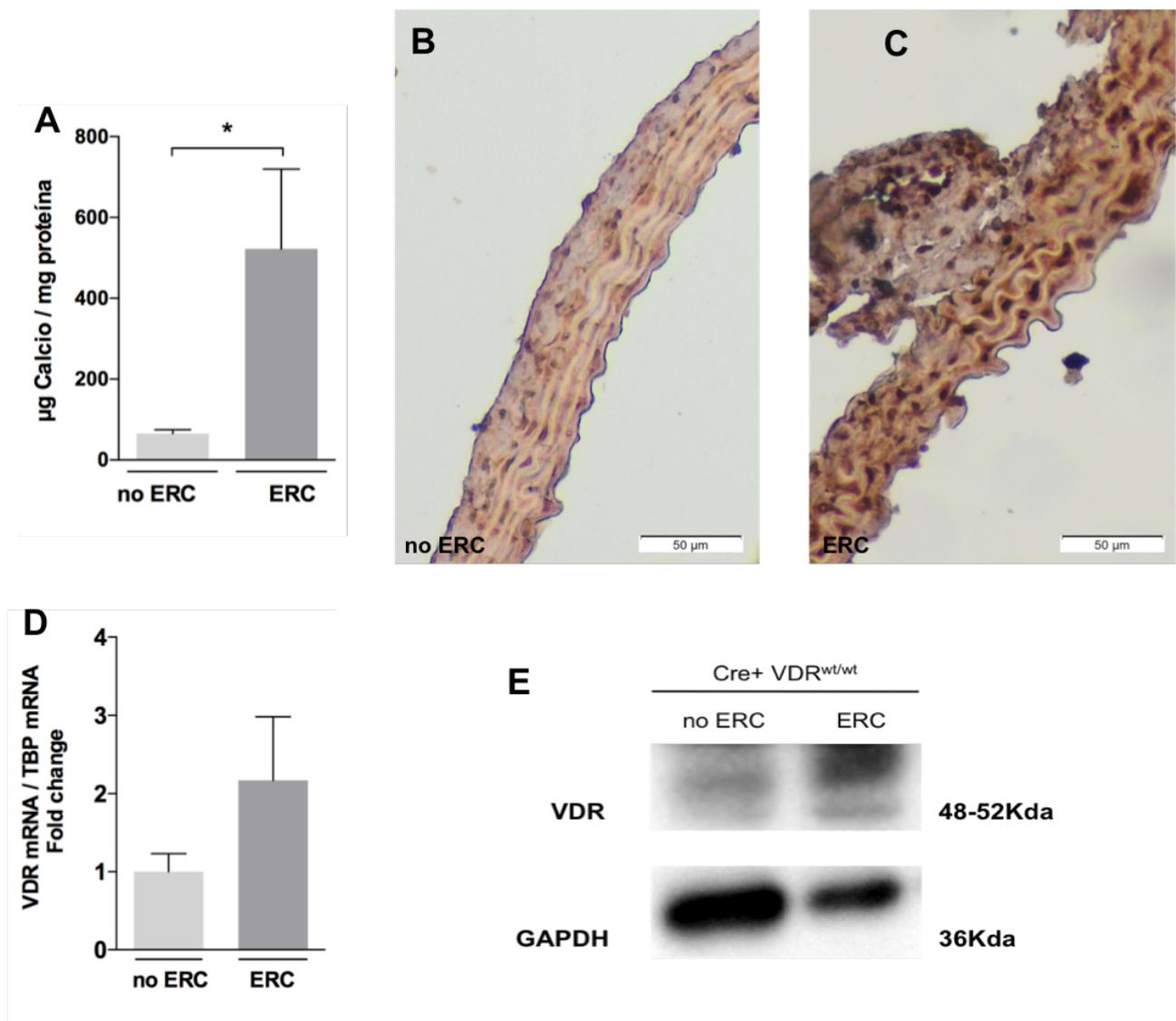
En primer lugar, se analizó la expresión de VDR de varias muestras de arterias epigástricas humanas (9 controles y 8 con enfermedad renal crónica) mediante inmunohistoquímica y se cuantificó mediante histoscore (*Figura 20b, 20c, 20d*). Disponíamos previamente de los resultados del análisis de niveles de calcificación vascular (*Figura 20a*), los cuáles eran elevados en pacientes con ERC. Las arterias calcificadas de pacientes con ERC y calcificación vascular mostraban más tinción inmunohistoquímica por VDR comparado con las arterias controles.



**Figura 20. Arterias procedentes de enfermos con ERC muestran un aumento de expresión de VDR. a)** Contenido de calcio en las arterias epigástricas de donantes sanos y de pacientes con ERC; **b)** inmunohistoquímica para VDR en arteria de donante sano y **c)** enfermo renal; **d)** cuantificación mediante histoscore de la tinción inmunohistoquímica para VDR. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.1.2 La expresión de VDR aumenta en las arterias calcificadas de ratones con ERC

A continuación comparamos la expresión de VDR en dos grupos de ratones, sanos y con ERC. Igual que en el caso de arterias humanas, los ratones con ERC presentaban unos niveles de calcio significativamente superiores a los controles (*Figura 21a*), así como un aumento de expresión de la proteína VDR, analizada por inmunohistoquímica y western blot (*Figura 21b, 21c, 21e*), y también un aumento de expresión del mRNA de VDR (*Figura 21d*).



**Figura 21. Incremento de la expresión de VDR en arterias calcificadas de ratón con ERC.** a) Cuantificación del calcio arterial mediante el método o-cresoltaleina complexona en ratones sanos y ratones con ERC ( $n=19$  controles,  $n=27$  ERC); Inmunohistoquímica de VDR en arterias de ratones b) sanos y c) con ERC (barra escala:  $50\mu\text{m}$ ); d) expresión relativa de mRNA de VDR en arterias mediante qPCR ( $n=10$  controles y  $n=22$  ERC) y e) imágenes representativas del western blot para VDR en CMLV en ratones sanos y con ERC.

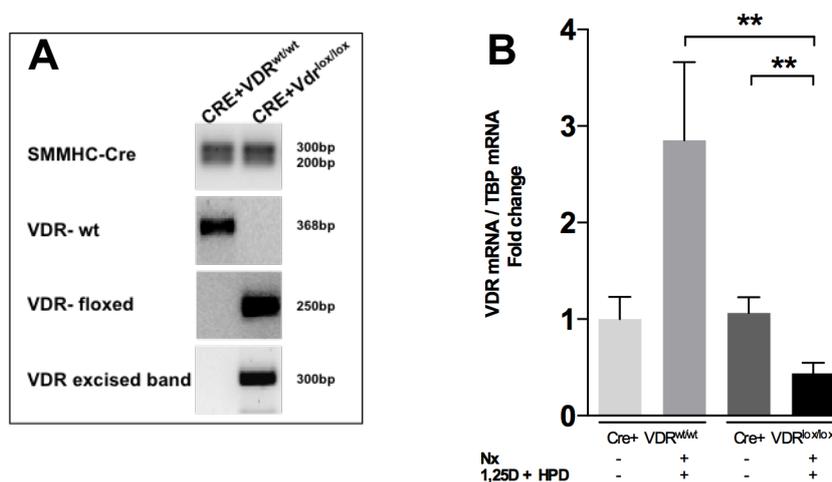
## 4.2 Generación del ratón KO condicional para VDR en CMLV y papel de VDR en el desarrollo de CV en ERC *in vivo*

### 4.2.1 Delección específica de VDR en las CMLV de los ratones KO condicionales

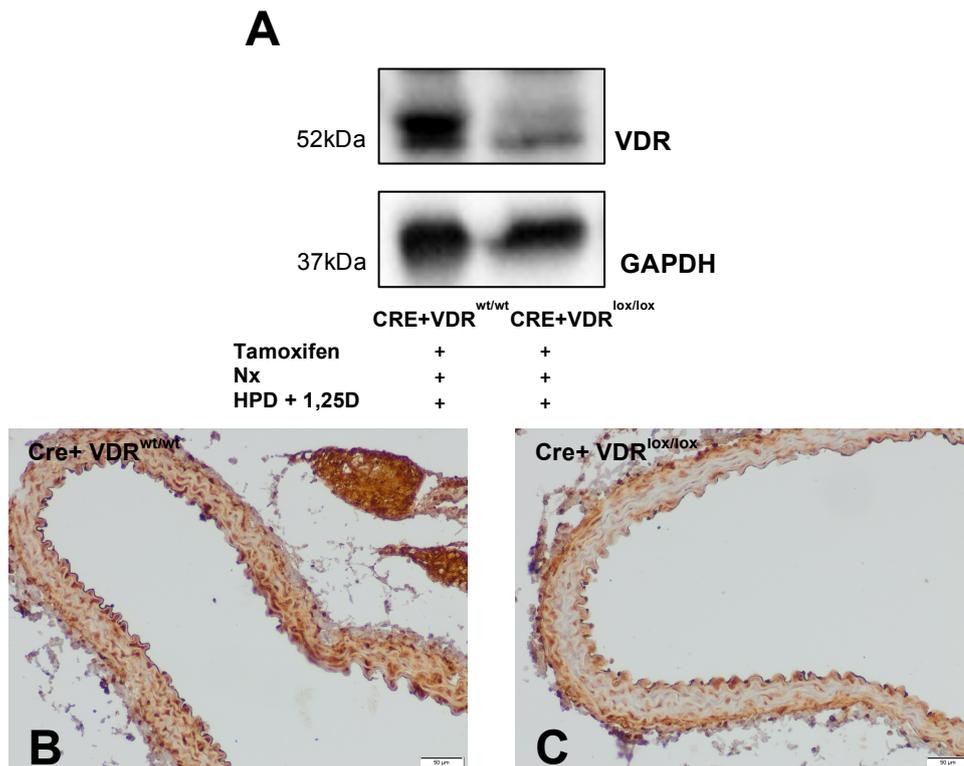
Una vez finalizado el experimento con los distintos grupos de ratones (sanos y con ERC) con los respectivos genotipos (Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> y Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup>), se sacrificaron y recogimos los órganos.

En primer lugar, verificamos la eliminación específica de VDR en las CMLV de las arterias de los ratones KO condicionales, inducida por *Tamoxifen*.

Se analizó el DNA, RNA y proteína de las arterias. Observamos que en los ratones con genotipo Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup> se había activado correctamente la Cre-recombinasa y que la expresión de VDR en CMLV estaba disminuida. Por PCR, observamos la aparición de la banda escindida en las muestras de arterias de Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup>, que nos confirma que ha habido eliminación del exón 2 de VDR, flanqueado por los dos LoXP (*Figura 22a*). En los ratones con genotipo Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> no podemos detectar esta banda, confirmándonos el genotipo (*Figura 22a*). Hemos detectado disminución de la expresión de VDR tanto a nivel de RNA, analizado mediante qPCR (*Figura 22b*) como a nivel de proteína, mediante western blot (*Figura 23a*) y inmunohistoquímica (*Figura 23b* y *23c*).



**Figura 22. Comprobación de la eliminación de VDR en CMLV en ratones CRE+ VDR<sup>lox/lox</sup> con Tamoxifen mediante a) análisis del DNA por PCR y b) análisis del RNA por qPCR. n= 7 (controles) o n=17-18 (ERC) ratones/grupo. \*p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*p<0,001.**

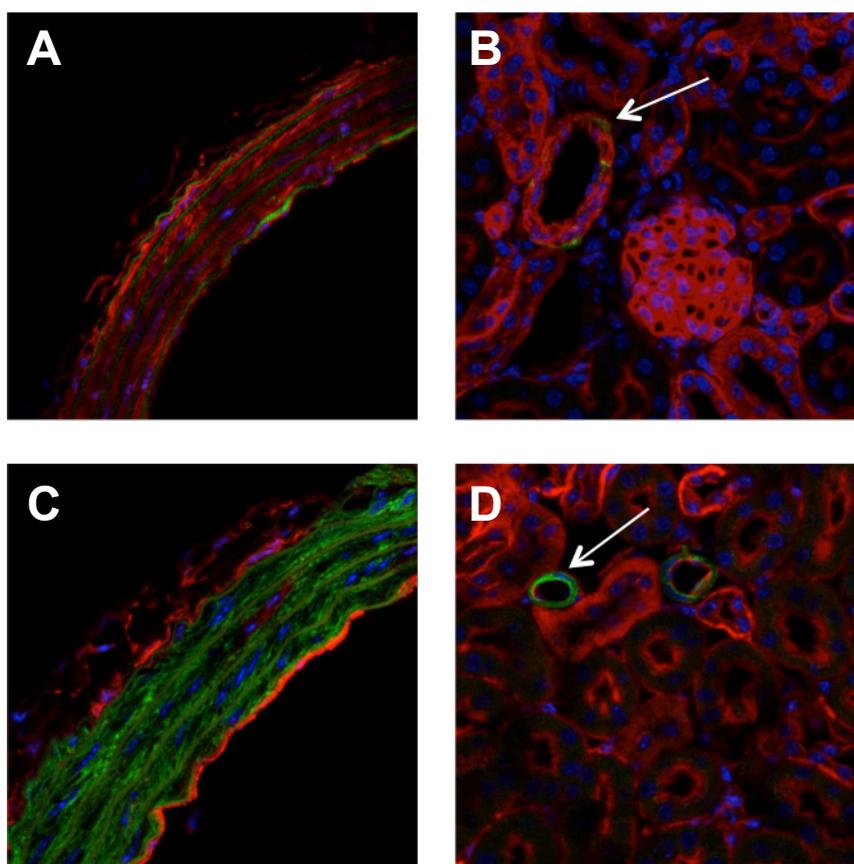


**Figura 23. Reducción de la expresión de la proteína VDR en arteria de ratón Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup> respecto a Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup>.** a) Western blot de VDR; b,c) inmunohistoquímica de VDR en cortes de parafina arteriales correspondiente a un ratón con genotipo b) Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> y c) CRE+ VDR<sup>lox/lox</sup>, ambos con administración de Tamoxifen.

Para confirmar la actividad específica de la Cre recombinasa, se analizaron las arterias y riñones de los ratones reporteros Myh11-creER<sup>T2</sup> mT/mG. Estos fueron tratados con la misma dosis de *Tamoxifen* que los ratones experimentales (1,5mg ratón/día durante 5 días) y después se analizó el cambio de color de fluorescencia en las células donde la proteína Cre-recombinasa está activada, en nuestro caso las CMLV. En éstas se produce la recombinación de la secuencia que se encuentra entre los dos LoxP reconocidos por la Cre-recombinasa y hay un cambio de expresión de fluorescencia roja a verde, confirmándonos que la Myh11-cre solo estaba activa en las CMLV.

Tal y como se indica en la *Figura 24*, en los ratones Myh11-creER<sup>T2</sup> mT/mG sin administrar *Tamoxifen* se observa fluorescencia roja en todos los tejidos analizados, riñón y arteria en nuestro caso, indicándonos que la Cre-recombinasa no está activa. En cambio, en los ratones Myh11-creER<sup>T2</sup> mT/mG a los que se les administró *Tamoxifen* se observa un cambio de expresión de fluorescencia roja a verde en las células de músculo liso vascular indicándonos que la Cre-recombinasa está activa en estas células. Por otro lado, se mantiene la fluorescencia roja en aquellas células donde la Cre-recombinasa no tiene efecto, como las células endoteliales de las arterias y también en las células

tubulares del riñón. En el caso del riñón podemos observar fluorescencia verde solo en los capilares.



**Figura 24. Activación específica de la Cre-recombinasa en CMLV.** Detección de fluorescencia mT en a) arteria y b) riñón de ratones Cre+ sin activación de la Cre recombinasa y detección del cambio de fluorescencia mT a mG en c) arteria y d) riñón de ratones Cre+ tratados con Tamoxifen 1,5 mg/día durante 5 días. Flecha: CMLV. Magnificación 40X.

#### 4.2.2 Generación del modelo de enfermedad renal crónica

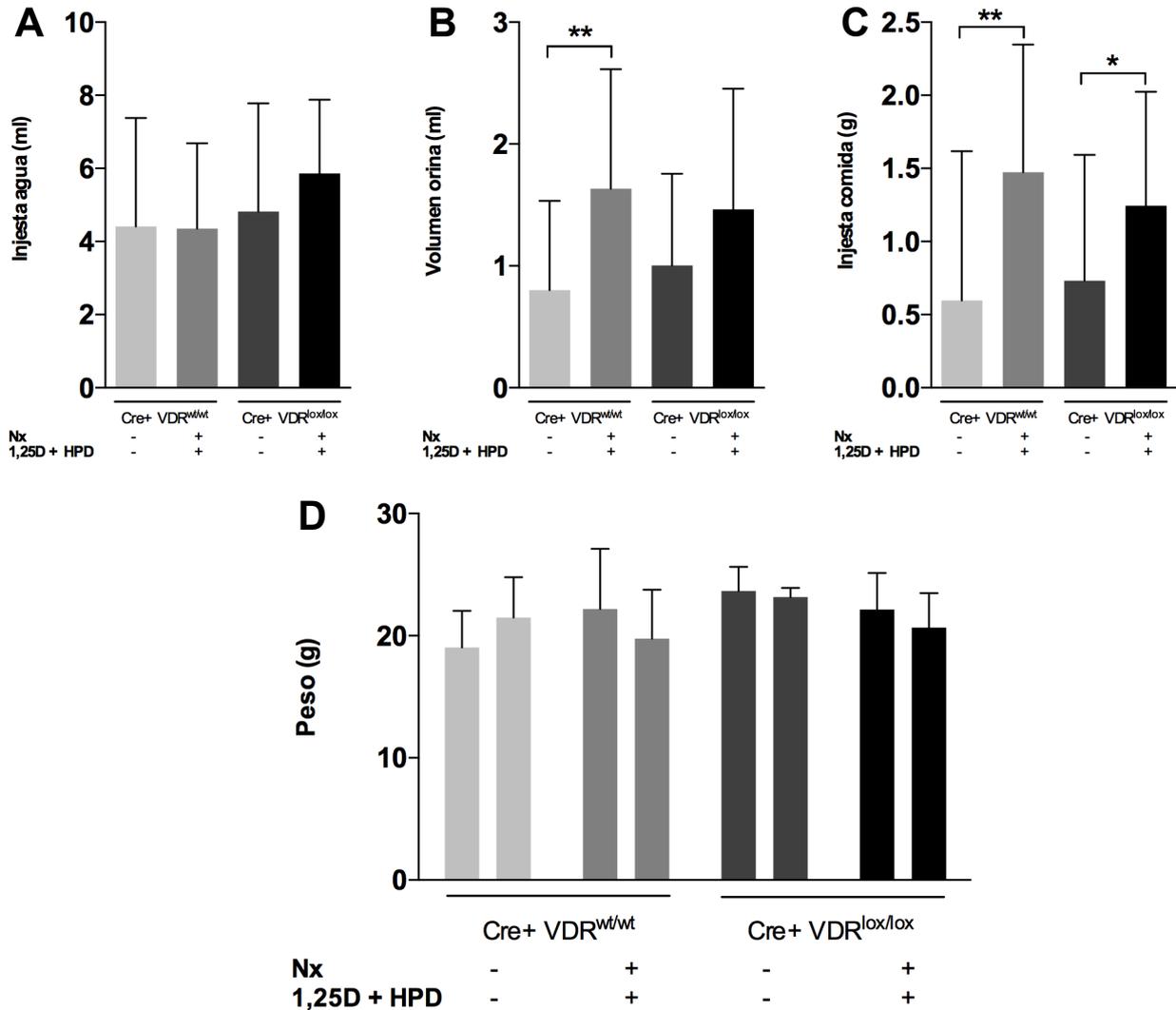
Para generar el modelo de enfermedad renal crónica, los ratones Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> y Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup> fueron sometidos a una nefrectomía subtotal y se alimentaron con una dieta alta en fósforo acompañada con administración de calcitriol durante dos meses para inducirles calcificación vascular.

Al final del experimento, se recogió la orina de 24 horas mediante jaulas metabólicas y suero mediante punción cardíaca. Se midió el volumen de orina a las 24h, la cantidad de agua y comida ingeridas, el calcio y fósforo en suero y orina y el BUN en suero.

En cuanto a la ingesta de agua (*Figura 25a*), no se ven diferencias significativas entre los grupos con enfermedad renal crónica y los controles, se aprecia una tendencia a aumentar la ingesta de agua en el caso de los ratones del grupo Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup> con

enfermedad renal crónica, aunque no es significativa. Si nos fijamos en el volumen de orina (*Figura 25b*), este es superior en los dos grupos de ratones con enfermedad renal crónica respecto a sus controles.

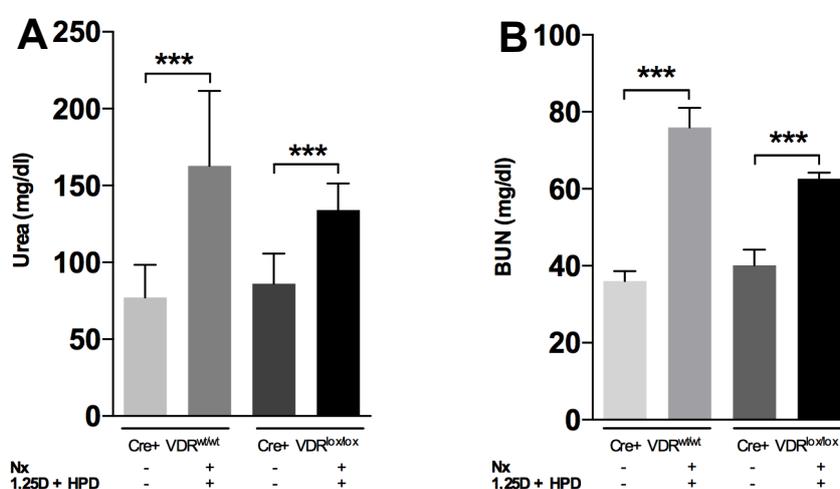
En cuanto a la ingesta de comida, los ratones de los dos grupos nefrectomizados comen ligeramente más que los ratones sanos (*Figura 25c*). Aun así, los ratones con enfermedad renal crónica pierden un poco de peso durante los dos meses de dieta y administración de calcitriol, comparado con los controles (*Figura 25d*).



**Figura 25. Ingesta de agua y comida, volumen de orina y variaciones de peso en los distintos grupos experimentales en el inicio de la dieta y al finalizar el experimento, dos meses después. n= 6-17 (controles) o n=26-44 (ERC) ratones/grupo.**

A continuación, para analizar la función renal se midió la urea y BUN en suero.

En la *Figura 26* observamos que los dos grupos de ratones que fueron sometidos a una nefrectomía subtotal tienen niveles significativamente más elevados de urea en sangre (>130 mg/dl), que los respectivos grupos de ratones sin nefrectomía, con valores inferiores a 100 mg/dl. La urea se produce por la descomposición de la proteína y se excreta en la orina, pero si los riñones no funcionan bien, esta aumenta en sangre. A partir de los resultados de urea calculamos la cantidad de nitrógeno en la sangre (BUN) que proviene de la urea. Estos son también significativamente mayores en los ratones nefrectomizados (>60 mg/dl) respecto los controles (<40 mg/dl). El aumento de nitrógeno ureico en sangre se usa como indicador de la enfermedad renal crónica.



**Figura 26. Análisis de urea y BUN en suero.**  $n = 5-15$  (controles) o  $n = 20-27$  (ERC) ratones/grupo.

Se analizaron también los niveles de calcio y fósforo en suero (*Tabla 17* y *Figura 27a, 27b*) y se comprobó que los ratones que padecían enfermedad renal crónica, de ambos genotipos Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> y Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup>, tenían aumentos significativos de los niveles tanto de calcio como fósforo en suero.

Seguidamente, se midieron los niveles de calcio y fósforo en orina (*Tabla 17*). Los valores de excreción de fósforo en orina (*Figura 27c*) se ven aumentados en los dos grupos de ratones con enfermedad renal crónica, siendo significativamente superiores a sus respectivos controles. En el caso de la excreción de calcio en orina (*Figura 27d*), en los ratones Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> con ERC, estos sí que tienen niveles más altos respecto sus controles, en cambio los ratones Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup> con ERC no presentan niveles significativamente distintos a sus controles.

	Cre+ VDR <sup>wt/wt</sup>		Cre+ VDR <sup>lox/lox</sup>	
	Control	Tx+Nx+1,25D+HPD	Control	Tx+Nx+1,25D+HPD
<b>Fósforo suero</b>	6,62±0,44 mg/dl	11,57± 0,81 mg/dl	6,16 ± 0,56 mg/dl	10,53 ± 0,75 mg/dl
<b>Calcio suero</b>	8,85 ± 0,05 mg/dl	9,88 ± 0,16 mg/dl	8,47± 0,23 mg/dl	9,55 ± 0,18 mg/dl
<b>Fósforo orina</b>	0,68 ± 0,2 mg/día	3,9 ± 0,42 mg/día	1,29 ± 0,19 mg/día	3,16 ± 0,30 mg/día
<b>Calcio orina</b>	0,056 ± 0,016 mg/día	0,22 ± 0,03 mg/día	0,12 ± 0,24 mg/día	0,14 ± 0,02 mg/día

Tabla 17. Valores de fósforo y calcio en suero y orina.

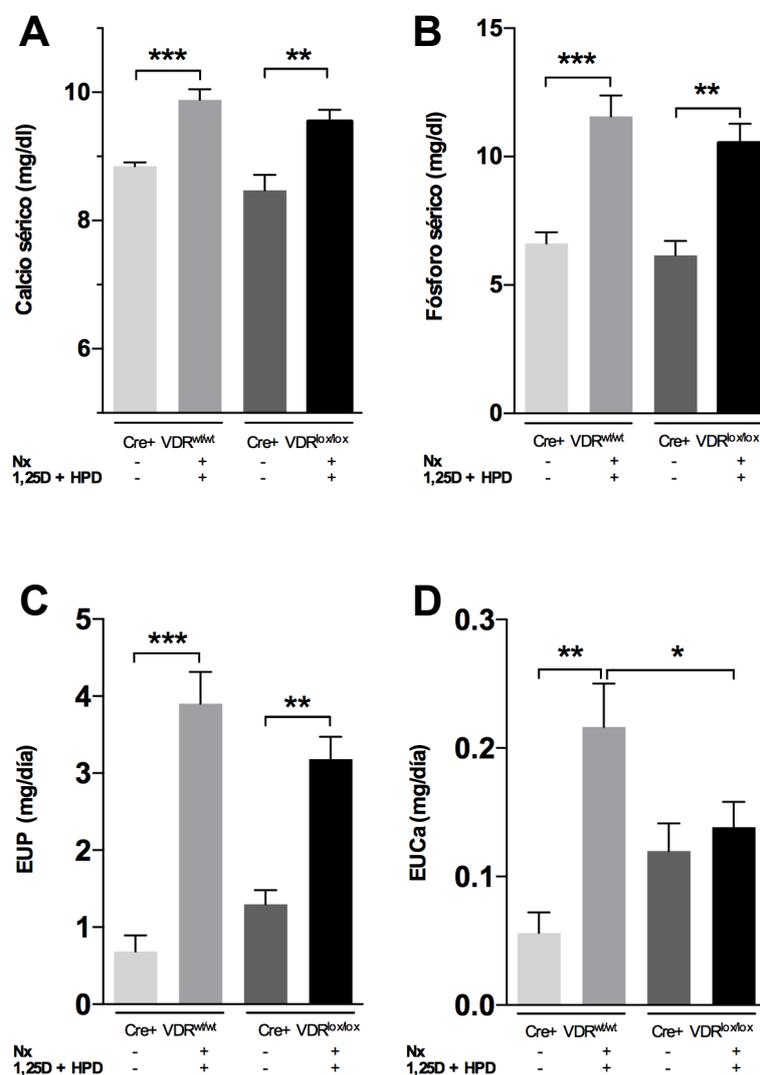
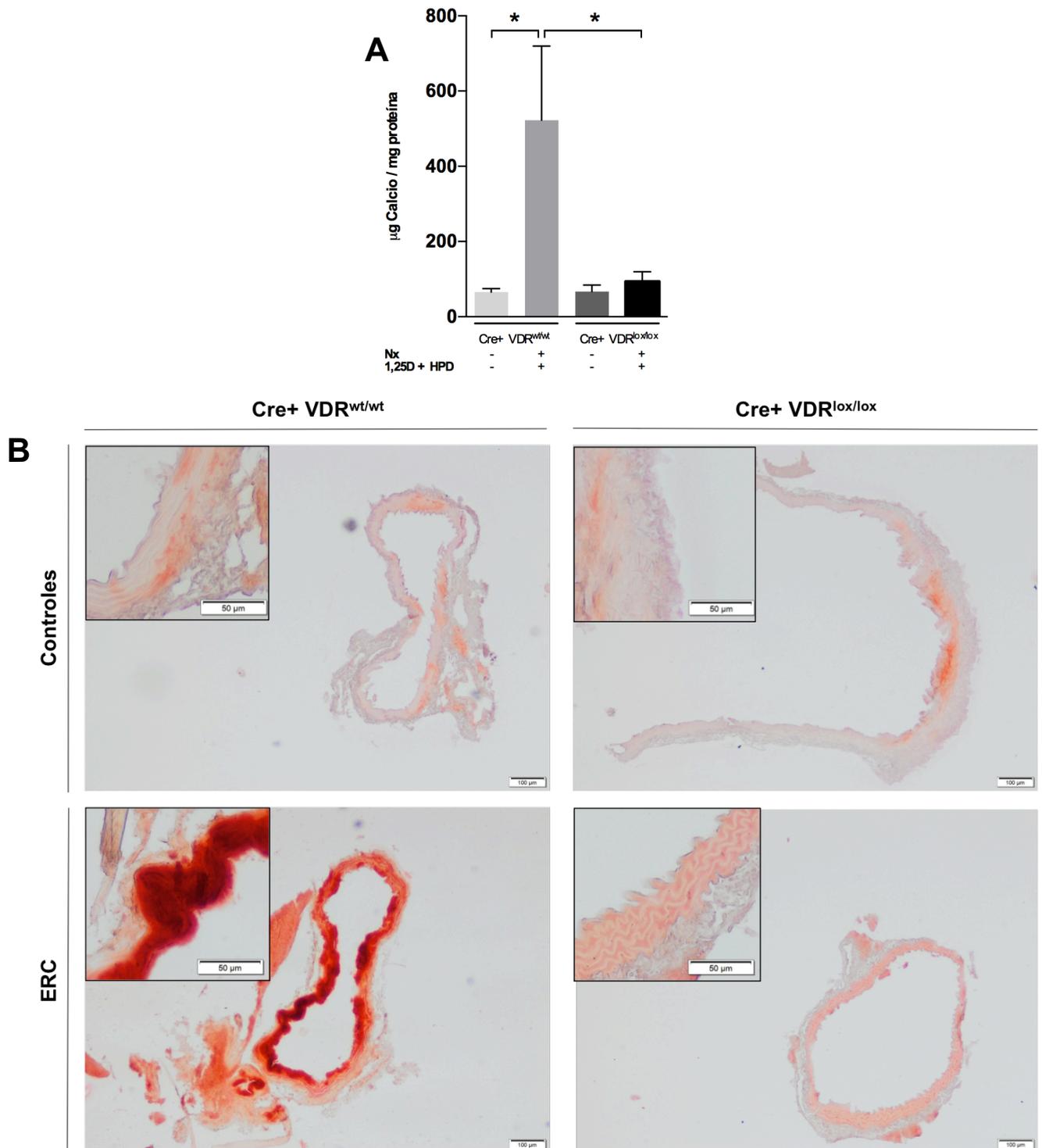


Figura 27. Análisis bioquímico en suero y orina en el modelo de ratón con ERC (Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> y Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup>) y sus respectivos controles: a) Niveles de calcio y b) fósforo en suero. Excreción urinaria de c) fósforo y d) calcio en ratones controles y ratones con ERC de los distintos genotipos (Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> y Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup>). Los resultados se expresan como promedio ± SEM. n=6-15 ratones/grupo (controles) y n=19-26 ratones/grupo (ERC). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

### 4.2.3 La ausencia de VDR de CMLV previene la calcificación vascular en enfermedad renal crónica

Para ver la importancia de la presencia de VDR en las células de musculo liso vascular en el proceso de calcificación vascular durante la enfermedad renal crónica, se midió el calcio en las arterias de distintos genotipos de ratones Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> y Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup>, controles y con enfermedad renal crónica. En primer lugar, mediante el método o-cresolftaleína complexona observamos un incremento significativo de calcio en el grupo de ratones con enfermedad renal crónica y con presencia de VDR en las CMLV (Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup>), en comparación con los respectivos controles sanos. Además, estos niveles también son significativamente más elevados que el grupo de ratones con enfermedad renal crónica pero que tienen VDR eliminado específicamente en las CMLV (CRE+ VDR<sup>lox/lox</sup>) (*Figura 28a*). Estos resultados fueron también verificados mediante la tinción Rojo de Alizarina, la cual tiñe los depósitos de calcio de las secciones de arteria en color rojo. En la *Figura 28b* observamos las fotos representativas de cada grupo en los que, correspondiendo con los resultados de la cuantificación por o-cresolftaleína, los ratones con ERC y genotipo Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> tienen depósitos de calcio mucho más visibles que el grupo de ratones también enfermos pero con genotipo Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup>, con niveles de tinción similares a los controles.



**Figura 28. Efecto de la presencia de VDR en la calcificación vascular en CMLV en ERC.** a) Cuantificación del calcio arterial mediante el método o-cresolfataleína complexona y b) imágenes representativas de la tinción rojo de alizarina. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM.  $n=15-19$  ratones/grupo controles y  $n=26-27$  ratones/grupo ERC. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .

#### 4.2.4 Efecto de la ausencia de VDR en CMLV en la expresión de marcadores osteogénicos

##### Análisis de marcadores osteogénicos a nivel de mRNA

Una vez habíamos comprobado que existían diferencias en cuanto a los niveles de calcificación vascular entre ratones de los distintos genotipos (Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> y Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup>), ambos con enfermedad renal crónica, seguimos con el estudio de marcadores de calcificación para detectar cuáles de ellos estaban implicados en este proceso. En primer lugar hicimos un estudio de los niveles de mRNA en CMLV de distintos marcadores de calcificación descritos, como son: Runx2, OPN, osterix, MGP, lamin A, SOST, BMP2, Alp y SM22actin.

En los marcadores de calcificación como osterix (*Figura 29d*), MGP (*Figura 29e*), Fosfatasa alcalina (Alp) (*Figura 29g*), BMP2 (*Figura 29b*) o SM22actin (*Figura 29i*) no observamos diferencias significativas entre los grupos de ratones control y los ratones con enfermedad renal crónica ni tampoco entre los Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> y Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup> con ERC. Solo en el caso de MGP se ve una ligera tendencia a incrementar en ambos grupos con ERC respecto a los controles.

El factor de transcripción, Runx2 (*Figura 29a*) se ve aumentado en las arterias de los dos grupos de ratones con enfermedad renal crónica comparado con los respectivos controles, sin diferencias entre los Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> y Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup> con ERC, aunque, de estos, solo los ratones con genotipo Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> habían demostrado una calcificación vascular significativa.

Respecto a lamin A se ve un incremento de su expresión en las arterias calcificadas de ratones Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> con ERC comparando con los ratones sanos, pero sin significación estadística. También podemos ver una tendencia a disminuir los niveles de lamin A en las arterias no calcificadas de ratones Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup> con ERC (*Figura 29c*).

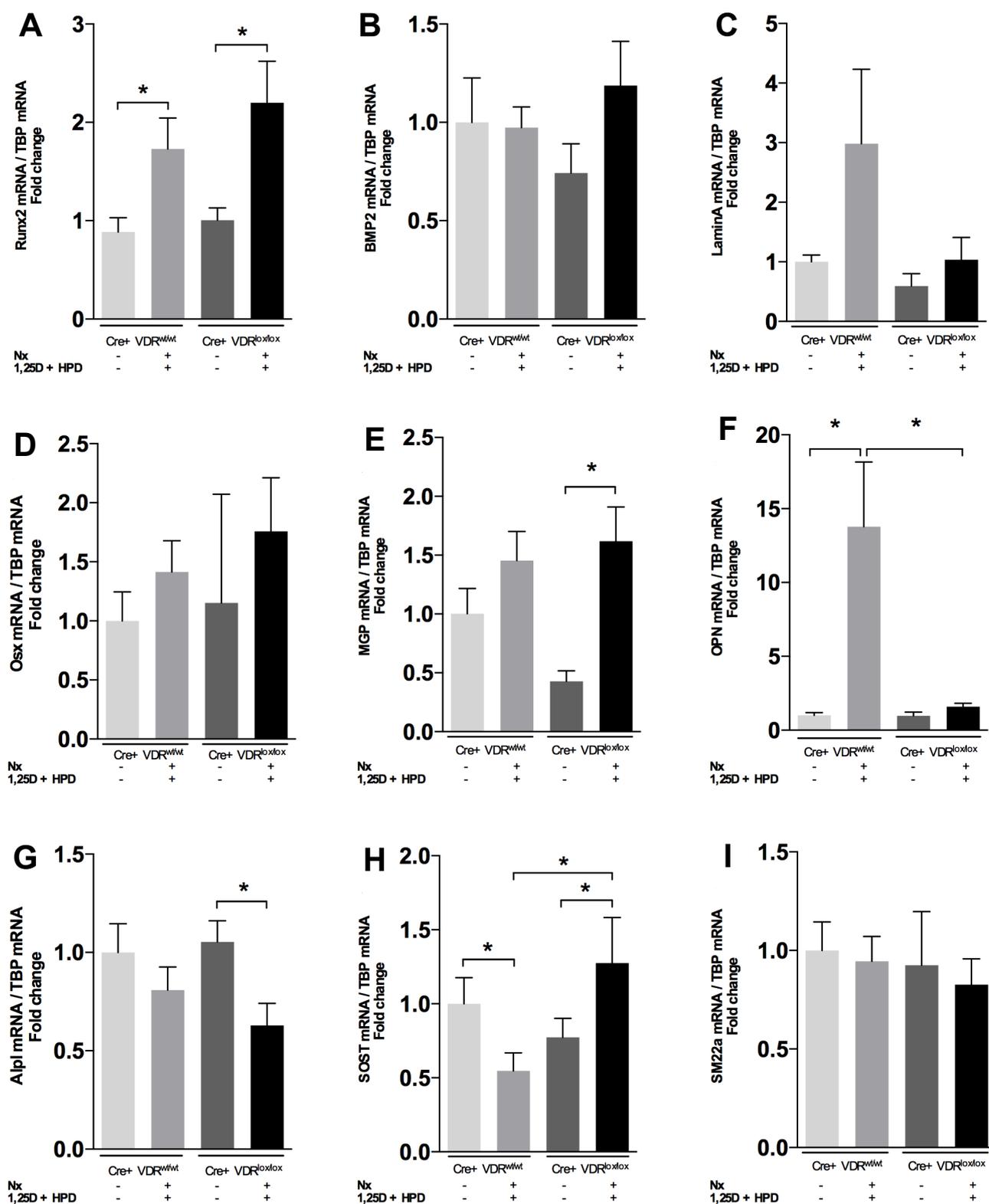
Además, podemos ver diferencias significativas en la expresión de esclerostina (SOST), inhibidor de la CV, ya que sus niveles disminuyen en arterias calcificadas de ratones Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> con ERC comparado con sus controles. Además se produce una recuperación de

la expresión arterial de SOST en ratones Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup> con ERC llegando a unos niveles de expresión muy similares a los controles (*Figura 29h*).

Si nos fijamos en la expresión de Osteopontina (OPN), esta sí que sufre un aumento significativo en las arterias calcificadas de los ratones Cre+ VDR<sup>w/wt</sup> con ERC respecto a los ratones Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup> con ERC y ausencia de CV (*Figura 29f*). Este resultado nos indica que Osteopontina podría tener un papel fundamental en el desarrollo de la calcificación vascular mediada por VDR, ya que solo aumenta en el grupo de ratones donde previamente habíamos detectado calcificación arterial. Además, se confirma una correlación (*Tabla 18*) entre las variables de contenido de calcio arterial y la expresión de OPN. ( $r^2 = 0,2078$ ;  $r = 0,455$ ;  $p = 0,033$ ).

	mg calcio / µg proteína	mRNA OPN expresión
<b>Cre+ VDR<sup>w/wt</sup>; control</b>	61,26	1,11
<b>Cre+ VDR<sup>w/wt</sup>; ERC</b>	8.363,05	2,46
<b>Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup>; control</b>	32,47	0,92
<b>Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup>; ERC</b>	25,25	0,27

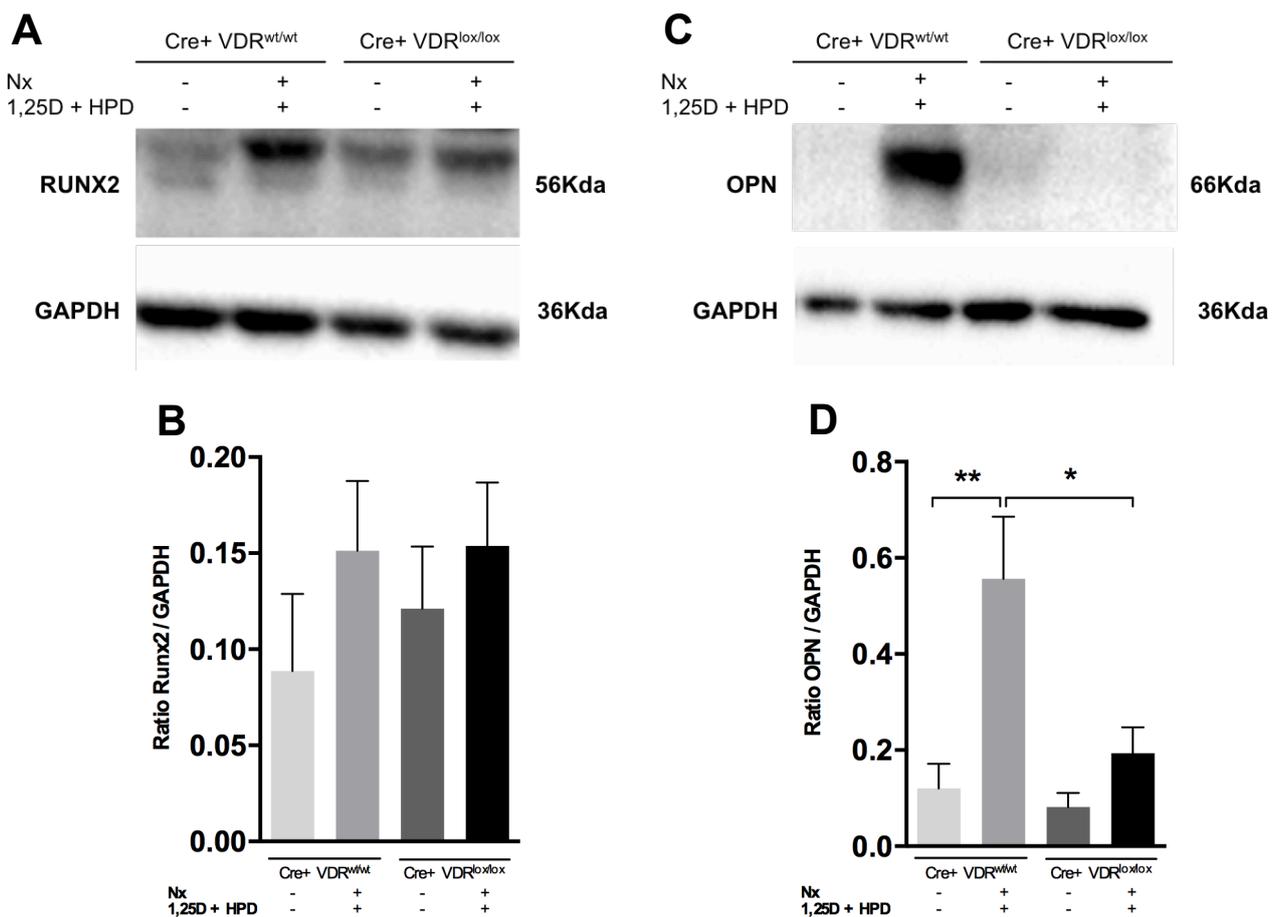
**Tabla 18. Valores promedio de la concentración de calcio arterial (mg calcio / µg proteína) y de expresión de mRNA de OPN (expresión relativa a los niveles correspondientes al grupo control).**



**Figura 29. Expresión arterial en los distintos grupos de estudio de mRNA de marcadores osteogénicos. a)** Runx2, **b)** BMP2, **c)** Lamin A, **d)** osterix, **e)** MGP, **f)** OPN, **g)** Alpl, **h)** SOST y **i)** SM22a. Los valores están calculados en referencia a los niveles de RNA de TBP y se expresan de forma relativa a los niveles correspondientes al grupo control Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup>. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM.  $n=4-15$  ratones/grupo controles y  $n=8-38$  ratones/grupo ERC. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .

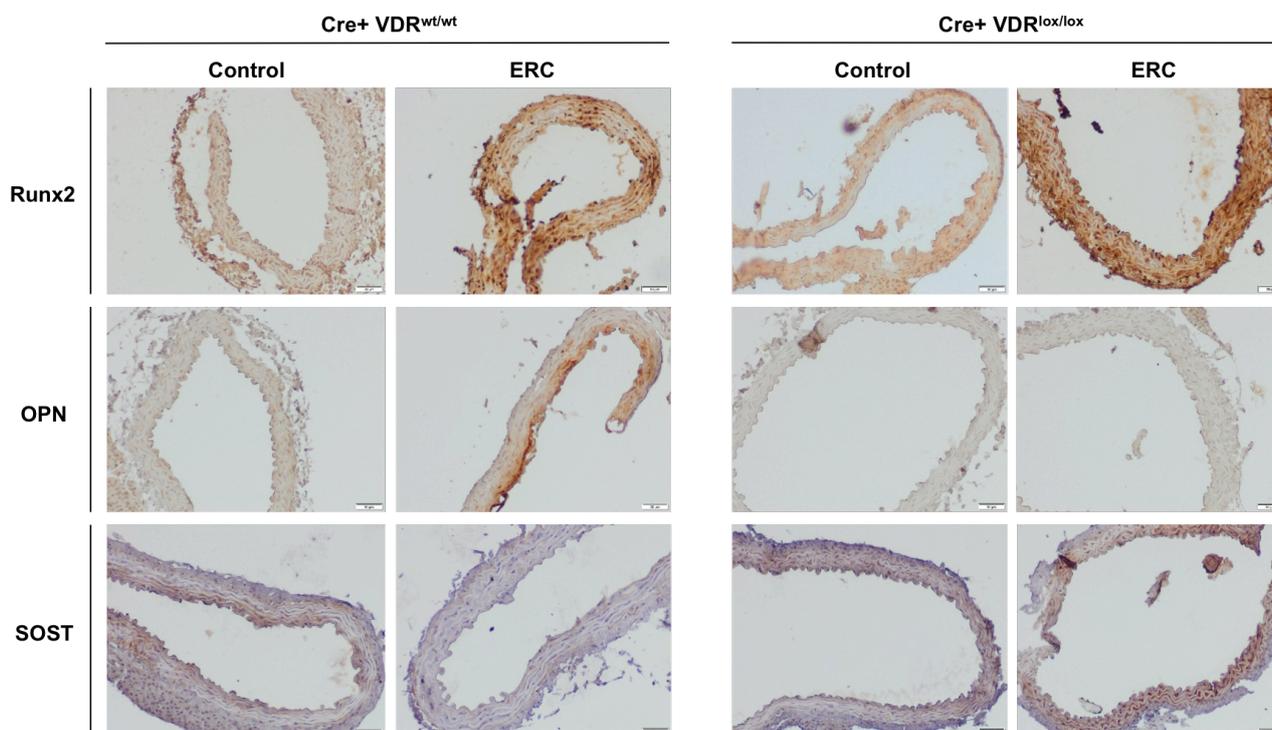
## Análisis de marcadores osteogénicos a nivel de proteína

En aquellos genes que se vieron diferencias significativas en la expresión de mRNA entre los distintos grupos (OPN, Runx2, SOST), seguidamente, se analizó la expresión de proteínas mediante western blot y/o inmunohistoquímica para confirmar los resultados de expresión génica. En cuanto a la expresión de Runx2, se ve incrementada en los dos grupos de ratones con ERC comparados con los grupos control, sin diferencias entre genotipos, confirmando los resultados del análisis de RNA (*Figura 30a, 30b y Figura 31*). En el caso de la expresión de OPN, también se confirman los resultados mostrados anteriormente en las qPCRs, con un aumento de expresión significativa de OPN en arteria solo en el grupo de ratones con ERC y genotipo Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> respecto a sus correspondientes controles y también al grupo de ratones con ERC sin VDR en CMLV (Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup>), (*Figura 30c, 30d y Figura 31*).



**Figura 30. Análisis de expresión de la proteína Runx2 y OPN en arterias.** Western blot representativo de Runx2 (a) y OPN (c) y las respectivas cuantificaciones por densitometría de las bandas de Runx2 (b) y OPN (d). Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM. n (Runx2) = 12-13 ratones/grupo controles y n=18-22 ratones/grupo en ERC. n (OPN) = 9 ratones/grupo. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Finalmente, mediante inmunohistoquímica confirmamos la disminución de expresión de esclerostina (SOST) arterial en los ratones Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> con ERC (*Figura 31*), comparando con sus controles, así como la recuperación de su expresión en los Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup> con ERC (*Figura 31*), indicando algún posible efecto protector de ésta frente la calcificación vascular.



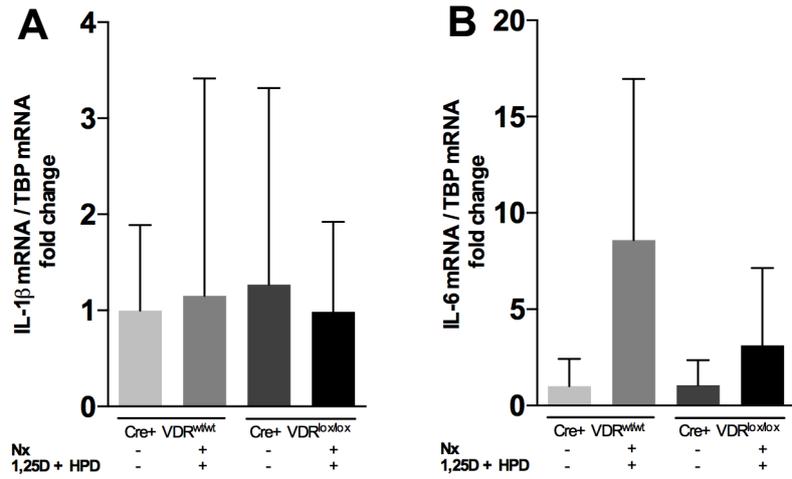
**Figura 31. La ERC y la calcificación vascular promueven cambios de expresión en las proteínas Runx2, OPN y SOST.** Inmunohistoquímica representativa de muestras arteriales en parafina de Runx2, OPN y SOST en los distintos grupos de ratones, controles y con ERC (de ambos genotipos Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> y Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup>). Barra de escala = 50 $\mu$ M.

#### 4.2.5 Efecto de la ausencia de VDR en CMLV en la inflamación arterial en enfermedad renal crónica

En algunas muestras se analizaron dos marcadores de inflamación, IL-6 y IL-1 $\beta$  (*Figura 32*), ya que se ha relacionado mucho la hiperfosfatemia, VDR y también OPN con cascadas inflamatorias.

En IL-1 $\beta$  no se detectaron diferencias significativas pero en el caso de IL-6 si que se observa una tendencia a aumentar en los ratones con ERC, especialmente aquellos con calcificación vascular, los del genotipo Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup>.

Aun así el tamaño muestral de cada grupo no es suficiente para poder obtener unos resultados significativos.



**Figura 32. Expresión relativa de a) IL-1 $\beta$  y b) IL-6 en CMLV de los distintos grupos de ratones experimentales.**  
 Los valores están calculados en referencia a los niveles de TBP y se expresan en forma relativa a los niveles correspondientes al grupo control Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup>. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM. n= 6 ratones/grupo controles y 5 ratones/grupo ERC. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

### 4.3 Análisis del efecto de la ausencia de VDR en CMLV en calcificación vascular *In vitro*

Para verificar *In vitro* los resultados obtenidos *In vivo*, se usaron cultivos primarios de CMLV de ratones VDRko y sus respectivos controles VDRwt. En primer lugar, cuando teníamos ya las células, fue necesario comprobar que las células en cultivo eran células de músculo liso vascular y que no había contaminación con otros tipos celulares presentes en las arterias. Para ello se hizo una inmunofluorescencia de actina de músculo liso (Figura 33), principal componente del esqueleto de las células de músculo liso vascular.

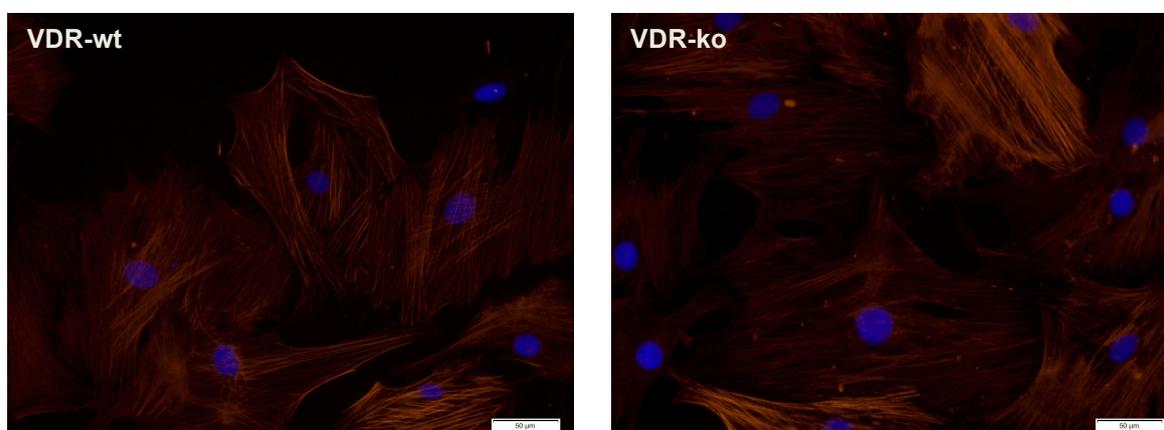


Figura 33. Inmunofluorescencia para actina de músculo liso vascular en cultivos primarios de células de músculo liso vascular de ratón VDRwt y VDRko. Barra de escala=50µM.

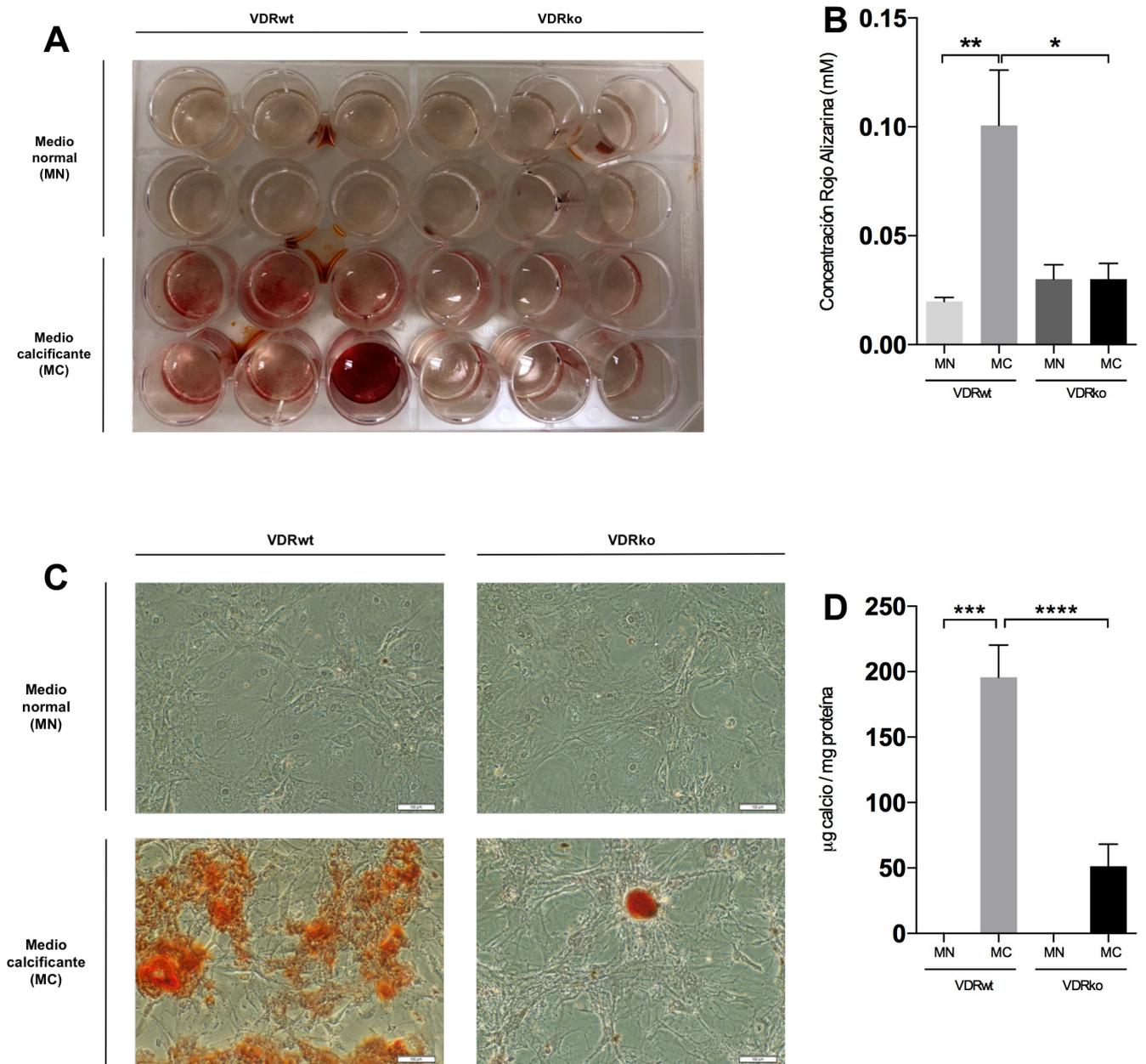
#### 4.3.1 Estudio de calcificación en CMLV VDRwt y VDRko

A continuación se hicieron los experimentos de calcificación con las condiciones determinadas para calcificar y los respectivos controles, después de distintos ensayos previos. Estas fueron:

- *Medio normal (MN)*: medio DMEM + 5% FBS (suero fetal bovino)
- *Medio de calcificación (MC)*: medio DMEM + 10mM  $\beta$ -glicerofosfato ( $\beta$ gp) + 6mM  $\text{CaCl}_2$  + 5% NRS (suero rata normal).

Los tratamientos se realizaron durante 6 días y a los 3 días se cambiaron los medios.

En primer lugar, mediante la tinción Rojo de Alizarina, que tiñe los depósitos de calcio, pudimos comprobar una mayor tinción en las células VDRwt en comparación con las células VDRko (Figura 34a, 34c).



**Figura 34. Detección de depósitos de calcio en CMLV.** a) Visualización a nivel macroscópico de la tinción Rojo de Alizarina; b) cuantificación colorimétrica de la tinción, c) visualización mediante microscopio de contraste de fases de los depósitos de calcio en CMLV VDRwt y VDRko tratadas con MN y MC (Escala= 100µM) y d) cuantificación química del calcio mediante el método o-cresoltaleína complexona(n=8).

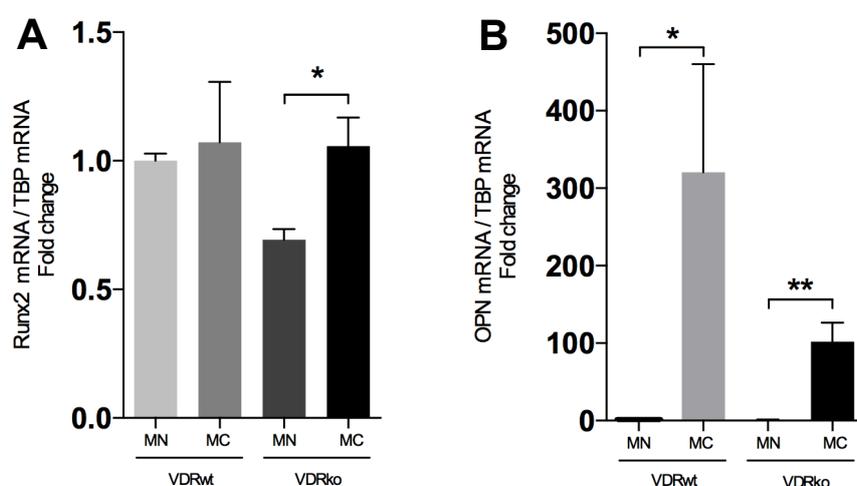
A continuación se cuantificó colorimétricamente el rojo de la tinción extraído mediante ácido acético y posteriormente neutralizado con hidróxido de amonio, tal como comprobamos en las imágenes, las células con genotipo VDRwt presentan mayor cantidad de calcio (Figura 34b). También se cuantificó por el método de o-cresolftaleína, en cuatro experimentos independientes con duplicados en cada uno. En los resultados, igual que mediante alizarina, se detecta una mayor cantidad de calcio en las CMLV VDRwt que en las CMLV VDRko, ambas con medios calcificantes (Figura 34d), con diferencias significativas entre los distintos genotipos.

#### 4.3.2 Análisis de genes osteogénicos en experimentos de calcificación *In vitro*

##### Análisis de marcadores osteogénicos a nivel de mRNA

En el análisis de expresión de mRNA *in vitro* observamos que la expresión de Runx2 no aumenta en las células VDRwt en condiciones de calcificación (Figura 35a), mientras que en las VDRko sí que sube en condiciones calcificantes comparado con sus respectivos controles. (Figura 35a).

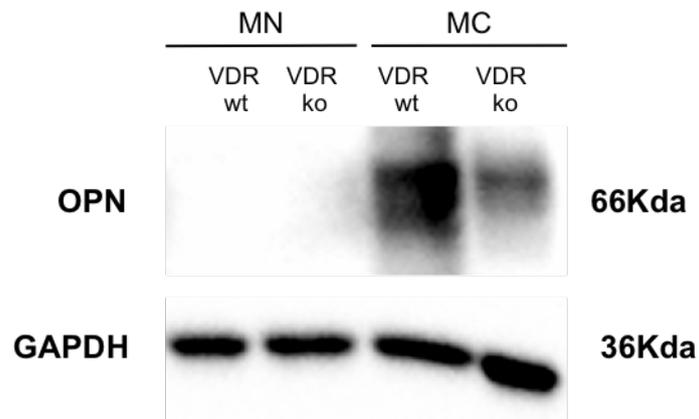
En el caso de osteopontina, los medios de calcificación indujeron un marcado incremento de la expresión de mRNA en CMLV VDRwt comparadas con sus respectivos controles (Figura 35b), mientras que la ausencia de VDR redujo el aumento inducido por el medio calcificante (Figura 35b). Así, estos resultados demuestran que una ausencia de VDR en CMLV protege frente el desarrollo de la calcificación vascular *in vitro*, y que este efecto podría estar mediado por un menor aumento de los niveles de OPN.



**Figura 35. Análisis de la expresión de mRNA de Runx2 y OPN en CMLV con MN y MC.** Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM de 2 o 4 experimentos independientes hechos en duplicado ( $n = 4-8$  grupo) en Runx2 y OPN, respectivamente. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

### Análisis de marcadores osteogénicos a nivel de proteína

Los resultados de expresión de mRNA de OPN se verificaron mediante el análisis de expresión de la proteína por western blot. Confirmando los resultados del mRNA, detectamos un aumento significativo en la expresión de la proteína OPN en las células VDRwt con MC en comparación con las VDRwt controles, mientras que la ausencia de VDR en las CMLV incubadas con MC revierte la expresión de OPN inducida por MC (Figura 36).



**Figura 36. Western blot representativo de OPN en células VDRwt y VDRko tratadas con MN y MC. Los resultados se normalizaron respecto la expresión de GAPDH. n= 4 muestras / grupo.**

---

## 4.4 Implicación de microRNAs en la CV mediada por VDR *in vivo* e *in vitro*

---

### 4.4.1 Estudio de microRNAs *in vivo*

Debido a su importancia actual y su implicación en muchas funciones celulares, se estudiaron algunos microRNAs para comprobar si estos podrían estar implicados en la calcificación vascular mediada por VDR en ERC.

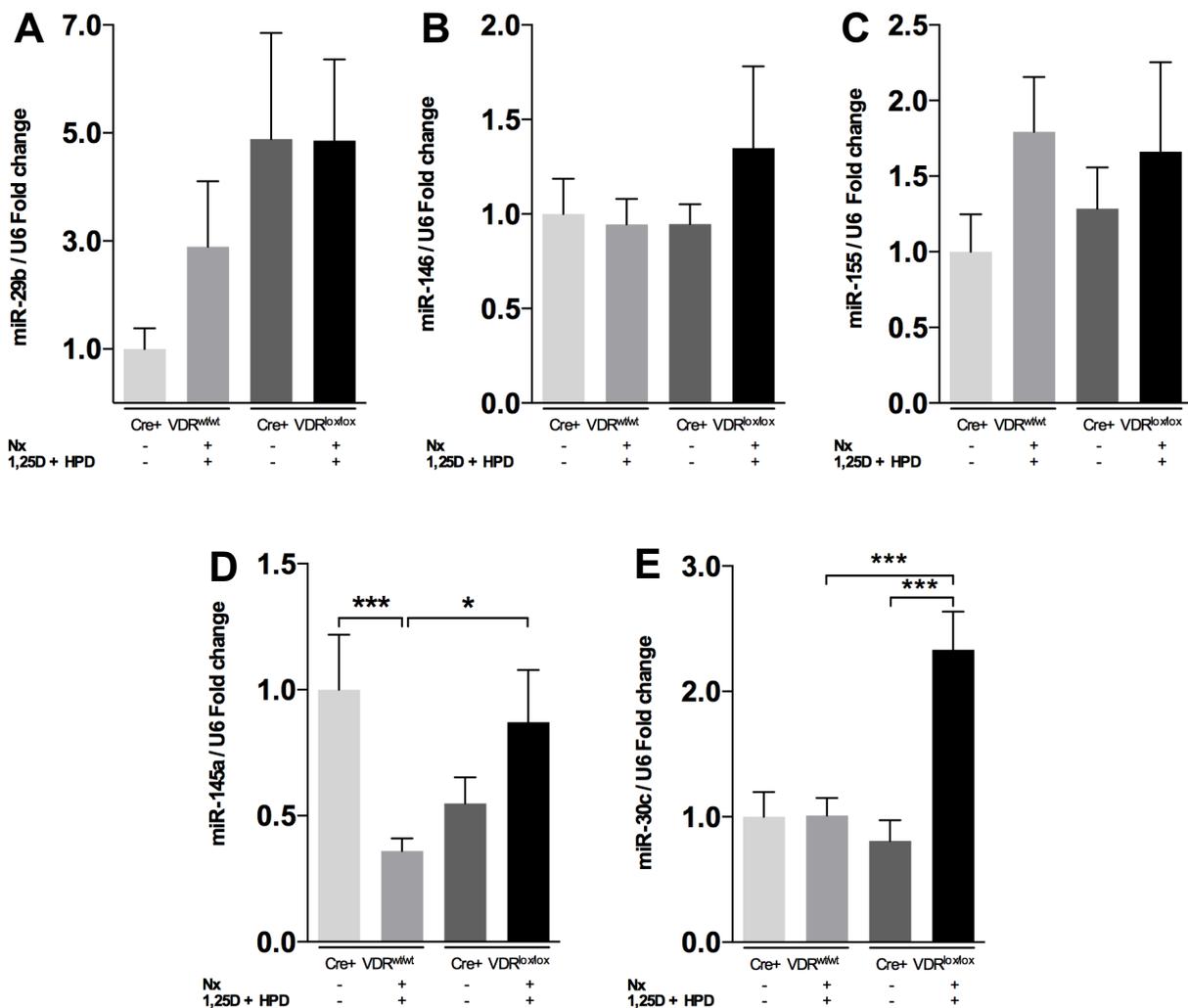
En primer lugar, se seleccionaron cinco microRNAs en base a la literatura, que se ha descrito que están implicados en la calcificación vascular y que están regulados por vitamina D y su receptor VDR. Son los siguientes:

- miR-29b
- miR-30c
- miR-145a
- mir-146a
- miR-155

A continuación, se analizó la expresión de estos cinco miRNAs en las arterias de los distintos grupos de ratones mediante qPCR.

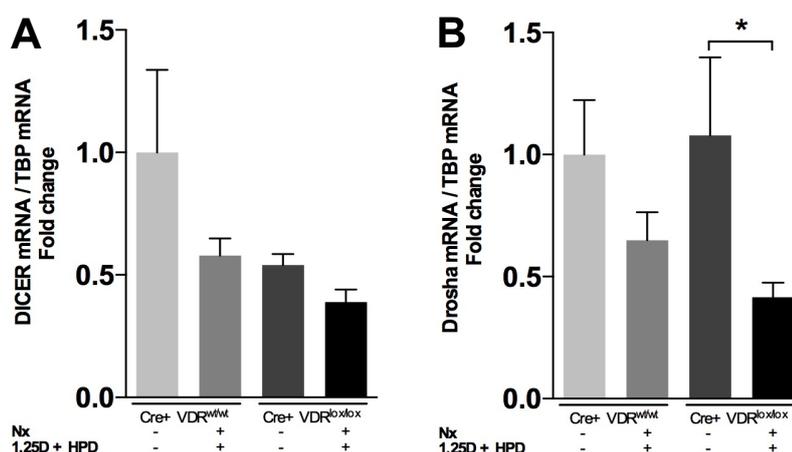
La ERC y CV no tuvieron efecto en la expresión del miR-146a (*Figura 37b*) y miR-30c (*Figura 37e*) en ratones Cre<sup>+</sup> VDR<sup>wt/wt</sup> comparado con sus controles respectivos. Sin embargo, observamos un incremento en la expresión de dichos miRNAs en ratones Cre<sup>+</sup> VDR<sup>lox/lox</sup> con ERC y CV comparando con sus controles sanos (*Figura 37b* y *37e*). La diferencia mencionada era significativa respecto al miR-30c. El miR-155 demostró una tendencia a incrementar en las arterias tanto de Cre<sup>+</sup> VDR<sup>wt/wt</sup> como de Cre<sup>+</sup> VDR<sup>lox/lox</sup> con ERC comparando con los controles correspondientes (*Figura 37c*).

Respecto al miR-145a, observamos una disminución significativa en su expresión arterial en los ratones Cre<sup>+</sup> VDR<sup>wt/wt</sup> con ERC que presentan CV en comparación con sus respectivos controles, y también una recuperación de su expresión en los ratones Cre<sup>+</sup> VDR<sup>lox/lox</sup> con ERC sin CV (*Figura 37d*).



**Figura 37. Expresión relativa de los microRNAs en CMLV en los distintos grupos de estudio. a) miR-29b, b) miR-146, c) miR-155, d) miR-145a y e) miR-30c.** Los valores están calculados en referencia a los niveles de U6 y se expresan en forma relativa a los niveles correspondientes al grupo control Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup>. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM.  $n=4-11$  ratones/grupo controles y  $n=13-17$  ratones/grupo ERC. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .

Finalmente, se analizó la expresión de Dicer y Drosha, también en las muestras de arterias, dos enzimas implicadas en el proceso de maduración de los microRNAs. En el caso de DICER (Figura 38a) no hay diferencias significativas entre los grupos y en Drosha, sí que hay una tendencia a disminuir en los grupos de ratones con ERC, concretamente en los ratones con genotipo Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup> hay una disminución significativa respecto a sus controles (Figura 38b).

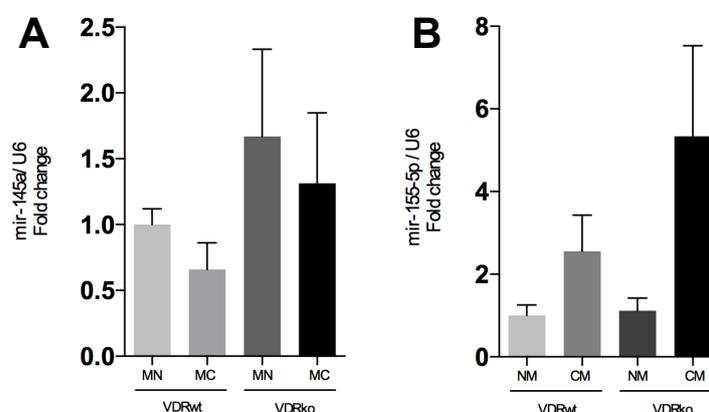


**Figura 38. Expresión relativa de DICER (a) y Drosha (b) en los distintos grupos experimentales.** Los valores están calculados en referencia a los niveles de U6 y se expresan en forma relativa a los niveles correspondientes al grupo control Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup>. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM.  $n=5$  ratones/grupo controles y  $n=10-13$  ratones grupo ERC.

#### 4.4.2 Estudio de microRNAs *in vitro*

En el estudio *In vitro*, se analizó la expresión del miR-145a (Figura 39a) y el miR-155 (Figura 39b). La expresión del miR-145a disminuyó ligeramente en CMLV VDRwt incubadas con MC respecto a sus controles con MN (Figura 39a), tal como habíamos observado *in vivo* en arterias de ratones Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> afectados por ERC. En el caso de las células VDRko, estas mostraban unos niveles basales superiores a las VDRwt con MN. Después del tratamiento con MC, en las VDRko, también disminuyó ligeramente la expresión de mir-145 pero los niveles seguían siendo superiores que las VDRwt con MC, aunque las diferencias no eran estadísticamente significativo (Figura 39a).

El miR-155 siguió el mismo patrón de expresión que *in vivo*, incrementando en ambas CMLV VDRwt y VDRko incubadas con MC (Figura 39b), sin significación estadística entre estos dos grupos.



**Figura 39. Expresión relativa de los microRNAs en CMLV VDRwt y VDRko con las distintas condiciones (MN y MC).** a) miR-145a, b) miR-155. Los valores están calculados en referencia a los niveles de U6 y se expresan en forma relativa a los niveles correspondientes al grupo control VDRwt MN. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM de 2 o 4 experimentos independientes con duplicados en miR-155 y miR-145a respectivamente ( $n=4-8$ /grupo). \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .

#### 4.4.2.1 Análisis de la calcificación *in vitro* tras la recuperación de los niveles de miR-145a mediante transfección

- **Puesta a punto modelo transfección del mimic miR-145a en CMLV**

En los experimentos anteriores, habíamos comprobado que ratones Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> con ERC presentan calcificación vascular y un aumento de la expresión de OPN junto con un descenso en la expresión del miR-145a en las arterias. Por otro lado, los ratones Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup> con ERC no presentaban signos de calcificación vascular ni altos niveles de OPN, junto con una expresión más elevada del miR-145a.

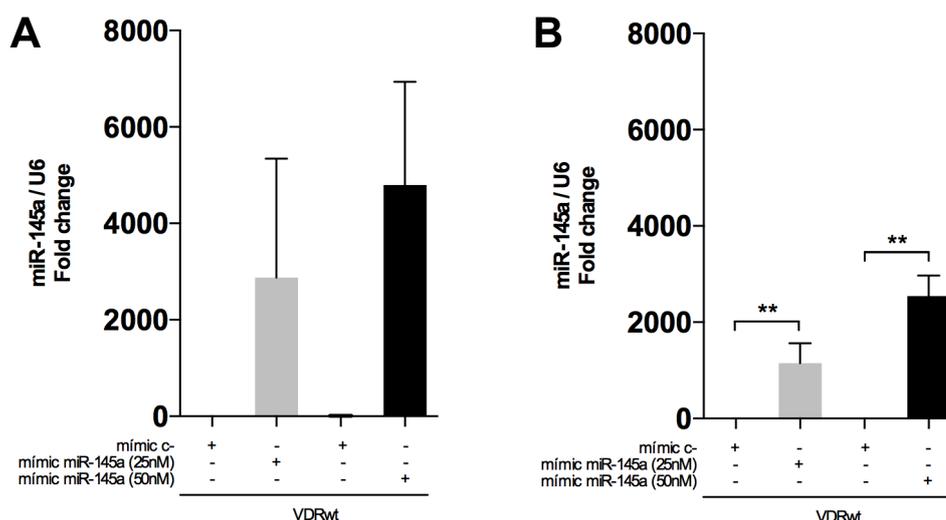
En los estudios *In vitro* con CMLV, se detecta solo un ligero descenso de la expresión del miR-145a en CMLV VDRwt en condiciones calcificantes. En el caso de las VDRko, también hay un descenso respecto a sus controles pero los niveles son más elevados en comparación con las CMLV VDRwt.

*In vitro*, queríamos comprobar el papel protector del miR-145a en la calcificación, por esto, transfectamos los cultivos primarios de CMLV VDRwt con el mimic de miR-145a. En primer lugar, pusimos a punto la técnica para determinar la concentración necesaria del mimic y el tiempo de transfección. Mediante la literatura determinamos distintas variables para testar:

- Concentración del mimic: 25 nM y 50 nM
- Tiempo de transfección: 24 y 48 horas.

Se siguió el protocolo (*fast forward protocol*) descrito para CMLV por el fabricante del *HiPerfect tranfection Reagent* (Quiagen).

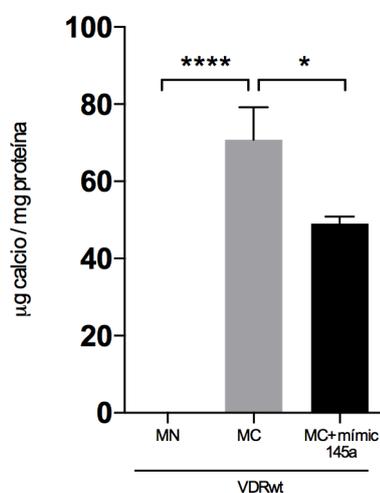
En todos los casos vemos (*Figura 40*) un aumento en la detección del miR-145a, tanto en la transfección durante 24h como 48h y con ambas concentraciones (25 nM y 50 nM). Decidimos establecer como condiciones del experimento la transfección durante 24 horas ya que es más efectiva, al cabo de 48h se detecta menos mir-145a y como después de la transfección hay que tratar las células con medios calcificantes, se perderá el efecto si esperamos 48 horas. En cuanto a la concentración, como vemos que las células tienen buen aspecto y no es perjudicial, elegimos la más alta (50 nM) para garantizar una buena transfección.



**Figura 40. Expresión relativa del miR-145a en CMLV VDRwt transfectadas con un control negativo de la transfección o mimic del miR-145a a distintas concentraciones (25 y 50nM). a) resultados después de 24h y b) 48h de transfección. Los valores están calculados en referencia a los niveles de U6 y se expresan en forma relativa a los niveles correspondientes al grupo control VDRwt mimic c-. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM.  $n=2-3$ /grupo. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .**

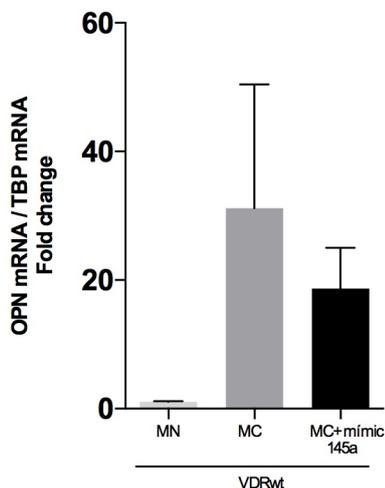
- **El mir-145a disminuye los niveles de calcio y es un posible modulador de la expresión de OPN en condiciones calcificantes *in vitro***

Una vez transfectadas las CMLV VDRwt con el mimic de miR-145a, a las 24h, se empezó el tratamiento con medios calcificantes durante 6 días. Cada condición se analizó por duplicado y en dos experimentos distintos. Las CMLV tratadas con MC muestran unos niveles de calcio incrementados en comparación con sus respectivos controles con MN (Figura 41), tal como ha habíamos confirmado previamente. En el caso de las CMLV VDRwt con MC y transfectadas con el miR-145a, vemos que los niveles de calcio se reducen significativamente respecto a aquellas que no tienen altos niveles del miR-145a.



**Figura 41. Cuantificación química del calcio mediante el método o-cresolftaleína complexona en CMLV VDRwt con MN, MC y MC + mimic de 145a. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM.  $n=4$ /grupo. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$**

En las células tratadas con MC se detectó un incremento del mRNA de OPN, mientras que las células tratadas con MC + mimic 145a mostraron un ligero descenso en la expresión del mRNA de OPN, aunque no significativo, indicando que este el miR-145a podría tener un papel de la regulación de la expresión de OPN en condiciones calcificantes (Figura 42).



**Figura 42. Expresión relativa de OPN en CMLV VDRwt con los distintos tratamientos (MN, MC, MC+mimic).** Los valores están calculados en referencia a los niveles de TBP y se expresan en forma relativa a los niveles correspondientes al grupo control VDRwt MN. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM.  $n=6$  (MN y MC+mimic), 10 (MC). \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .

#### 4.4.3 OPN como posible diana de miR-145a

Para comprobar la posible interacción entre el miR-145a y osteopontina, nos fijamos en las uniones mediante la región de siembra canónica o extendida, descritas en interacciones entre miRNAs y genes diana.

En primer lugar, mediante la base de datos *mirbase*, obtuvimos la secuencia del miR-145a-5p. En esta, seleccionamos las bases 2-10 del extremo 5'.

**>mmu-miR-145a-5p MIMAT0000157**

3'-UCCCUAAGGACCCUUUGACCUG -5'

A continuación, mediante la base de datos *UCSC Genome Browser Home* obtuvimos la secuencia 3'UTR del gen osteopontina. En esta secuencia del gen OPN, buscamos la complementariedad con las bases 2-10 de la secuencia del miR-145a-5p que sería la siguiente secuencia:

**AAAACUGGA**

## 3'utr Spp1

AGAAGAGGCAAAAACACAGUCCUACUUUGCAUUUAGUAAAAACAAGAAAAGUGUUAGU  
 GAGGGUUAAGCAGGAUACUACUGCUCAUUUCUCAGUUCAGUGGAUUAUGUAUGUAGA  
 GAAAGAGAGGUAAUUAUUUUGGGCUCUAGCUUAGUCUGUUGUUUCAUGCAAACACCGUUG  
 UAACCAAAGCUUCUGCACUUUGCUUCUGUUCUCCUGUACAAGAAAUGCAAACGGCCACU  
 GCAUUUUAUGAUUGUUUAUUCUUUUAUGAAUAAAUGUAUGUAGAAACAAGCAAUUUACU  
 GAAACAAGCAGAAUAAAAGAGAAACUGUAACAGUCUAUAUCACUAUACCCUUUUAGUUUU  
 AUAUUAGCAUAUAUUUUGUUGUGAUUAUUUUUUUUGUUGGUGUGAAUAAAUCUUGUAACG  
 AAUGUAAGGA

Podemos ver que existe una complementariedad entre las bases 4-9 del miR-145a-5p y bases de OPN. Este tipo de complementariedad está descrita como las más estables entre miRNA y gen diana, de forma que seguramente miR-145a es un candidato de regular OPN. Aún así, la unión no está descrita en bases de datos como *TargetScan* o *Tarbase*.

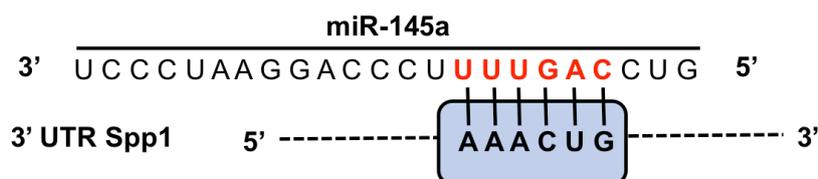


Figura 43. Possible interacción entre mir-145a y el gen Osteopontina mediante la región de siembra extendida y la región 3'UTR.

Usando la herramienta para detectar estas interacciones, *IntaRna*, pudimos confirmar la interacción propuesta.

Target	Position	Query	Position	Energy
spp1	325 – 331	mmu-miR-145a-5p MIMAT0000157	4 – 10	-3.41901

Details of Selected Interaction		Download Interaction Details
Target	5'-AGA...AAAGA	324
	GAAACUG	332
	: : : :	
Query	3'-UCC...GACCC	11
	UUUUGAC	3
	CUG-5'	
Energy	-3.41901 kcal/mol	
Hybridization Energy	-6.2	
Unfolding Energy - Target	2.17525	
Unfolding Energy - Query	0.61550	
Position - Target RNA	325 – 331	
Position - Query RNA	4 – 10	
Position Seed - Target RNA	325 – 331	
Position Seed - Query RNA	4 – 10	
Sequence	: AAAGAGAAACUGUAACA&GUCCAGUUUCCAG	
Structure	: .....(((((((.....&...)))))).....	
StartIndex	: 320&1	

Figura 44. Interacción detectada mediante el software *IntaRna* del mir-145a y el gen osteopontina.



5

Discusión



La enfermedad renal crónica es una de las enfermedades con mayor prevalencia en nuestro país y con una serie de complicaciones asociadas. Una de las más importantes es la enfermedad cardiovascular, siendo una de las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad en estos pacientes. En particular, destacamos la calcificación vascular, de la cual aún no se conocen del todo los mecanismos por los que se produce. Sin embargo, está muy asociada a las alteraciones en el metabolismo mineral (CKD-MBD), muy frecuentes en estos pacientes. Estas alteraciones se caracterizan por hiperfosfatemia, hipocalcemia, disminución de la vitamina D y aparición de hiperparatiroidismo secundario. Para ello la mayoría de pacientes son tratados con calcitriol o análogos, como el paricalcitol. Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que el calcitriol tiene un efecto más perjudicial que el paricalcitol, porque promueve más la calcificación vascular, aunque los dos compuestos activan el VDR<sup>14</sup>. Esto hace pensar que el VDR de CMLV tiene un papel muy importante en la calcificación vascular y que la vitamina D, además de sus acciones clásicas en la regulación del calcio sistémico, tiene efectos específicos en la vasculatura. *Torremadé et al.*,<sup>130</sup> demostraron que la  $1\alpha$ -hidroxilasa local mediaba el incremento de la CV en la ERC y la eliminación de esta enzima inhibía totalmente la CV *in vitro*. Además, juntamente con el incremento de  $1\alpha$ -hidroxilasa, confirmaron un aumento en la activación de VDR en las arterias<sup>130</sup>. Esto nos indica que los pacientes renales tienen una alteración en el metabolismo de la vitamina D a nivel local en las CMLV, provocando efectos atribuidos a las funciones no clásicas de la vitamina D.

Para investigar el potencial papel de VDR en la calcificación vascular en ERC analizamos la expresión de VDR en arterias calcificadas de pacientes con ERC. En estas vimos que pacientes con enfermedad renal crónica y calcificación vascular presentaban una mayor expresión de VDR en las CMLV comparado con muestras arteriales de personas sanas. Además, ratones sujetos a una nefrectomía 5/6 mostraron también un incremento de la expresión de VDR en arterias calcificadas; corroborando los resultados del estudio en muestras humanas y, verificando estudios anteriores de *Torremadé et al.*, donde se afirmaba que la uremia incrementaba la expresión de VDR en arteria de rata *in vivo*<sup>130</sup>.

Después de estos estudios previos, nos planteamos como el VDR local de las CMLV influye directamente en el proceso de calcificación vascular, y como su eliminación de forma específica en estas células puede condicionar esta calcificación en enfermos renales.

En estudios anteriores, Han *et al.* ya habían demostrado que en ratones KO totales para VDR la calcificación vascular estaba disminuida<sup>70</sup>. Aun así, este estudio no permite concluir si es una consecuencia de los efectos a nivel sistémico, o si es solo a nivel de las arterias, ya que se elimina VDR en todos los órganos. A nivel sistémico, la vitamina D promueve la absorción de calcio y fósforo en el intestino y también la reabsorción de calcio en el riñón, lo que conlleva un aumento de los niveles de calcio y fósforo séricos. Se ha descrito que este incremento en los niveles de calcio circulantes por acción de la vitamina D promueve las calcificaciones vasculares<sup>131</sup>. Por esto, nuestro primer objetivo fue eliminar de forma exclusiva VDR en las CMLV y así no perder los efectos de la vitamina D en el resto de órganos durante la ERC.

Para ello usamos un modelo de ratón KO condicional para VDR en las CMLV con sus respectivos controles, con el objetivo de mantener los efectos sistémicos de la vitamina D, pero no los locales en las CMLV. Estos fueron sometidos a una nefrectomía subtotal juntamente con administraciones de calcitriol y dieta alta en fósforo para promover la calcificación vascular

Una vez finalizado el experimento, vimos que ambos genotipos, Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> y Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup> afectados con ERC presentaban características de enfermedad renal, con un BUN elevado debido a la disfunción renal, hipercalcemia e hiperfosfatemia por el aumento de absorción de calcio y fósforo de la dieta. El riñón de ambos grupos de ratones con ERC no era capaz de eliminar todo el fósforo y por esto aumentaba en suero. Aun así, vimos que los niveles de fósforo en orina también eran elevados en los grupos con ERC, lo cual nos indica que la parte de riñón que tenían funcional aun podía excretar parte de este fosforo. Los niveles de calcio en suero de los dos grupos de ratones con ERC, también aumentaron debido a la acción de la vitamina D, que hace que se absorba más calcio y fósforo en la dieta. Estos resultados confirman los resultados previos de nuestro grupo donde se describe que el BUN, calcio y fósforo aumenta significativamente en los ratones nefrectomizados con tratamiento con calcitriol<sup>130</sup>, aunque en nuestro caso además tenían una dieta alta en fósforo.

Analizando la calcificación vascular en nuestros grupos de ratones, demostramos que los ratones Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> con ERC presentaban un aumento de la CV comparando con los ratones CRE+ VDR<sup>lox/lox</sup> con ERC donde habíamos eliminado de forma específica el VDR en las CMLV. Este resultado nos indica que la activación del receptor de la vitamina D

localmente en las CMLV promueve la calcificación vascular en los ratones afectados con ERC. Posteriormente, confirmamos estos resultados con cultivos celulares, donde el contenido de calcio aumentaba en condiciones calcificantes en CMLV VDRwt, mientras que en las CMLV VDRko no lo hacía.

Está descrito que la calcificación arterial siempre va acompañada de un aumento de gran parte de los marcadores osteoblásticos, como osteopontina, Runx2, ostocalcina, lamin A, fosfatasa alcalina y BMPs, detectados en las paredes de los vasos calcificados<sup>132</sup>. En nuestro estudio, en primer lugar analizamos Runx2, un factor de transcripción que tiene un papel importante en la diferenciación de los osteoblastos, ya que los ratones Runx2-KO tienen un déficit de osteoblastos funcionales y también múltiples defectos esqueléticos<sup>133</sup>. Se ha descrito que el suero urémico incrementa la mineralización de las CMLV y aumenta la expresión de Runx2<sup>27</sup>. En nuestro estudio, Runx2 se encuentra aumentado en ambos grupos de ratones con ERC, aunque solo los Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> presentaban calcificaciones vasculares. El grupo Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup> con ERC calcificaban menos, aunque también tenían niveles incrementados de Runx2. Esto nos hace pensar que la expresión de Runx2 en las CMLV es necesaria pero no suficiente para producir calcificación vascular *in vivo*.

En el estudio *in vitro*, los resultados no seguían del todo el patrón *in vivo*, ya que en las células donde habíamos detectado calcificación (VDRwt con medios calcificantes) no aumentaba la expresión de Runx2. Por otro lado, en las VDRko con medios calcificantes, aunque no presentaban calcificaciones, sí que mostraban un aumento significativo de Runx2, comparado con VDRko en medio normal. Sin embargo, es importante destacar que los niveles basales de Runx2 en CMLV VDRko son más bajos que en las VDRwt, y que al tratar con MC aumentan para alcanzar los niveles basales de éstas.

Estas diferencias entre los experimentos *in vivo* e *in vitro* se podrían atribuir a los distintos fondos genéticos de los ratones. En el caso del experimento *in vivo*, eran ratones con un fondo genético mixto (C57BL/6J y Swiss129) y en los experimentos *in vitro* se usaron células provenientes de ratones C57BL/6J puros. Además, también podemos relacionar estas diferencias a otros estímulos que *in vivo* pueden inducir un aumento de Runx2 y desaparecen *in vitro*. Así, *in vitro* hemos simulado la situación de enfermedad renal con aumentos de calcio y fósforo en el medio pero el modelo animal presenta una situación de uremia que no teníamos en los cultivos celulares. Estas toxinas urémicas podrían ser las responsables del aumento de Runx2 *in vivo* que no detectamos *in vitro*. Hay varias

toxinas urémicas descritas que inducen calcificación como proteínas oxidadas, productos finales de glicación avanzada, calcitriol, PTH, especies reactivas de oxígeno (ROS), indoxil sulfato, entre otros. No obstante, es más probable que sea una combinación de estos factores urémicos del suero y no uno de solo, el responsable del aumento de expresión de Runx2<sup>134,135</sup>. Destacamos el compuesto indoxyl sulfato, una toxina urémica bien reconocida, de la cual *Chang et al.* aportan evidencias en experimentos *in vivo* e *in vitro* sugiriendo que puede tener un impacto directo en el desarrollo de la CV, desencadenando la producción de ROS y la expresión de Runx2<sup>135</sup>. Por otro lado, *Chen et al.* en su estudio describen BMP-2 como potencial toxina urémica, ya que encontraron unos niveles superiores en suero urémico de pacientes con ERC en diálisis en comparación con sueros de personas sanas, y este inducía a Runx2 y sus proteínas *downstream* OPN y ALP, en CMLV bovinas<sup>134</sup>.

*Han et al.* demostraron que hay una cooperación funcional entre VDR y Runx2, además de su interacción física para la regulación de muchos genes osteogénicos. Este podría ser el principal motivo por el cual en nuestro estudio en los ratones Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup> con ERC y en los cultivos de CMLV VDRko no hay un aumento de calcificación. Como las CMLV no tienen VDR este no puede interactuar con Runx2, y aunque Runx2 esté aumentado, sin VDR no se estimula la calcificación vascular.

Se conoce que Runx2 regula la transcripción de Osteopontina (OPN), ya que en ratones con falta de Runx2 se ha detectado una expresión baja de OPN<sup>136</sup>. OPN es otro de los marcadores en el que pudimos detectar diferencias importantes entre los dos grupos de ratones con ERC. Los ratones Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> con ERC presentaban unos niveles de OPN más elevados en sus arterias calcificadas que los ratones Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup> con ERC y sin calcificación vascular, en los que eran prácticamente iguales a los ratones de los grupos controles. En el experimento *in vitro*, también se confirmaron estos resultados, con un aumento de expresión de OPN en CMLV VDRwt tratadas con medios calcificantes en comparación con CMLV VDRwt con medios normales. En el caso de las CMLV VDRko el aumento inducido por medios calcificantes se inhibe de manera significativa.

En el modelo de *Viegas et al.* demostraron los mismos resultados en su estudio. Así la calcificación arterial estaba caracterizada principalmente por un incremento de la expresión de OPN, indicador de la diferenciación osteogénica de las CMLV junto con una disminución de  $\alpha$ -SMA<sup>137</sup>. También se han detectado altos niveles de OPN en válvulas cardíacas calcificadas comparándolas con las válvulas no calcificadas<sup>138</sup>, así como en cultivos *in vitro*, después de 4 días de exposición en medios calcificantes.

Finalmente, se ha descrito que la vitamina D<sub>3</sub> estimula la síntesis y secreción de OPN<sup>139</sup> ya que OPN tiene un elemento de respuesta a vitamina D y, por esto, se afirma que la vitamina D ejerce un efecto directo en su expresión<sup>25</sup>. *Lau et al.* detectaron un incremento de OPN secretada en VSMC de ratón después de cultivarlas 48 horas con Paricalcitol sugiriendo que el incremento de OPN era estimulado por el tratamiento con el agonista de VDR<sup>140</sup>. Siguiendo con estos resultados, *Jono et al.* demostraron que la vitamina D en CMLV bovinas calcificadas producía un incremento de expresión de OPN, al contrario de las que no estaban calcificadas<sup>25</sup>. Se confirmó también un aumento de OPN en ratones con ERC, dieta alta en fosforo y tratados con agonistas de VDR<sup>140</sup>. Podemos relacionar estos hallazgos con nuestros resultados, donde ratones con presencia del receptor de la Vitamina D presentan más expresión de OPN y, como consecuencia, más calcificación vascular, contrariamente a los ratones que no tienen presencia de VDR en CMLV.

*Sowa et al.*, confirmaron también que Runx2 regula la transcripción de OPN y que esta está aún más incrementada con la interacción con VDR. Por lo tanto, hay una actividad sinérgica de Runx2 con VDR en la transcripción de OPN en el proceso de calcificación<sup>72</sup>. Si nos fijamos en nuestros resultados, los dos grupos de ratones con ERC, aunque los dos presentaban niveles mayores de Runx2 en comparación con los controles, solo los ratones Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> tenían altos niveles de OPN comparados con los ratones Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup> con ERC. Por lo tanto, OPN aumenta en los ratones que tienen VDR en las CMLV y este puede interactuar con Runx2. *In vitro*, OPN aumenta en las células VDRwt con niveles de Runx2 normales, indicándonos que a parte de Runx2 puede haber otros estímulos que inducen OPN, como la inhibición por SOST o microRNAs, que se. Contrariamente, en células VDRko, el ligero aumento de Runx2 no se traduce en incrementos significativos de OPN, probablemente porque este no es suficiente en ausencia de VDR.

En nuestro estudio *in vivo*, los animales Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> con ERC y calcificación vascular también mostraban unos niveles incrementados de Lamin A respecto sus controles, mientras que en los ratones Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup> con ERC no se detectaba este aumento, mostrando valores similares a los controles. Confirmando nuestros resultados, *Quirós-González et al.*, en su estudio, ya describieron tanto *in vivo* como *in vitro* que los niveles de Lamin A incrementaban en CMLV calcificadas, sugiriendo un papel de esta proteína en la calcificación vascular<sup>141</sup>. Silenciando el gen correspondiente, *Lmna*, vieron que en condiciones calcificantes no había un incremento de la calcificación vascular y que

tampoco incrementaba la expresión de genes como Runx2, OPN y Oc. En cuanto a la relación de VDR con Lamin A, esta no está descrita en profundidad, pero *Almofiti et al.* en su estudio detectaron un incremento de Lamin A en aortas de ratas tratadas con vitamina D<sup>142</sup>. Por otro lado, hay resultados contradictorios dependiendo del tejido estudiado, ya que se ha descrito una disminución de Lamin A como consecuencia de tratamientos con vitamina D, en fibroblastos<sup>143</sup>.

Por último, también detectamos diferencias en la expresión del inhibidor de calcificación esclerostina (SOST). Los ratones del grupo Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> con ERC y calcificación vascular presentaban unos niveles reducidos respecto al grupo de ratones sanos. En cambio en el grupo de ratones Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup> con ERC, los niveles de SOST eran superiores, parecidos a los niveles en ratones sanos. Este resultado nos indica que SOST puede estar mediando algún efecto protector contra la CV en las arterias de Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup> con ERC de acuerdo a los resultados previos publicados por *LaShan Simpson et al.* Estos autores fueron los primeros en atribuir a esclerostina el papel de reguladora de la calcificación de CMLV, mostrando como esta puede actuar como diana terapéutica para tratar la CV debido a su capacidad de reducir el contenido de calcio *in vitro*<sup>144</sup>. Siguiendo en esta línea, *Goltzman et al.*, afirmaban que niveles bajos de esclerostina aceleraban la transdiferenciación de las CMLV a células osteoblasticas con la consecuente calcificación<sup>44</sup>. SOST es un inhibidor de la vía de señalización Wnt, vía que se ha descrito que tiene un papel importante en la diferenciación osteogénica<sup>145</sup> dado que controla la expresión de osteoprotegerina (OPG), osteopontina (OPN), y metaloproteasas de matriz (MMP), que están implicadas en enfermedad aórtica<sup>146</sup>. *Golledge et al.*, demostraron que un incremento de SOST disminuye OPN en arterias de ratón<sup>147</sup>. Si analizamos como VDR podría regular la expresión de SOST, *St. John et al.* sugieren que SOST disminuye por la acción de la vitamina D en osteoblastos de ratón<sup>142</sup>. Aun así, hay también opiniones contrarias donde relacionan la producción local de vitamina D con un aumento de SOST, para mitigar la transdiferenciación osteoblástica y la mineralización como defensa primaria en ERC<sup>44</sup>. Además, también se han descrito aumentos de esclerostina en suero en pacientes con ERC tratados con agonistas de VDR.<sup>148</sup> Estas diferencias podrían atribuirse a una acción selectiva de VDR dependiendo del tipo celular, ya que se inducen distintos patrones de reclutamiento de cofactores en cada uno<sup>149</sup>.

Recientemente se ha demostrado que los miRNAs pueden regular varios procesos biológicos y patológicos, modulando la expresión de varios genes diana. Casi el 90% de genes están regulados por miRNAs y pueden mediar varias funciones celulares, incluyendo proliferación, apoptosis y diferenciación. Hay muchas evidencias en estudios de calcificación vascular que sugieren que los microRNAs tienen un papel clave en la modulación de este proceso, regulando la transdiferenciación de las CMLV a células parecidas a osteoblastos. En nuestro estudio hemos seleccionado cinco de ellos para analizar, los cuales se han descrito previamente que están implicados en calcificación vascular y además se ha visto que están regulados por VDR.

Vimos diferencias interesantes en dos de ellos. En primer lugar el miR-155, que aunque no presenta diferencias estadísticamente significativas, se observa una tendencia a incrementar en ambos grupos de ratones con ERC, tanto en Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> como en Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup>, en comparación con sus respectivos controles. Se ha descrito la expresión del miR-155 aumenta cuando el sistema inmune está activado<sup>150</sup>. Paralelamente, uno de los efectos inducidos por las toxinas urémicas presentes en el plasma de enfermos renales es la inflamación vascular<sup>151</sup> con una alteración del sistema inmune<sup>152</sup>.

En el microRNA que detectamos más diferencias *in vivo*, fue el miR-145a. Observamos una disminución significativa en su expresión arterial en los ratones Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> con ERC que presentaban CV en comparación con sus respectivos controles, y una recuperación de su expresión en los ratones Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup> con ERC y sin CV.

De acuerdo con resultados previos se demostró que el mir-145a tiene un papel importante en el cambio fenotípico de las CMLV<sup>153</sup>. Niveles bajos niveles de este miRNA se asocian con la enfermedad arterial coronaria<sup>154</sup>. Siguiendo en esta línea, *Cheng et al.* confirmaron que una sobreexpresión de miR-145 incrementaba la expresión de genes de diferenciación de CMLV, como  $\alpha$ -actina de musculo liso, y que los niveles de estos marcadores disminuían en CMLV tratadas con un inhibidor de miR-145 en cultivos *in vitro* de CMLV<sup>155</sup>. También se ha detectado una disminución de la expresión de este microRNA tanto en CMLV cultivadas con medios con alto fosforo como en ratones con calcificaciones vasculares y se ha demostrado que regula de forma negativa la expresión de genes específicos del cambio de fenotipo de las CMLV<sup>156</sup>.

Por otro lado, y aunque no hay muchas evidencias de esto en la bibliografía, hay datos que sugieren que VDR puede regular el miR-145a. Solo *Huang et al.* han descrito en células de cáncer gástrico una relación entre ellos. En este estudio se demostró que los

tratamientos con vitamina D en células de cáncer gástrico producen un incremento de la expresión de miR-145a. Mediante bioinformática predijeron un VDRE candidato en el locus del cromosoma humano de miR-145a y concluyeron que el miR-145a es inducido a través de VDR<sup>116</sup>. Nuestros resultados son opuestos a estos, ya que en arterias con presencia de VDR la expresión de miR-145a disminuye. Estas diferencias las podríamos atribuir a los distintos efectos de VDR en función del tipo celular<sup>149</sup>. Aun así, el hecho de que VDR sea un candidato a regular nuestro microRNA de interés, es importante.

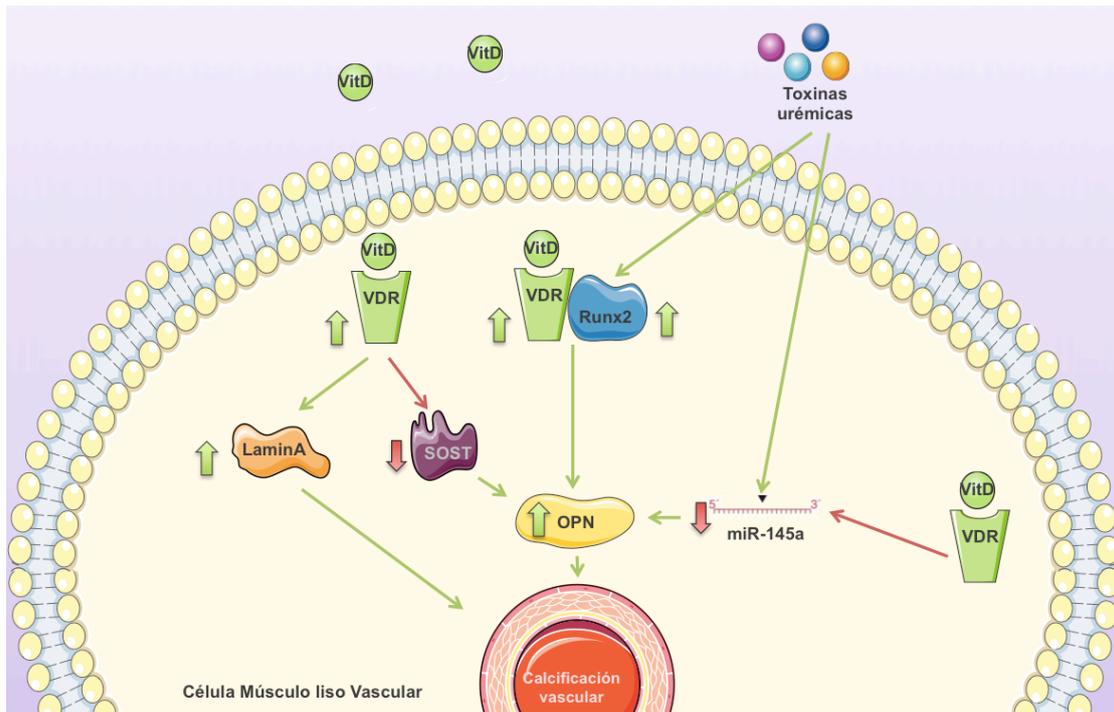
Una posible diana del miR-145a podría ser osteopontina, por la complementariedad de bases que tienen. Probablemente, cuando los niveles de este microRNA son superiores es capaz de unirse a OPN y promover una degradación de esta, como podría pasar en el grupo con ERC y Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup>, pero cuando los niveles de miR-145a disminuyen, no pueden regular OPN, esta aumenta y promueve la calcificación vascular como en el grupo de ratones con ERC y Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup>. En línea con nuestros resultados, *Cai et al.* ya habían postulado que una sobreexpresión del miR-145 inhibe la transformación fenotípica en células de músculo liso vascular humanas (HVSMC) y disminuye la expresión de OPN. Así, estos autores encontraron una disminución en miR-145 en CMLV desdiferenciadas<sup>157</sup>.

En cuanto a los resultados *In vitro*, el miR-155 presenta una tendencia igual a la de los resultados *in vivo*, aunque sin alcanzar la significación estadística. Así, tanto en las células VDRwt como VDRko con MC se observa un incremento en la expresión de miR-155 respecto a sus controles con MN.

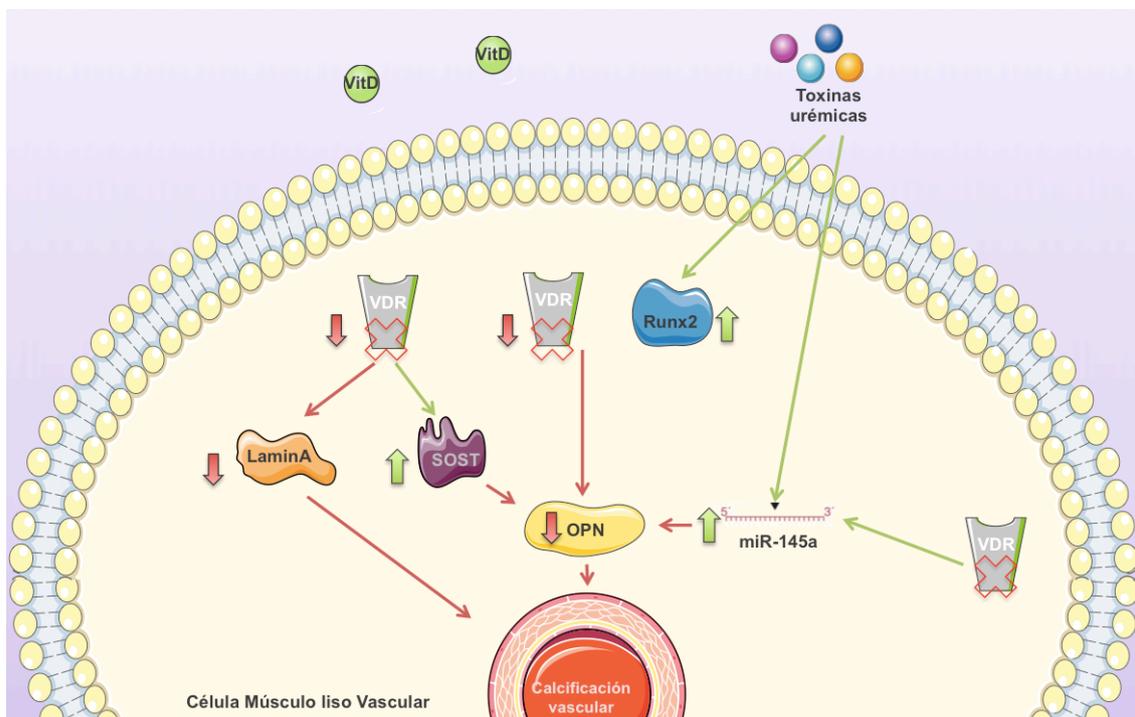
En el caso del miR-145a, *in vitro*, hay un ligero descenso en las CMLV VDRwt que presentaban calcificaciones, comparado con sus respectivos controles. Este patrón se repite en las células VDRko, aunque no presentan calcificaciones. Fijándonos en los resultados obtenidos *in vivo*, esperábamos que en las células VDRko (independientemente del tratamiento), los niveles de miR-145a estuviesen casi igual que en los controles pero no es del todo así. Igual que en el caso de Runx2, estas diferencias entre los resultados *in vivo* e *in vitro* podrían ser consecuencia de la combinación de toxinas urémicas presentes en los ratones con ERC y que no tenemos en los cultivos *in vitro*, que pueden mediar el aumento del miR-145a en ratones Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup> con ERC. Esto también nos indicaría que el aumento de OPN no está solo regulado por este miRNA, ya que en las VDRko, aun teniendo niveles más bajos de miR-145a, no aumenta de forma tan drástica OPN en comparación con las CMLV VDRwt.

Como el miR-145a era nuestro candidato y los resultados *in vivo* eran esperanzadores, nos propusimos revertir la situación de la disminución de este mediante la transfección *in vitro* del mimic del miR-145a en células VDRwt y condiciones calcificantes. Con el objetivo de comprobar si las células con niveles altos de miR-145a no calcificaban y no mostraban incrementos de OPN. Una vez analizados los resultados, pudimos observar en las CMLV VDRwt que con niveles altos de miR-145a y condiciones calcificantes, los niveles de calcio eran significativamente menores que en las células con niveles inferiores de miR-145a. Las células transfectadas también presentaban unos niveles ligeramente disminuidos del mRNA de OPN respecto a las CMLV VDRwt con bajos niveles de miR-145a (ambas con medios calcificantes), aunque estos no eran significativos. Podríamos postular que probablemente miR-145a puede tener un papel en la calcificación, posiblemente regulando OPN, pero que no es suficiente su sobreexpresión para frenar la calcificación vascular y hay otros implicados.

Después del análisis de todos los resultados podemos concluir que el receptor de la vitamina D de las CMLV podría ser el responsable de la calcificación vascular en la enfermedad renal crónica y que su eliminación previene la CV en ERC. El posible papel de miR-145a en la calcificación vascular mediada por VDR requiere estudios adicionales, aunque parece ser un buen candidato en la regulación de la CV mediada por VDR y OPN.



**Figura 45. Esquema de la posible regulación de la calcificación vascular por VDR.** VDR activado inicia la señalización y induce un aumento de Lamin A. Además disminuye la expresión del inhibidor de calcificación SOST, que provocará un aumento de OPN. VDR también interacciona con Runx2 (que está aumentado por acción de las toxinas urémicas) y juntos potencian la expresión de OPN aumentándola. Finalmente, VDR regula negativamente el miR-145a y la disminución de este permitiría un aumento de OPN. Estos aumentos de OPN acaban conduciendo a una calcificación vascular. Flechas rojas: inhibición; flechas verdes: activación. vitD: vitamina D; VDR: receptor de la vitamina D; OPN: osteopontina; SOST: esclerostina.



**Figura 46. Esquema de los posibles efectos en la calcificación vascular debidos a la eliminación de VDR.** Los bajos niveles de VDR impiden que aumente Lamin A y, en efecto, la calcificación. Además, la baja presencia de VDR permite el incremento del inhibidor SOST que impide que OPN aumente. Runx2, aunque esté aumentado por acción de las toxinas urémicas, no puede interaccionar con VDR y ejercer sus efectos en la expresión de OPN, por lo cual se inhibe el aumento de OPN y, en consecuencia, se impide la calcificación vascular. Finalmente, VDR no puede regular negativamente el miR-145a y este incrementa para inhibir también la expresión de OPN y la calcificación vascular. Flechas rojas: inhibición; flechas verdes: activación. vitD: vitamina D; VDR: receptor de la vitamina D; OPN: osteopontina; SOST: esclerostina.

6

# Conclusiones



1. La expresión de VDR aumenta en arterias calcificadas de humanos y ratones afectados por enfermedad renal crónica.
2. La eliminación de VDR exclusivamente en CMLV protege frente la calcificación vascular en ERC *in vivo*.
3. La eliminación de VDR en CMLV disminuye la calcificación vascular en condiciones calcificantes *in vitro*.
4. El miR-145 podría estar implicado en la calcificación vascular mediada por VDR *in vivo*, con una posible regulación de la expresión de OPN y eventos subsecuentes.



7

# Bibliografía



1. Inker, L. A. *et al.* KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of CKD. *Am. J. Kidney Dis.* **63**, 713–35 (2014).
2. Bover-Sanjuán, J. *et al.* Documento de consenso para la detección y manejo de la enfermedad renal crónica. *Nefrología* **34**, 243–262 (2014).
3. Gorostidi, M. *et al.* Chronic kidney disease in Spain: Prevalence and impact of accumulation of cardiovascular risk factors. *Nefrología* **38**, 606–615 (2018).
4. Nefrología, S. E. de. *La Enfermedad Renal Crónica en España 2020*. (2020).
5. Registry, E.-E. ERA-EDTA Registry Annual Report 2017. *Acad. Med. Center; Dep. Med. Informatics; Amsterdam; Netherlands; 2014* (2019). doi:10.1080/10417940509373326
6. López Gómez, J. & Vega, A. Alteraciones Cardiovasculares en la Enfermedad Renal Crónica. *Nefrol. al Día* (2018).
7. Arias, M., Pedro, A. & Egido, J. *Nefrología Clínica*. (2013).
8. Diniz, H. & Frazão, J. M. The role of fibroblast growth factor 23 in chronic kidney disease-mineral and bone disorder. *Nefrología* **33**, 835–44 (2013).
9. Quarles, L. D. Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. *J. Clin. Invest.* **118**, 3820–8 (2008).
10. Rodríguez, M., López, I., Muñoz, J., Aguilera-Tejero, E. & Almaden, Y. FGF23 and mineral metabolism, implications in CKD-MBD. *Nefrología* **32**, 275–8 (2012).
11. Waziri, B. Chronic Kidney Disease – Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD): Current Perspectives. *Int. J. Nephrol. Renovasc. Dis.* **12**, 263–276 (2019).
12. Chandran, M. & Wong, J. Secondary and Tertiary Hyperparathyroidism in Chronic Kidney Disease: An Endocrine and Renal Perspective. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **23**, 391–399 (2019).
13. Slatopolsky, E. *et al.* Marked suppression of secondary hyperparathyroidism by intravenous administration of 1,25-dihydroxy-cholecalciferol in uremic patients. *J. Clin. Invest.* **74**, 2136–43 (1984).
14. Cardús, A., Panizo, S., Parisi, E., Fernandez, E. & Valdivielso, J. M. Differential effects of vitamin D analogs on vascular calcification. *J. Bone Miner. Res.* **22**, 860–6 (2007).
15. Teng, M. *et al.* Survival of patients undergoing hemodialysis with paricalcitol or calcitriol therapy. *N. Engl. J. Med.* **349**, 446–56 (2003).
16. Giachelli, C. M. Vascular calcification mechanisms. *Journal of the American Society of Nephrology* (2004). doi:10.1097/01.ASN.0000145894.57533.C4
17. Esteller Pérez, A. Biología de la pared vascular y síndrome metabólico. in *Nutrición Hospitalaria* (2005).
18. Camue Corona, E., González Carbonell, R. A., Cisneros Hidalgo, Y. A., Oropeza Rodríguez, Y. E. & Pérez Rivero, E. O. El tejido blando arterial y la correlación de parámetros biomecánicos con aspectos clínicos. *Rev. Cuba. Investig. Biomed.* **34**, 122–135 (2015).
19. Amann, K. Media calcification and intima calcification are distinct entities in chronic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **3**, 1599–605 (2008).
20. Valdivielso, J. M. [Vascular calcification: types and mechanisms]. *Nefrología* **31**, 142–7 (2011).
21. Román-García, P. *et al.* Vascular calcification in patients with chronic kidney disease: types, clinical impact and pathogenesis. *Med. Princ. Pract.* **20**, 203–12 (2011).
22. Jaminon, A., Reesink, K., Kroon, A. & Schurgers, L. The Role of Vascular Smooth Muscle Cells in Arterial Remodeling: Focus on Calcification-Related Processes. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
23. Stenvinkel, P. *et al.* IL-10, IL-6, and TNF- $\alpha$ : Central factors in the altered cytokine network of uremia - The good, the bad, and the ugly. *Kidney Int.* (2005). doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00200.x
24. Shioi, A. *et al.* Induction of bone-type alkaline phosphatase in human vascular smooth muscle cells: roles of tumor necrosis factor-alpha and oncostatin M derived from macrophages. *Circ. Res.* **91**, 9–16 (2002).
25. Jono, S., Nishizawa, Y., Shioi, A. & Morii, H. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide. *Circulation* **98**, 1302–6 (1998).
26. Jono, S. *et al.* Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ. Res.* **87**, E10-7 (2000).
27. Moe, S. M., Duan, D., Doehle, B. P., O'Neill, K. D. & Chen, N. X. Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels. *Kidney Int.* **63**, 1003–11 (2003).
28. Kong, Y. Y., Boyle, W. J. & Penninger, J. M. Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology. *Immunol. Today* **21**, 495–502 (2000).
29. Al-Suhaimi, E. A. & Al-Jafary, M. A. Endocrine roles of vitamin K-dependent- osteocalcin in the relation between bone metabolism and metabolic disorders. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **21**, 117–125 (2020).
30. Idelevich, A., Rais, Y. & Monson-Oman, E. Bone Gla protein increases HIF-1alpha-dependent

- glucose metabolism and induces cartilage and vascular calcification. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, e55-71 (2011).
31. Quirós-González, I. *et al.* Lamin A is involved in the development of vascular calcification induced by chronic kidney failure and phosphorus load. *Bone* **84**, 160–168 (2016).
  32. Baek, W.-Y., de Crombrughe, B. & Kim, J.-E. Postnatally induced inactivation of Osterix in osteoblasts results in the reduction of bone formation and maintenance. *Bone* **46**, 920–8 (2010).
  33. Nakashima, K. *et al.* The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* **108(1)**, 17–29 (2002).
  34. Nishimura, R. *et al.* Osterix regulates calcification and degradation of chondrogenic matrices through matrix metalloproteinase 13 (MMP13) expression in association with transcription factor Runx2 during endochondral ossification. *J. Biol. Chem.* **287**, 33179–90 (2012).
  35. Bäck, M. *et al.* Endogenous Calcification Inhibitors in the Prevention of Vascular Calcification: A Consensus Statement From the COST Action EuroSoftCalcNet. *Front. Cardiovasc. Med.* **5:196**,
  36. Speer, M. Y. *et al.* 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.* (2002). doi:10.1084/jem.20020911
  37. Jono, S., Peinado, C. & Giachelli, C. M. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J. Biol. Chem.* **275 (26)**, 20197–203
  38. Mori, K., Shioi, A., Jono, S., Nishizawa, Y. & Morii, H. Expression of matrix Gla protein (MGP) in an in vitro model of vascular calcification. *FEBS Lett.* (1998). doi:10.1016/S0014-5793(98)00870-9
  39. Roumeliotis, S., Dounousi, E., Eleftheriadis, T. & Liakopoulos, V. Association of the Inactive Circulating Matrix Gla Protein with Vitamin K Intake, Calcification, Mortality, and Cardiovascular Disease: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
  40. Wuyts, J. & Dhondt, A. The role of vitamin K in vascular calcification of patients with chronic kidney disease. *Acta Clin. Belg.* **71**, 462–467 (2016).
  41. Schoppet, M. *et al.* Localization of osteoprotegerin, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in Mönckeberg's sclerosis and atherosclerosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 4104–12 (2004).
  42. Ukita, M., Yamaguchi, T., Ohata, N. & Tamura, M. Sclerostin Enhances Adipocyte Differentiation in 3T3-L1 Cells. *J. Cell. Biochem.* **117**, 1419–28 (2016).
  43. Zhang, Z. H. *et al.* Reduction of SOST gene promotes bone formation through the Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway and compensates particle-induced osteolysis. *J. Cell. Mol. Med.* **24**, 4233–4244 (2020).
  44. Nguyen-Yamamoto, L., Tanaka, K.-I., St-Arnaud, R. & Goltzman, D. Vitamin D-regulated osteocytic sclerostin and BMP2 modulate uremic extraskelatal calcification. *JCI insight* **4**, (2019).
  45. Valdivielso, J. M., Coll, B. & Fernandez, E. Vitamin D and the vasculature: can we teach an old drug new tricks? *Expert Opin. Ther. Targets* **13**, 29–38 (2009).
  46. Holick, M. F. *et al.* Photometabolism of 7-dehydrocholesterol to previtamin D3 in skin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **76**, 107–14 (1977).
  47. Fraser, D. R. & Kodicek, E. Unique biosynthesis by kidney of a biological active vitamin D metabolite. *Nature* **228**, 764–6 (1970).
  48. Somjen, D. *et al.* 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase is expressed in human vascular smooth muscle cells and is upregulated by parathyroid hormone and estrogenic compounds. *Circulation* **111**, 1666–71 (2005).
  49. Townsend, K. *et al.* Biological actions of extra-renal 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase and implications for chemoprevention and treatment. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **97**, 103–9 (2005).
  50. Dusso, A. S., Brown, A. J. & Slatopolsky, E. Vitamin D. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **289**, F8-28 (2005).
  51. St-Arnaud, R. & Glorieux, F. H. 24,25-Dihydroxyvitamin D--active metabolite or inactive catabolite? *Endocrinology* **139**, 3371–4 (1998).
  52. Bouillon, R. The vitamin D binding protein DBP. in *Vitamin D* (2011). doi:10.1016/B978-0-12-381978-9.10005-8
  53. Cooke, N. E. & Haddad, J. G. Vitamin D binding protein (Gc-globulin). *Endocr. Rev.* **10**, 294–307 (1989).
  54. Dusso, A., González, E. A. & Martin, K. J. Vitamin D in chronic kidney disease. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **25**, 647–55 (2011).
  55. Bover, J. *et al.* Vitamin D, vitamin D receptor and the importance of its activation in patients with chronic kidney disease. *Nefrología* **35**, 28–41 (2015).
  56. Valdivielso, J. M. & Fernandez, E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin. Chim. Acta.* **371**, 1–12 (2006).
  57. Haussler, M. R. *et al.* The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties

- revealed. *J. Bone Miner. Res.* **13**, 325–49 (1998).
58. Hoenderop, J. G., Willems, P. H. & Bindels, R. J. M. Toward a comprehensive molecular model of active calcium reabsorption. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **278**, F352–60 (2000).
  59. Kitazawa, S., Kajimoto, K., Kondo, T. & Kitazawa, R. Vitamin D3 supports osteoclastogenesis via functional vitamin D response element of human RANKL gene promoter. *J. Cell. Biochem.* **89**, 771–7 (2003).
  60. Dusso, A. S., Thadhani, R. & Slatopolsky, E. Vitamin D receptor and analogs. *Semin. Nephrol.* **24**, 10–6 (2004).
  61. Panda, D. K. *et al.* Inactivation of the 25-hydroxyvitamin D 1 $\alpha$ -hydroxylase and vitamin D receptor demonstrates independent and interdependent effects of calcium and vitamin D on skeletal and mineral homeostasis. *J. Biol. Chem.* **279**, 16754–66 (2004).
  62. Friedman, P. A. & Gesek, F. A. Vitamin D3 accelerates PTH-dependent calcium transport in distal convoluted tubule cells. *Am. J. Physiol.* **265**, F300–8 (1993).
  63. Martínez, M. E. & Willett, W. C. Calcium, vitamin D, and colorectal cancer: a review of the epidemiologic evidence. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **7**, 163–8 (1998).
  64. Song, D. *et al.* Vitamin D intake, blood vitamin D levels, and the risk of breast cancer: a dose-response meta-analysis of observational studies. *Aging (Albany, NY)*. **11**, 12708–12732 (2019).
  65. Barrea, L. *et al.* Vitamin D and its role in psoriasis: An overview of the dermatologist and nutritionist. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **18**, 195–205 (2017).
  66. Li, Y. C. Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system. *J. Cell. Biochem.* **88**, 327–31 (2003).
  67. Cardús, A. *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through a VEGF-mediated pathway. *Kidney Int.* **69**, 1377–84 (2006).
  68. Mohtai, M. & Yamamoto, T. Smooth muscle cell proliferation in the rat coronary artery induced by vitamin D. *Atherosclerosis* **63**, 193–202 (1987).
  69. Carthy, E. P., Yamashita, W., Hsu, A. & Ooi, B. S. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and rat vascular smooth muscle cell growth. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **13**, 954–9 (1989).
  70. Han, M.-S. *et al.* Functional cooperation between vitamin D receptor and Runx2 in vitamin D-induced vascular calcification. *PLoS One* **8**, e83584 (2013).
  71. Lin, R. *et al.* 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3 Promotes Vascularization of the Chondro-osseous Junction by Stimulating Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Matrix Metalloproteinase 9. *J. Bone Miner. Res.* (2002). doi:10.1359/jbmr.2002.17.9.1604
  72. Sowa, A.-K. *et al.* Functional interaction of osteogenic transcription factors Runx2 and Vdr in transcriptional regulation of Opn during soft tissue calcification. *Am. J. Pathol.* **183**, 60–8 (2013).
  73. Kang, Y. H., Jin, J. S., Yi, D. W. & Son, S. M. Bone morphogenetic protein-7 inhibits vascular calcification induced by high vitamin D in mice. *Tohoku J. Exp. Med.* **221**, 299–307 (2010).
  74. Tamagaki, K. *et al.* Severe hyperparathyroidism with bone abnormalities and metastatic calcification in rats with adenine-induced uraemia. *Nephrol. Dial. Transplant* **21**, 651–9 (2006).
  75. Shroff, R. *et al.* A bimodal association of vitamin D levels and vascular disease in children on dialysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**, 1239–46 (2008).
  76. Wang, J., Zhou, J. J., Robertson, G. R. & Lee, V. W. Vitamin D in Vascular Calcification: A Double-Edged Sword? *Nutrients* **10**, (2018).
  77. Drissi, H. *et al.* 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D3 suppresses the bone-related Runx2/Cbfa1 gene promoter. *Exp. Cell Res.* **274**, 323–33 (2002).
  78. Rajewsky, N. microRNA target predictions in animals. *Nat. Genet.* **38 Suppl**, S8–13 (2006).
  79. Krek, A. *et al.* Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* **37**, 495–500 (2005).
  80. Gangaraju, V. K. & Lin, H. MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 116–25 (2009).
  81. Kwon, S. C. *et al.* Molecular Basis for the Single-Nucleotide Precision of Primary microRNA Processing. *Mol. Cell* **73**, 505–518.e5 (2019).
  82. Ryan, B., Joilin, G. & Williams, J. M. Plasticity-related microRNA and their potential contribution to the maintenance of long-term potentiation. *Front. Mol. Neurosci.* **8**, 4 (2015).
  83. Chendrimada, T. P. *et al.* TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* **436**, 740–4 (2005).
  84. Alkagiet, S. & Tziomalos, K. Vascular calcification: the role of microRNAs. *Biomol. Concepts* **8**, 119–123 (2017).
  85. Vasudevan, S., Tong, Y. & Steitz, J. A. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* **318**, 1931–4 (2007).
  86. Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215–33 (2009).
  87. Freeland, A. P., Adran, G. M. & Emrys-Roberts, E. Globus hystericus and reflux oesophagitis. *J. Laryngol. Otol.* **88**, 1025–31 (1974).
  88. Zhang, J. *et al.* Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics*.

- Proteomics Bioinformatics* **13**, 17–24 (2015).
89. Pan, Z., Lu, Y. & Yang, B. MicroRNAs: a novel class of potential therapeutic targets for cardiovascular diseases. *Acta Pharmacol. Sin.* **31**, 1–9 (2010).
  90. Lorenzen, J. M. *et al.* Osteopontin is indispensable for AP1-mediated angiotensin II-related miR-21 transcription during cardiac fibrosis. *Eur. Heart J.* **36**, 2184–96 (2015).
  91. Mackenzie, N. C. W., Staines, K. A., Zhu, D., Genever, P. & Macrae, V. E. miRNA-221 and miRNA-222 synergistically function to promote vascular calcification. *Cell Biochem. Funct.* **32**, 209–16 (2014).
  92. Zheng, S. *et al.* MicroRNA-297a regulates vascular calcification by targeting fibroblast growth factor 23. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **19**, 1331–1336 (2016).
  93. Goettsch, C., Hutcheson, J. D. & Aikawa, E. MicroRNA in cardiovascular calcification: focus on targets and extracellular vesicle delivery mechanisms. *Circ. Res.* **112**, 1073–84 (2013).
  94. Zhang, H. *et al.* Indoxyl sulfate accelerates vascular smooth muscle cell calcification via microRNA-29b dependent regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Toxicol. Lett.* **284**, 29–36 (2018).
  95. Jiang, W. *et al.* The Involvement of miR-29b-3p in Arterial Calcification by Targeting Matrix Metalloproteinase-2. *Biomed Res. Int.* **2017**, 6713606 (2017).
  96. Panizo, S. *et al.* MicroRNAs 29b, 133b, and 211 Regulate Vascular Smooth Muscle Calcification Mediated by High Phosphorus. *J. Am. Soc. Nephrol.* **27**, 824–34 (2016).
  97. Ichii, O. *et al.* Altered expression of microRNA miR-146a correlates with the development of chronic renal inflammation. *Kidney Int.* **81**, 280–92 (2012).
  98. Nakasa, T., Shibuya, H., Nagata, Y., Niimoto, T. & Ochi, M. The inhibitory effect of microRNA-146a expression on bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **63**, 1582–90 (2011).
  99. Liu, J. *et al.* MicroRNA-32 promotes calcification in vascular smooth muscle cells: Implications as a novel marker for coronary artery calcification. *PLoS One* **12**, e0174138 (2017).
  100. Xia, Z.-Y. *et al.* Runx2/miR-3960/miR-2861 Positive Feedback Loop Is Responsible for Osteogenic Transdifferentiation of Vascular Smooth Muscle Cells. *Biomed Res. Int.* **2015**, 624037 (2015).
  101. Norata, G. D. *et al.* MicroRNA 143-145 deficiency impairs vascular function. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **25**, 467–74 (2012).
  102. Zhao, N. *et al.* MicroRNA miR145 regulates TGFBR2 expression and matrix synthesis in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **116**, 23–34 (2015).
  103. Lin, L. *et al.* MiR-135a Suppresses Calcification in Senescent VSMCs by Regulating KLF4/STAT3 Pathway. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **14**, 211–8 (2016).
  104. Goettsch, C. *et al.* miR-125b regulates calcification of vascular smooth muscle cells. *Am. J. Pathol.* **179**, 1594–600 (2011).
  105. Leopold, J. A. MicroRNAs Regulate Vascular Medial Calcification. *Cells* **3**, 963–80 (2014).
  106. Cui, R. R. *et al.* MicroRNA-204 regulates vascular smooth muscle cell calcification in vitro and in vivo. *Cardiovasc. Res.* (2012). doi:10.1093/cvr/cvs258
  107. Qiao, W., Chen, L. & Zhang, M. MicroRNA-205 regulates the calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **33**, 1945–53 (2014).
  108. Balderman, J. A. F. *et al.* Bone morphogenetic protein-2 decreases microRNA-30b and microRNA-30c to promote vascular smooth muscle cell calcification. *J. Am. Heart Assoc.* **1**, e003905 (2012).
  109. Zhang, J., Zhao, F., Yu, X., Lu, X. & Zheng, G. MicroRNA-155 modulates the proliferation of vascular smooth muscle cells by targeting endothelial nitric oxide synthase. *Int. J. Mol. Med.* **35**, 1708–14 (2015).
  110. Chen, N. X. *et al.* Decreased microRNA is involved in the vascular remodeling abnormalities in chronic kidney disease (CKD). *PLoS One* **8**, e64558 (2013).
  111. Kee, H. J. *et al.* miR-18a-5p MicroRNA Increases Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation by Downregulating Syndecan4. *Korean Circ. J.* **44**, 255–63 (2014).
  112. Du, Y. *et al.* Upregulation of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-7 by miR-29 repression mediates vascular smooth muscle calcification. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 2580–8 (2012).
  113. Campbell, M. J. Vitamin D and the RNA transcriptome: more than mRNA regulation. *Front. Physiol.* **5**, 181 (2014).
  114. González-Duarte, R. J. *et al.* Calcitriol increases Dicer expression and modifies the microRNAs signature in SiHa cervical cancer cells. *Biochem. Cell Biol.* **93**, 376–84 (2015).
  115. Luo, W. *et al.* The vitamin D receptor regulates miR-140-5p and targets the MAPK pathway in bone development. *Metabolism.* **85**, 139–150 (2018).
  116. Chang, S. *et al.* miR-145 mediates the antiproliferative and gene regulatory effects of vitamin D3 by directly targeting E2F3 in gastric cancer cells. *Oncotarget* **6**, 7675–85 (2015).
  117. Zeljic, K., Supic, G. & Magic, Z. New insights into vitamin D anticancer properties: focus on miRNA modulation. *Mol. Genet. Genomics* **292**, 511–524 (2017).

118. Ma, Y. *et al.*  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  differentially regulates miRNA expression in human bladder cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **148**, 166–71 (2015).
119. Dambal, S. *et al.* microRNAs and DICER1 are regulated by  $1,25\text{-dihydroxyvitamin D}$  in prostate stroma. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **167**, 192–202 (2017).
120. Alvarez-Díaz, S. *et al.* MicroRNA-22 is induced by vitamin D and contributes to its antiproliferative, antimigratory and gene regulatory effects in colon cancer cells. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 2157–65 (2012).
121. Kempinska-Podhorodecka, A. *et al.* Decreased Expression of Vitamin D Receptor Affects an Immune Response in Primary Biliary Cholangitis via the VDR-miRNA155-SOCS1 Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
122. Panizo, S. *et al.* Regulation of miR-29b and miR-30c by vitamin D receptor activators contributes to attenuate uraemia-induced cardiac fibrosis. *Nephrol. Dial. Transplant* **32**, 1831–1840 (2017).
123. Lisse, T. S., Chun, R. F., Rieger, S., Adams, J. S. & Hewison, M. Vitamin D activation of functionally distinct regulatory miRNAs in primary human osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* **28**, 1478–88 (2013).
124. Kureel, J. *et al.* miR-542-3p suppresses osteoblast cell proliferation and differentiation, targets BMP-7 signaling and inhibits bone formation. *Cell Death Dis.* **5**, e1050 (2014).
125. Zhang, J. *et al.* Effects of miR-335-5p in modulating osteogenic differentiation by specifically downregulating Wnt antagonist DKK1. *J. Bone Miner. Res.* **26**, 1953–63 (2011).
126. Van Cromphaut, S. J. *et al.* Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: Functional and molecular aspects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2001). doi:10.1073/pnas.231474698
127. Wirth, A. *et al.* G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nat. Med.* **14**, 64–8 (2008).
128. Marchesi, C. *et al.* Protective role of vascular smooth muscle cell PPAR $\gamma$  in angiotensin II-induced vascular disease. *Cardiovasc. Res.* **97**, 562–70 (2013).
129. Meir, T. *et al.* Deletion of the vitamin D receptor specifically in the parathyroid demonstrates a limited role for the receptor in parathyroid physiology. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **297**, F1192-8 (2009).
130. Torremadé, N. *et al.* Vascular Calcification Induced by Chronic Kidney Disease Is Mediated by an Increase of  $1\alpha$ -Hydroxylase Expression in Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Bone Miner. Res.* **31**, 1865–1876 (2016).
131. Lomashvili, K. A., Wang, X. & O'Neill, W. C. Role of local versus systemic vitamin D receptors in vascular calcification. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2014). doi:10.1161/ATVBAHA.113.302525
132. Iyemere, V. P., Proudfoot, D., Weissberg, P. L. & Shanahan, C. M. Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification. *J. Intern. Med.* **260**, 192–210 (2006).
133. Otto, F. *et al.* Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* **89**, 765–71 (1997).
134. Chen, N. X. *et al.* The mechanisms of uremic serum-induced expression of bone matrix proteins in bovine vascular smooth muscle cells. *Kidney Int.* (2006). doi:10.1038/sj.ki.5001663
135. Chang, J. F. *et al.* Scavenging intracellular ROS attenuates p-cresyl sulfate-triggered osteogenesis through MAPK signaling pathway and NF- $\kappa$ B activation in human arterial smooth muscle cells. *Toxins (Basel)*. (2020). doi:10.3390/toxins12080472
136. Komori, T. *et al.* Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* **89**, 755–64 (1997).
137. Viegas, C. S. B. *et al.* Gla-rich protein acts as a calcification inhibitor in the human cardiovascular system. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 399–408 (2015).
138. Srivatsa, S. S. *et al.* Increased cellular expression of matrix proteins that regulate mineralization is associated with calcification of native human and porcine xenograft bioprosthetic heart valves. *J. Clin. Invest.* **99**, 996–1009 (1997).
139. Chang, P. L., Lee, T. F., Garretson, K. & Prince, C. W. Calcitriol enhancement of TPA-induced tumorigenic transformation is mediated through vitamin D receptor-dependent and -independent pathways. *Clin. Exp. Metastasis* **15**, 580–92 (1997).
140. Lau, W. L. *et al.* Vitamin D receptor agonists increase klotho and osteopontin while decreasing aortic calcification in mice with chronic kidney disease fed a high phosphate diet. *Kidney Int.* **82**, 1261–1270 (2012).
141. Quirós-González, I. *et al.* Lamin A is involved in the development of vascular calcification induced by chronic kidney failure and phosphorus load. *Bone* (2016). doi:10.1016/j.bone.2016.01.005
142. Almofti, M. R., Huang, Z., Yang, P., Rui, Y. & Yang, P. Proteomic analysis of rat aorta during atherosclerosis induced by high cholesterol diet and injection of vitamin D $_3$ . *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* (2006). doi:10.1111/j.1440-1681.2006.04366.x
143. Kreienkamp, R. *et al.* Vitamin D receptor signaling improves Hutchinson-Gilford progeria syndrome cellular phenotypes. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.9065

144. M. McArthur, K. *et al.* Manipulating the Plasticity of Smooth Muscle Cells to Regulate Vascular Calcification. *AIMS Cell Tissue Eng.* **1**, 165–179 (2017).
145. Li, X. *et al.* Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* **280**, 19883–7 (2005).
146. Maruotti, N., Corrado, A., Neve, A. & Cantatore, F. P. Systemic effects of Wnt signaling. *J. Cell. Physiol.* **228**, 1428–32 (2013).
147. Krishna, S. M. *et al.* Wnt Signaling Pathway Inhibitor Sclerostin Inhibits Angiotensin II-Induced Aortic Aneurysm and Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2017). doi:10.1161/ATVBAHA.116.308723
148. Torino, C. *et al.* Active vitamin D treatment in CKD patients raises serum sclerostin and this effect is modified by circulating pentosidine levels. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* (2017). doi:10.1016/j.numecd.2016.11.005
149. Inaba, Y. *et al.* Vitamin D3 derivatives with adamantane or lactone ring side chains are cell type-selective vitamin D receptor modulators. *Mol. Pharmacol.* (2007). doi:10.1124/mol.106.032318
150. O'Connell, R. M., Taganov, K. D., Boldin, M. P., Cheng, G. & Baltimore, D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 1604–9 (2007).
151. Bammens, B., Evenepoel, P., Keuleers, H., Verbeke, K. & Vanrenterghem, Y. Free serum concentrations of the protein-bound retention solute p-cresol predict mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int.* (2006). doi:10.1038/sj.ki.5000115
152. Martin Malo, A. Capitulo II. Morbilidad asociada a la diálisis. *Nefrología* (1996).
153. Rangrez, A. Y., Massy, Z. A., Metzinger-Le Meuth, V. & Metzinger, L. miR-143 and miR-145: molecular keys to switch the phenotype of vascular smooth muscle cells. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **4**, 197–205 (2011).
154. Fichtlscherer, S. *et al.* Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ. Res.* **107**, 677–84 (2010).
155. Cheng, Y. *et al.* MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation. *Circ. Res.* **105**, 158–66 (2009).
156. Rangrez, A. Y. *et al.* Inorganic phosphate accelerates the migration of vascular smooth muscle cells: evidence for the involvement of miR-223. *PLoS One* **7**, e47807 (2012).
157. Cai, Z. *et al.* MicroRNA-145 Involves in the Pathogenesis of Renal Vascular Lesions and May Become a Potential Therapeutic Target in Patients with Juvenile Lupus Nephritis. *Kidney Blood Press. Res.* **44**, 643–655 (2019).

# Índice de tablas



<b>Tabla 1. Criterios de ERC</b>	<b>3</b>
<b>Tabla 2. Clasificación de la ERC basada en la presencia o ausencia de enfermedad sistémica y la ubicación en el riñón de hallazgos anatomopatológicos</b>	<b>4</b>
<b>Tabla 3. Categorías de índice de filtrado glomerular en ERC</b>	<b>5</b>
<b>Tabla 4. Categorías de albúmina en ERC</b>	<b>5</b>
<b>Tabla 5. Clasificación de los riesgos relativos según el índice de filtrado glomerular y albuminuria</b>	<b>6</b>
<b>Tabla 6. Factores de riesgo en la ERC</b>	<b>10</b>
<b>Tabla 7. Secuencias de los cebadores usadas para el genotipado de los ratones</b>	<b>55</b>
<b>Tabla 8. Programas de PCR para detectar VDRwt, VDRlox y Myh11-CreERT2</b>	<b>55</b>
<b>Tabla 9. Programa de PCR cre-excised</b>	<b>59</b>
<b>Tabla 10. Secuencias de los cebadores usados en la PCR cre-excised</b>	<b>59</b>
<b>Tabla 11. Anticuerpos primarios y secundarios usados en inmunohistoquímica de tejido</b>	<b>60</b>
<b>Tabla 12. Programa de PCR para obtención del cDNA específico de miRNAs</b>	<b>62</b>
<b>Tabla 13. Programa de PCR para la preamplificación del producto de RT-PCR</b>	<b>63</b>
<b>Tabla 14. Sondas usadas en las qPCR</b>	<b>64</b>
<b>Tabla 15. Geles usados para Western Blot</b>	<b>66</b>
<b>Tabla 16. Anticuerpos primarios y secundarios usados en análisis de Western blot</b>	<b>67</b>
<b>Tabla 17. Valores de fosforo y calcio en suero y orina</b>	<b>84</b>
<b>Tabla 18. Valores promedio de la concentración de calcio arterial (mg calcio / µg proteína) y de expresión de mRNA de OPN</b>	<b>88</b>



Índice de  
figuras



<b>Figura 1. Prevalencia de la enfermedad Renal Crónica a nivel mundial</b>	7
<b>Figura 2. Incidencia y prevalencia por millón de población por países/regiones en 31 diciembre 2017</b>	8
<b>Figura 3. Prevalencia (a) e incidencia (b) por comunidades autónomas de España por pacientes por millón de población</b>	9
<b>Figura 4. Esquema de la regulación del metabolismo mineral. A) eje calcio/1,25D/PTH y B) eje fósforo/1,25D/FGF23</b>	14
<b>Figura 5. Estructura de la pared arterial</b>	17
<b>Figura 6. Modelo de los efectos del calcio y fosforo elevados en la mineralización de las CMLV<sup>6</sup></b>	19
<b>Figura 7. Mecanismos involucrados en el proceso de calcificación vascular</b>	20
<b>Figura 8. Síntesis de la vitamina D a partir del 7,8-dehidrocolesterol</b>	26
<b>Figura 9. Mecanismo de entrada de la 25D en la célula del túbulo renal para su activación</b>	27
<b>Figura 10. Heterodimerización del receptor de la Vitamina D y unión a los VDREs</b>	28
<b>Figura 11. Dominios del gen VDR</b>	28
<b>Figura 12. Efectos del aumento o disminución de los niveles de la vitamina D en la calcificación vascular.</b>	34
<b>Figura 13. Síntesis y procesamiento de los miRNAs</b>	36
<b>Figura 14. microRNAs involucrados en el proceso de calcificación vascular</b>	39
<b>Figura 15. Inactivación específica del gen VDR en las CMLV. a) representación esquemática de los exones 1-3 e intrones del alelo VDR con el exón 2 floxeado, b) construcción diana en el promotor de la cadena pesada de la miosina (Myh11-promoter), c) Alelo VDR después de la escisión del exón 2</b>	51
<b>Figura 16. Representación esquemática del ratón reportero mTmG</b>	52
<b>Figura 17. Construcción del exón 2 del gen VDR con los sitios LoxP introducidos y ubicación de los cebadores utilizados</b>	54
<b>Figura 18. Grupos de ratones: los ratones se distribuyeron en cuatro grupos, dos grupos control y dos grupos experimentales con los dos genotipos respectivamente.</b>	56
<b>Figura 19. Cronología del diseño experimental In vivo.</b>	58
<b>Figura 20. Arterias procedentes de enfermos con ERC muestran un aumento de expresión de VDR. a) Contenido de calcio en las arterias epigástricas de donantes sanos y de pacientes con ERC; inmunohistoquímica para VDR en arteria de b) donante sano y c) enfermo renal; d) cuantificación mediante histoscore de la tinción inmunohistoquímica para VDR</b>	77
<b>Figura 21. Incremento de la expresión de VDR en arterias calcificadas de ratón con ERC. a) Cuantificación del calcio arterial mediante el método o-cresolftaleina complexona en ratones sanos y ratones con ERC; Inmunohistoquímica de VDR en arterias de ratones b) sanos y c) con ERC; d) expresión relativa de mRNA de VDR en arterias mediante qPCR y e) imágenes representativas del western blot para VDR en CMLV en ratones sanos y con ERC.</b>	78
<b>Figura 22. Comprobación de la eliminación de VDR en CMLV en ratones CRE<sup>+</sup> VDR<sup>lox/lox</sup> con Tamoxifen mediante a) análisis del DNA por PCR y b) análisis del RNA por qPCR</b>	79

- Figura 23. Reducción de la expresión de la proteína VDR en arteria de ratón Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup> respecto a Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup>.** a) Western blot de VDR; b,c) inmunohistoquímica de VDR en cortes de parafina arteriales correspondiente a un ratón con genotipo b) Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> y c) CRE-VDR<sup>lox/lox</sup>, ambos con administración de Tamoxifen. \_\_\_\_\_ 80
- Figura 24. Activación específica de la Cre-recombinasa en CMLV.** Detección de fluorescencia mT en a) arteria y b) riñón de ratones Cre+ sin activación de la Cre recombinasa y detección del cambio de fluorescencia mT a mG en c) arteria y d) riñón de ratones Cre+ tratados con Tamoxifen 1,5 mg/día durante 5 días \_\_\_\_\_ 81
- Figura 25. Ingesta de agua y comida, volumen de orina y variaciones de peso en los distintos grupos experimentales en el inicio de la dieta y al finalizar el experimento, dos meses después** \_\_\_\_\_ 82
- Figura 26. Análisis de urea y BUN en suero** \_\_\_\_\_ 83
- Figura 27. Análisis bioquímico en suero y orina en el modelo de ratón con ERC (Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> y Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup>) y sus respectivos controles:** a) Niveles de calcio y b) fosforo en suero. Excreción urinaria de c) fósforo y d) calcio en ratones controles y ratones con ERC de los distintos genotipos (Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> y Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup>) \_\_\_\_\_ 84
- Figura 28. Efecto de la presencia de VDR en la calcificación vascular en CMLV en ERC.** a) Cuantificación del calcio arterial mediante el método o-cresolfataleína complexona y b) imágenes representativas de la tinción rojo de alizarina \_\_\_\_\_ 86
- Figura 29. Expresión arterial en los distintos grupos de estudio de mRNA de marcadores osteogénicos.** a) Runx2, b) BMP2, c) Lamin A, d) osterix, e) MGP, f) OPN, g) Alpl, h) SOST y i) SM22a \_ 89
- Figura 30. Análisis de expresión de la proteína Runx2 y OPN en arterias.** Western blot representativo de Runx2 (a) y OPN (c) y las respectivas cuantificaciones por densitometría de las bandas de Runx2 (b) y OPN (d) \_\_\_\_\_ 90
- Figura 31. La ERC y la calcificación vascular promueven cambios de expresión en las proteínas Runx2, OPN y SOST.** Inmunohistoquímica representativa de muestras arteriales en parafina de Runx2, OPN y SOST en los distintos grupos de ratones, controles y con ERC (de ambos genotipos Cre+ VDR<sup>wt/wt</sup> y Cre+ VDR<sup>lox/lox</sup>) \_\_\_\_\_ 91
- Figura 32. Expresión relativa de a) IL-1 $\beta$  y b) IL-6 en CMLV de los distintos grupos de ratones experimentales** \_\_\_\_\_ 92
- Figura 33. Inmunofluorescencia para actina de músculo liso vascular en cultivos primarios de células de musculo liso vascular de ratón VDRwt y VDRko** \_\_\_\_\_ 93
- Figura 34. Detección de depósitos de calcio en CMLV.** a) Visualización a nivel macroscópico de la tinción Rojo de Alizarina; b) cuantificación colorimétrica de la tinción, c) visualización mediante microscopio de contraste de fases de los depósitos de calcio en CMLV VDRwt y VDRko tratadas con MN y MC y d) cuantificación química del calcio mediante el método o-cresolfataleína complexona \_\_\_\_\_ 94
- Figura 35. Análisis de la expresión de mRNA de Runx2 y OPN en CMLV con MN y MC** \_\_\_\_\_ 95
- Figura 36. Western blot representativo de OPN en células VDRwt y VDRko tratadas con MN y MC.** \_ 96
- Figura 37. Expresión relativa de los microRNAs en CMLV en los distintos grupos de estudio.** a) miR-29b, b) miR-146, c) miR-155, d) miR-145a y e) miR-30c \_\_\_\_\_ 98
- Figura 38. Expresión relativa de DICER (a) y Drosha (b) en los distintos grupos experimentales.** \_\_\_\_ 99
- Figura 39. Expresión relativa de los microRNAs en CMLV VDRwt y VDRko con las distintas condiciones (MN y MC).** a) miR-145a, b) mir-155. \_\_\_\_\_ 99

- Figura 40. Expresión relativa del miR-145a en CMLV VDRwt transfectadas con un control negativo de la transfección o mimic del miR-145a a distintas concentraciones (25 y 50nM). a) resultados después de 24h y b) 48h de transfección** \_\_\_\_\_ 101
- Figura 41. Cuantificación química del calcio mediante el método o-cresoltaleína complexona en CMLV VDRwt con MN, MC y MC + mimic de 145a** \_\_\_\_\_ 101
- Figura 42. Expresión relativa de OPN en CMLV VDRwt con los distintos tratamientos (MN, MC, MC+mimic)** \_\_\_\_\_ 102
- Figura 43. Possible interacción entre mir-145a y el gen Osteopontina mediante la región de siembra extendida y la región 3'UTR.** \_\_\_\_\_ 103
- Figura 44. Interacción detectada mediante el software IntaRna del mir-145a y el gen osteopontina.** 103
- Figura 45. Esquema de la posible regulación de la calcificación vascular por VDR** \_\_\_\_\_ 116
- Figura 46. Esquema resumen de los posibles efectos en la CV debidos a la eliminación de VDR** \_\_ 116



Anexos



## PUBLICACIONES

1: Valdivielso JM, Eritja À, Caus M, Bozic M. Glutamate-Gated NMDA Receptors: Insights into the Function and Signaling in the Kidney. *Biomolecules*. 2020 Jul 15;10(7):1051. doi: 10.3390/biom10071051. PMID: 32679780; PMCID: PMC7407907.

2: Bozic M, Caus M, Rodrigues-Diez RR, Pedraza N, Ruiz-Ortega M, Garí E, Gallel P, Panadés MJ, Martínez A, Fernández E, Valdivielso JM. Protective role of renal proximal tubular alpha-synuclein in the pathogenesis of kidney fibrosis. *Nat Commun*. 2020 Apr 23;11(1):1943. doi: 10.1038/s41467-020-15732-9. PMID: 32327648; PMCID: PMC7181766.



## **PARTICIPACIONES EN CONGRESOS**

**La eliminación del receptor de la vitamina D en las células de músculo liso vascular disminuye la calcificación vascular.** Caus M, Bozic M, Valdivielso JM, Fernández E. Burgos 2017 (póster).

**La falta de VDR en las células de musculo liso vascular contrarresta la calcificación vascular in vivo e in vitro.** Caus M, Bozic M, Fernandez E, Valdivielso JM. XLVIII Congreso de la sociedad española de nefrología y IX congreso iberoamericano de nefrología. Madrid 2018 (comunicación oral).

**Deletion of vitamin D receptor exclusively in vascular smooth muscle cells prevents vascular calcification.** Caus M, Bozic M, Fernández E, Valdivielso JM. 55th ERA-EDTA Congress. Copenhagen 2018 (póster).

**Absence of VDR solely in VSMCs impedes arterial calcification in CKD through targeting miR-145a and mir-155.** Caus M, Bozic M, Fernández E, Valdivielso JM. 56th ERA-EDTA Congress. Budapest 2019 (póster).

**Alpha-synuclein maintains the epithelial phenotype and protects from renal fibrosis.** Bozic M, Caus M, Rodrigues-Diez RR, Ruiz-Ortega M, Martínez A, Blasco A, Gallel P, Fernández E, Valdivielso JM. Budapest 2019 (póster).

**Alfa-sinucleina mantiene el fenotipo epitelial y protege de la fibrosis renal.** Bozic M, Caus M, Eritja A, Rodrigues-Diez RR, Ruiz-Ortega M, Garcia A, Gallel P, Fernández E, Valdivielso JM. XLIX Congreso nacional de la SEN. La Coruña 2019 (e-póster)

