

**Proteómica aplicada al estudio de
la calcificación vascular en la
enfermedad renal crónica**

**Proteomics applied to the study
of vascular calcification in
chronic kidney disease**

10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00061

12/16/2024

Proteómica aplicada al estudio de la calcificación vascular en la enfermedad renal crónica

Proteomics applied to the study of vascular calcification in chronic kidney disease

Covadonga Quirós-Caso¹, Natalia Carrillo-López², José Luis Fernández-Martín², Cristina Alonso-Montes², Jorge B. Cannata-Andía³

¹Laboratorio de Medicina. Servicio de Bioquímica. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo. ²Metabolismo Óseo, Vascular y Enfermedades Inflamatorias Crónicas. Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA). Unidad de Gestión Clínica del Metabolismo Óseo. Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). REDinREN y RICORS2040. ISCIII. Oviedo.

³Departamento de Medicina. Universidad de Oviedo. Oviedo

Correspondencia: Cristina Alonso Montes. Unidad de Gestión Clínica del Metabolismo Óseo. Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). Avda. de Roma, s/n. 33011 Oviedo
E-mail: cristinaam.huca@gmail.com

Covadonga Quirós Caso y Natalia Carrillo López han contribuido por igual como primeras autoras. José Luis Fernández-Martín y Jorge B. Cannata-Andía han contribuido por igual como autores sénior.

Beca o ayuda económica: este artículo original ha sido financiado con una Beca FEIOMM de Investigación Básica 2021. Este trabajo ha sido parcialmente financiado por la RETIC REDinREN del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (RD06/0016/1013, RD12/0021/0023, RD16/0009/0017), la Red de Investigación Cooperativa Orientada a Resultados en Salud RICORS2040 (RD21/0005/0019), proyectos del ISCIII (PI11-00667 ICI14/00107, PI17/00384, PI20/00633 and PI24/01785), Plan Nacional de I+D+I 2008- 2011, Plan Estatal de

I+D+I 2013-2016, Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Plan Estatal de I+D+I 2013-2016 , Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación 2013-2017 y 2018-2022 del Principado de Asturias (GRUPIN14-028, IDI-2018-000152, IDI/2021/000080), Fundación Renal Íñigo Álvarez de Toledo (FRIAT) y beca FEIOMM de Investigación Básica 2021.

Conflicto de intereses: Jorge B. Cannata-Andía ha recibido subvenciones institucionales y personales de FAES, SPAFARMA y MabXience. El resto de autores declaran no tener conflictos de intereses.

Inteligencia artificial: los autores declaran no haber usado inteligencia artificial (IA) ni ninguna herramienta que use IA para la redacción del artículo.

Agradecimientos: a la Asociación para la Lucha Contra las Enfermedades Renales del Principado de Asturias (ALCER) y a la Asociación de Diabetes del Principado de Asturias (ASDIPAS).

Recibido: 13/09/2024

Aceptado: 02/12/2024

RESUMEN

Introducción: la calcificación vascular (CV) se asocia a un incremento de la mortalidad en la población general y en pacientes con enfermedad renal crónica, en los que la prevalencia es mucho mayor. La necesidad de un diagnóstico efectivo y precoz de la CV para mejorar las estrategias preventivas y pronósticas ha impulsado la investigación sobre biomarcadores. El objetivo de este trabajo es estudiar la expresión diferencial de proteínas asociadas al proceso de CV mediante técnicas de proteómica.

Material y métodos: se cultivaron células de músculo liso vascular en condiciones no calcificantes y calcificantes. La expresión diferencial de proteica se realizó mediante 2D-DIGE y LC-ESI-MS/MS y la identificación se realizó con el motor MASCOT.

Resultados: tras seis días de cultivo, se detectaron 121 *spots* de proteínas expresadas diferencialmente. De estas proteínas, 21 fueron identificadas en 24 *spots*. En las células cultivadas en medio calcificante, cuatro proteínas aumentaron significativamente su expresión; la del colágeno de tipo I fue la que mostró un mayor cambio (3,49 veces) respecto a las cultivadas en medio no calcificante. Otras proteínas, musculares y estructurales, mostraron una reducción en su expresión. Además, se observaron cambios en la expresión de nucleobindina-1 y endoplasmina que hasta la fecha no se habían relacionado con la CV.

Conclusión: los resultados confirmaron el descenso en la expresión de proteínas típicamente musculares y del citoesqueleto durante la CV. Además, se identificaron cambios en la expresión de proteínas que previamente no se habían relacionado con la CV y que podrían estar implicados en este proceso.

Palabras clave: Calcificación vascular. Enfermedad renal crónica. Proteómica. 2D-DIGE.

INTRODUCCIÓN

En los pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) los mecanismos de regulación de la homeostasis del calcio y del fósforo se hallan comprometidos, lo que da lugar a lo que se conoce como “alteraciones minerales y óseas de la enfermedad renal-crónica”, más conocidas por su acrónimo en inglés, CKD-MBD (*Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorders*), que incluye la calcificación vascular (CV) (1).

La CV se asocia a un incremento de la mortalidad en la población general (2) y principalmente en pacientes con ERC (3,4), en los que es más prevalente que en individuos de la misma edad con función renal preservada (5,6).

La elevada morbimortalidad de la ERC se ha atribuido a factores tradicionales y no tradicionales de riesgo. Al igual que en la población general, los factores de riesgo tradicionales (tabaquismo, hipertensión, diabetes y sexo masculino) son responsables en gran medida de la progresión de la CV. Sin embargo, estos factores no son suficientes para explicar la elevada prevalencia de las complicaciones cardiovasculares en pacientes con ERC (7). Entre los factores no tradicionales, la hiperfosfatemia es uno de los más estudiados relacionados con el aumento de CV y de mortalidad en los pacientes con ERC (8,9).

La CV se produce a través de un proceso complejo, activo y regulado en el que intervienen diferentes mecanismos (10-12). Hasta la fecha se han publicado diversos estudios que han permitido avanzar en el conocimiento de los mecanismos subyacentes al proceso de CV (7,10). Sin embargo, la imposibilidad de una detección precoz de la CV ha impulsado la investigación sobre nuevos posibles biomarcadores que puedan utilizarse para el diagnóstico temprano de la CV y que podrían mejorar sus estrategias preventivas y pronósticas. La espectrometría de masas aplicada a estudios de proteómica permite la caracterización del perfil proteico (proteoma) de una muestra biológica de forma rápida en un momento determinado. Por tanto, el objetivo fundamental de este trabajo fue estudiar la expresión diferencial de proteínas asociadas al proceso de CV mediante técnicas de proteómica utilizando un modelo de CV *in vitro* con células de músculo liso vascular (CMLV).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular y condiciones de calcificación

Se utilizó como CMLV la línea celular inmortal A7r5 de aorta de rata (ATCC CRL-1444™). Las células se cultivaron en DMEM (1,8 mM de calcio [Ca] y 1 mM de fosfato [P]; Lonza) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (10 %), glutamina (1 %) (Biochrom), aminoácidos no esenciales (ANE) (1 %), penicilina y estreptomycinina (1 %) (Biochrom).

Las células A7r5 se sembraron en 20 placas de 15 cm de diámetro (152 cm² de superficie). Para el análisis del contenido en calcio se usaron placas de seis pocillos (9,6 cm² de superficie). Cuando alcanzaron el 60-70 % de confluencia, se añadieron las condiciones experimentales. Para los experimentos de calcificación se utilizó el medio de cultivo DMEM-F12 para maximizar las diferencias entre las condiciones no calcificantes y calcificantes. Medio no calcificante (control): DMEM-F12 (1 mM de Ca y P) suplementado con BSA (0,1 %), penicilina y estreptomycinina (1 %). Medio calcificante: al medio no calcificante se le añadió un estímulo calcificante para que las células A7r5 cambiaran su fenotipo a tipo osteoblasto; en este caso se suplementó con Ca y P hasta una concentración final de 2 y 3 mM, respectivamente. En nuestras condiciones experimentales, concentraciones superiores a 2 mM de calcio y a 3 mM de fosfato producen una precipitación espontánea de Ca₃(PO₄).

Ambos estudios se realizaron en paralelo y el medio de cultivo se renovó cada dos días.

Contenido en calcio

El grado de mineralización se valoró mediante tinción con rojo de alizarina a los 6 días de cultivo en las condiciones calcificantes y no calcificantes. Brevemente, las células se lavaron con *phosphate buffer saline* (PBS), se fijaron con formaldehído (10 % en PBS) a 4 °C durante 45 minutos y, tras un lavado con agua desionizada, se tiñeron con rojo de alizarina al 2 % (pH del 4,2) durante 5 minutos.

Estudio de proteómica

Tras 6 días de cultivo y una vez comprobada la presencia de calcificación, las células se recogieron en 20 mL de PBS y se juntaron para obtener cuatro muestras cultivadas en medio no calcificante (C1, C2, C3 y C4) y cuatro muestras del cultivo en MC (P1, P2, P3 y P4). En ambos grupos las muestras se solubilizaron mediante sonicación en tampón de lisis (7M urea, 2M tiourea, 4 % CHAPS y 30 mM Tris). La concentración total de proteínas se midió utilizando el método Bradford (13) (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.).

Siguiendo las recomendaciones del fabricante se añadieron 400 pmol de CyDye™ DIGE FluorDyes (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) por 50 µg de proteína (los fluorocromos Cy3 y Cy5 se usaron para la tinción de las muestras y Cy2, para el estándar interno, resultado de la mezcla de la misma cantidad de proteína de las muestras cultivadas en condiciones no calcificantes y calcificantes). Las muestras se tiñeron por pares (condiciones no calcificantes y calcificantes) para evitar diferencias en el marcaje.

La separación de los extractos de proteínas marcadas se llevó a cabo en geles bidimensionales DIGE (*2D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis*), según las recomendaciones del fabricante (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Primera dimensión: las muestras se cargaron en tiras IPG (24 mm; pH de 3-10 NL) (GE Healthcare). Una vez realizada la primera dimensión, las tiras IPG se incubaron en un tampón de equilibrado (50 mM Tris-HCl, pH de 8,8, 6M urea, 30 % glicerol, 2 % SDS y trazas de azul de bromofenol) que contenía 0,5 % ditioneol (DTT) durante 15 minutos y a continuación, en el mismo tampón, con 4,5 % iodoacetamida otros 15 minutos. Para la segunda dimensión, las tiras se cargaron en geles de poliacrilamida (12,5 %) (Ettan DALT six system, GE Healthcare, Uppsala, Suecia) y se corrieron (2W/gel) durante 4 horas y 30 minutos hasta que el azul de bromofenol alcanzó el extremo del gel. Después, los geles 2D fueron escaneados (Ettan DigerImager, GE Healthcare, Uppsala, Suecia) a 100 µm de resolución con $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ de 488/520, 532/580 y 633/670 nm para Cy2, Cy3, y Cy5, respectivamente.

Se realizaron tres experimentos independientes para cada condición. El análisis de las imágenes se llevó a cabo con el programa informático DeCyder2D v7.0 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Para la selección de *spots*, la cuantificación del volumen y la normalización de las muestras en el gel se usó el módulo de análisis diferencial (DIA o *differential in-gel analysis*). El módulo de análisis de variación biológica (BVA o *biological variation analysis*) se usó para comparar los *spots* de proteínas entre los distintos geles e identificar aquellos que mostraron diferencias significativas.

Se realizó un gel preparativo en poliacrilamida (12,5 %) con 500 µg de proteína (la misma cantidad de cada muestra) siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. Las proteínas se visualizaron mediante tinción con Oriole™ Fluorescent Gel Stain (Biorad, Hercules, EE. UU.); la adquisición de las imágenes se realizó mediante un documentador de geles ChemiDoc™ XRS+ (Biorad, Hercules, EE. UU.).

Los *spots* expresados diferencialmente se cortaron manualmente. La digestión de los *spots* se realizó con 12,5 ng/µl tripsina en 50 mM bicarbonato de amonio durante 12 horas a 37 °C. Para la extracción de los péptidos se utilizó una disolución de ácido fórmico (1 %) y acetonitrilo (50 %) (Sigma Aldrich, St Louis, EE. UU.).

Identificación de proteínas

Los extractos de proteínas se analizaron usando un sistema de nanoHPLC (Ultimate 3000, Dionex/LC Packings) con muestreador automático conectado a un espectrómetro de masas de trampa iónica (ion Q-trap) (Applied Biosystems) con fuente de nanoelectrospray (ESI). La columna cromatográfica fue C-18 de 75 µm diámetro (Dionex/LC Packings) conectada a un capilar de óxido de silicio para generar el electroespray. El volumen de inyección de la muestra utilizado fue 1 µl y el flujo de la fase móvil, 0,125 mL/min (modo Split).

Los espectros de masas (MS/MS) obtenidos se analizaron con el *software* Analyst y se enfrentaron a la base de datos SwissProt para la identificación de las proteínas usando el motor MASCOT (MatrixScience). Los parámetros de búsqueda incluyeron una tolerancia de $\pm 1,2$ Da y posibles modificaciones de las proteínas, como deamidación, carbametilación y oxidación de la metionina. Se consideró que una proteína estaba identificada cuando se detectaron al menos dos péptidos diferentes. La función y la localización de las proteínas identificadas se asignaron de acuerdo con la información depositada en las bases de datos PubMed y ExPasy.

En los datos suplementarios se muestra un esquema de los procesos que se realizaron en el estudio de proteómica (Fig. suplementaria 1) y las imágenes representativas de los geles marcados con los fluorocromos Cy2, Cy3 y Cy5 y la imagen resultante de la unión de los tres fluorocromos (Fig. suplementaria 2).

Análisis estadístico

El análisis de los resultados del DIGE se realizó con el programa informático DeCyder2D v7.0 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) mediante análisis estadístico T-Student ($p < 0,05$). Se seleccionaron los *spots* de proteínas, que mostraron cambios en la expresión por encima de un umbral de 1,5.

RESULTADOS

Las condiciones experimentales de cultivo de las CMLV se mantuvieron hasta el sexto día de tratamiento, momento en el que se observó, mediante la tinción con rojo de alizarina, un aumento en la deposición de calcio en los cultivos tratados con medio calcificante (Fig. suplementaria 3).

Para evaluar la expresión diferencial de proteínas en cultivo de CMLV tratadas con medio calcificante respecto a las células cultivadas en condiciones no calcificantes se llevó a cabo el análisis comparativo 2D- DIGE. Aproximadamente, se detectaron 1860 *spots* de proteínas,

de los que 121 se expresaron diferencialmente ($p < 0,05$), y de estos, 101 *spots* se analizaron por LC-ESI-MS/MS (Fig. 1). Los espectros de masas obtenidos se enfrentaron a las bases de datos de modo que una puntuación individual superior a 32 obtenida en el Mascot indicó identidad u homología ($p < 0,05$). Se identificaron un total de 20 proteínas diferentes en 24 *spots*.

De las proteínas identificadas, cuatro aumentaron su expresión en las células cultivadas en medio calcificante respecto a las cultivadas en medio no calcificante (Tabla I). El colágeno de tipo I y la anexina A2 mostraron las mayores diferencias entre las condiciones no calcificantes y calcificantes (ratio 3,49 y 2,17, respectivamente) después de 6 días.

En la tabla II se muestran las 16 proteínas cuya expresión resultó inhibida en células cultivadas en medio calcificante respecto a las cultivadas en medio no calcificante. Las tropomiosinas (cadena beta, alfa-1 y alfa-3) fueron las proteínas que mostraron un mayor descenso cuando las CMLV se cultivaron en medio calcificante. Además, algunas de ellas se identificaron en varios *spots*, indicando posibles alteraciones en su estructura o modificaciones postraduccionales. Otras proteínas propias de células musculares que redujeron su expresión fueron la actina, la miosina-9, la desmina o la alfa-actina y otras proteínas del citoesqueleto, como la vimentina o la cadena alfa-1-A de la tubulina.

La proteína disulfuro isomerasa A6 y A1 y la endoplasmina fueron tres chaperonas localizadas en el retículo endoplásmico que redujeron su expresión más de seis, tres y dos veces, respectivamente, en las condiciones calcificantes respecto a las no calcificantes. También se observó una disminución en la expresión de nucleobindina-1, proteína de unión a calcio localizada en el aparato de Golgi y P3H1 que tiene función estructural y es un componente de la matriz extracelular.

DISCUSIÓN

La publicación de numerosos estudios sobre CV y ERC ha permitido conocer parcialmente el proceso de CV asociado a ERC. En este

sentido, las técnicas ómicas (genómica, transcriptómica y proteómica, junto con otras técnicas de análisis) proporcionan una poderosa herramienta para obtener e integrar información biológica del proceso de CV (14). Las proteínas, principales efectores de la mayor parte de los procesos biológicos, son las moléculas más adecuadas para usarse como marcadores o dianas para el tratamiento de las enfermedades debido a una relación estrecha entre las proteínas y los fenotipos. Por este motivo los resultados obtenidos en los estudios proteómicos podrían ser más reproducibles que los de genómica y la transcriptómica (14).

Tras el análisis por espectrometría de masas de los extractos proteicos obtenidos de las CMLV tras 6 días de cultivo en medio calcificante y no calcificante se identificaron 20 proteínas con una fiabilidad elevada.

De las cuatro proteínas identificadas que vieron aumentada su expresión en medio calcificante, la que presentó mayor cambio fue la cadena alfa del colágeno de tipo I. Hay varios trabajos que relacionan el aumento de los niveles del colágeno I y la CV. El colágeno I y III son los principales componentes de la matriz extracelular cuyos niveles se mantienen relativamente estables en condiciones fisiológicas. Sin embargo, niveles elevados de fosfato y de calcio aumentan la expresión de colágeno I, lo que favorece la diferenciación de las CMLV a células de tipo osteoblasto (15). Otra proteína implicada en la biosíntesis y en la maduración del colágeno es la prolil-3-hidroxilasa (P3H1), proteoglicano con actividad enzimática necesaria para la correcta formación de las hélices de colágeno, y cuya expresión se redujo en condiciones calcificantes, coincidiendo con otros trabajos en los que también se analiza el perfil de expresión proteico en CMLV en condiciones calcificantes (16). Además, ratones deficientes en esta proteína mostraron una hipermineralización de la matriz ósea (17). Cambios en las características de la matriz extracelular y en el comportamiento entre los constituyentes de la matriz influyen no solo en las propiedades mecánicas de los tejidos conectivos, sino que

contribuyen a modular el fenotipo celular, alterando la expresión de proteínas, la organización del citoesqueleto y, en consecuencia, las rutas de señalización intracelulares.

Otras proteínas del RER cuya expresión se encuentra alterada son las proteínas disulfuro isomerasa A1 y A6 (PDIA1, PDIA 6) implicadas en la formación de enlaces disulfuro, la isomerización y la reducción, actuando junto con chaperonas en la regulación de proteínas mal plegadas. La expresión de estas proteínas se encontró inhibida en condiciones calcificantes, y aunque no hay evidencias del papel de la PDIA6 en la CV, cambios en la expresión de PDIA1 se han asociado con un aumento de la CV y aórtica (18,19).

Dentro de este grupo de proteínas involucradas en el plegamiento y cuya expresión se encontró modificada en este estudio se encuentra la proteína de choque térmico de 60 kDa mitocondrial (CH60) y la endoplasmína (ENPL). La expresión de la proteína HSP 60 en la enfermedad vascular se ha correlacionado con la severidad del proceso de aterosclerosis y la respuesta antiinflamatoria (20). Varios estudios han demostrado que la expresión de HSP está estrechamente relacionada con el proceso de CV (21-23). Por otra parte, aunque no se ha descrito asociación entre la ENPL y la CV, esta proteína participa en la diferenciación normal de las células musculares cardíacas, lisas y esqueléticas (24), por lo que cambios en su expresión podrían alterar su diferenciación normal.

En el presente estudio también se observó un aumento en dos proteínas de unión a Ca^{+2} , como la reticulocalbina-2 (Rcn-2) y la anexina A2. Las proteínas de unión a Ca (CaBP o *calcium binding protein*) a través de dominios específicos participan activamente en muchos procesos celulares, como la homeostasis del Ca^{+2} o rutas de señalización (25). La iniciación de la mineralización requiere la entrada de Ca^{+2} en las vesículas de la matriz. En concreto, Rcn-2 se ha descrito como un mediador de la CV que aumenta la expresión de marcadores osteogénicos y reduce la de marcadores de fenotipo contráctil en CMLV (26). Por otro lado, las anexinas son una familia de

proteínas de unión a membrana dependientes de Ca. Diferentes estudios han mostrado la importancia de las anexinas en la formación de vesículas de la matriz a través de la entrada de Ca y del inicio de la mineralización (27) y las semejanzas existentes entre el proceso de formación de vesículas de matriz a partir de las membranas celulares de las CMLV y los condrocitos, incluyendo el enriquecimiento de las anexinas A2, A5 y A6 como desencadenante del proceso de mineralización (28). Otra proteína de unión a calcio, pero que en este caso se encontró inhibida, es la nucleobindina 1 (NUCB1), localizada en el aparato de Golgi, donde desempeña un importante papel en la homeostasis del Ca (29), aunque hasta el momento no hay trabajos que la asocien con la CV.

Asimismo, en concordancia con trabajos previos llevados a cabo en modelos *in vivo* e *in vitro* de CV y proteómica, los resultados de este trabajo mostraron un descenso en la expresión de proteínas estructurales y en la desregulación de las proteínas del citoesqueleto en las CMLV (16,30,31). En este grupo de proteínas, las que experimentaron mayor descenso fueron las proteínas típicamente musculares (tropomiosina, actina, desmina, miosina, etc.). Este hecho puede interpretarse como una pérdida del fenotipo muscular de las CMLV como consecuencia de la exposición a altas concentraciones de P y Ca, ya descrito en otros trabajos (32).

Uno de los problemas de la CV es que se diagnostica en etapas tardías, una vez que ya está establecida, y hasta la fecha no se han descrito terapias que se dirijan específicamente al tratamiento de la CV. Además, las técnicas de diagnóstico empleadas, principalmente basadas en técnicas de imagen, pueden estar limitadas debido a factores como el coste, la disponibilidad y la exposición a la radiación (33). Por tanto, la identificación de biomarcadores circulantes mínimamente invasivos, sensibles y específicos que puedan identificar la presencia de CV en etapas tempranas podría presentarse como una alternativa de gran interés. Las proteínas identificadas en este trabajo podrían ayudar en la búsqueda de los

biomarcadores que permitan identificar a los pacientes con mayor riesgo de desarrollar CV, o incluso podrían utilizarse como dianas terapéuticas una vez validados en otros estudios.

Este tipo de estudios presenta una serie de limitaciones, ya que la identificación de proteínas está limitada por la cantidad y la calidad (poca concentración de sales, ácidos nucleicos, lípidos, etc.) del extracto proteínico obtenido, lo que depende directamente de la eficacia del método de extracción, y la preparación de las muestras, que son fundamentales para la calidad de los resultados (34). En este trabajo, además de las proteínas que se identificaron con alta fiabilidad, también se detectaron otras con una puntuación baja, lo que podría deberse a diferentes razones (35): en los *spots* cortados la concentración de algunas proteínas puede ser muy inferior respecto a otras mayoritarias y las modificaciones postranscripcionales o proteólisis de algunas proteínas podrían alterar la disponibilidad de los péptidos para su identificación. También hay que tener en cuenta que, al tratarse de un modelo de calcificación *in vitro*, no permite una comparación directa entre el estado de ERC y un control sano, ya que la ERC implica factores sistémicos y condiciones fisiológicas que no se capturan completamente en este modelo. Otra limitación a considerar es que la línea celular utilizada fue de rata, por lo que la traslación de los resultados a humanos es limitada. Por otra parte, la caracterización del perfil proteico de las células se ha llevado a cabo en un modelo de calcificación que se mantuvo durante seis días. Análisis en otros puntos del proceso contribuirían a profundizar en el conocimiento de la calcificación vascular. Es posible que en modelos en los que la calcificación pudiese mantenerse durante períodos más prolongados los niveles de algunas proteínas podrían haber sido mayores.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos confirmaron un cambio en la expresión fenotípica de las células musculares, con un descenso de las

proteínas típicamente musculares y del citoesqueleto. Además, fue posible identificar cambios en la expresión de proteínas que previamente no se habían relacionado con la CV y que podrían participar en dicho proceso. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo, sería de gran utilidad realizar experimentos complementarios que permitiesen esclarecer el papel de estas y de otras proteínas expresadas diferencialmente en el proceso de CV. Estas proteínas podrían utilizarse como marcadores del estadio precoz de la enfermedad o como moléculas diana para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que permitan reducir la morbimortalidad de pacientes con ERC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Moe S, Drueke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2006;69(11):1945-53.
2. Peng AW, Dardari ZA, Blumenthal RS, Dzaye O, Obisesan OH, Iftekhar Uddin SM, et al. Very High Coronary Artery Calcium (≥ 1000) and Association With Cardiovascular Disease Events, Non-Cardiovascular Disease Outcomes, and Mortality: Results From MESA. *Circulation*. 2021;143(16):1571-83.
3. Chen J, Budoff MJ, Reilly MP, Yang W, Rosas SE, Rahman M, et al. Coronary Artery Calcification and Risk of Cardiovascular Disease and Death Among Patients With Chronic Kidney Disease. *JAMA Cardiol* 2017;2(6):635-43.
4. Rodríguez-García M, Gómez-Alonso C, Naves-Díaz M, Díaz-López JB, Díaz-Corte C, Cannata-Andía JB. Vascular calcifications, vertebral fractures and mortality in haemodialysis patients. *Nephrol, Dial, Transplant* 2009;24(1):239-46. DOI: 10.1093/ndt/gfn466

5. Nelson AJ, Raggi P, Wolf M, Gold AM, Chertow GM, Roe MT. Targeting Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *JACC Basic Transl Sci* 2020;5(4):398-412. DOI: 10.1016/j.jacbts.2020.02.002
6. Dilsizian V, Gewirtz H, Marwick TH, Kwong RY, Raggi P, Al-Mallah MH, et al. Cardiac Imaging for Coronary Heart Disease Risk Stratification in Chronic Kidney Disease. *JACC Cardiovasc Imaging* 2021;14(3):669-82. DOI: 10.1016/j.jcmg.2020.05.035
7. Stenvinkel P, Carrero JJ, Axelsson J, Lindholm B, Heimbürger O, Massy Z. Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular risk in the chronic kidney disease patient: how do new pieces fit into the uremic puzzle? *CJASN* 2008;3(2):505-21.
8. Adeney KL, Siscovick DS, Ix JH, Seliger SL, Shlipak MG, Jenny NS, et al. Association of serum phosphate with vascular and valvular calcification in moderate CKD. *JASN* 2009;20(2):381-7.
9. Román-García P, Carrillo-López N, Cannata-Andía JB. Pathogenesis of bone and mineral related disorders in chronic kidney disease: key role of hyperphosphatemia. *J Renal Care* 2009;35(Suppl.1):34-8.
10. Cannata-Andia JB, Román-García P, Hruska K. The connections between vascular calcification and bone health. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26(11):3429-36.
11. Shanahan CM. Vascular calcification-a matter of damage limitation? *Nephrol Dial Transplant* 2006;21(5):1166-9.
12. Zhu D, Mackenzie NC, Farquharson C, Macrae VE. Mechanisms and clinical consequences of vascular calcification. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012;3:95.
13. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976;72:248-54.

14. Qian Y, Li L, Sun Z, Liu J, Yuan W, Wang Z. A multi-omics view of the complex mechanism of vascular calcification. *Biomed Pharmacother* 2021;135:111192.
15. Zhao Y, Sun Z, Li L, Yuan W, Wang Z. Role of Collagen in Vascular Calcification. *J Cardiovasc Pharmacol* 2022;80(6):769-78.
16. Carrillo López N, Tuñón LePoultel D, Quirós Caso C, Rodríguez I, Cannata Andía J, Naves Díaz M. Efecto de dosis suprafisiológicas de calcitriol sobre la expresión proteica de células de músculo liso vascular *Rev Osteoporos Metab Miner* 2017;9:130-8.
17. Fratzl-Zelman N, Bächinger HP, Vranka JA, Roschger P, Klaushofer K, Rauch F. Bone matrix hypermineralization in prolyl-3 hydroxylase 1 deficient mice. *Bone* 2016;85:15-22.
18. Liberman M, Bassi E, Martinatti MK, Lario FC, Wosniak J, Jr., Pomerantzeff PM, et al. Oxidant generation predominates around calcifying foci and enhances progression of aortic valve calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28(3):463-70.
19. Pescatore LA, Nolasco P, Farias-Silva E, Jensen L, Fernandes CG, Almeida YE, et al. Abstract 641: Protein Disulfide Isomerase-A1 Overexpression Enhances Vascular Calcification in Mice 2017;37(Suppl.1):A641-A.
20. Dupont A, Corseaux D, Dekeyzer O, Drobecq H, Guihot AL, Susen S, et al. The proteome and secretome of human arterial smooth muscle cells. *Proteomics* 2005;5(2):585-96.
21. Ding X, Qiu Y, Wu G, Li S, Cai M, Liang Y, et al. l-thyroxine attenuates extracellular Hsp90 α -induced vascular endothelial calcification in diabetes mellitus, as revealed by parallel metabolic profiles. *Atherosclerosis* 2024;392:117527.
22. Shen Q, Chen Q, Liu Y, Xue X, Shen X, He Q, et al. Aspirin relieves the calcification of aortic smooth muscle cells by enhancing the heat shock response. *Pharmaceutical Biol* 2022;60(1):17-24.

23. Boccardi C, Cecchetti A, Caselli A, Camici G, Evangelista M, Mercatanti A, et al. A proteomic approach to the investigation of early events involved in the activation of vascular smooth muscle cells. *Cell Tissue Res* 2007;329(1):119-28.
24. Wanderling S, Simen BB, Ostrovsky O, Ahmed NT, Vogen SM, Gidalevitz T, et al. GRP94 is essential for mesoderm induction and muscle development because it regulates insulin-like growth factor secretion. *Mol Biol Cell*. 2007;18(10):3764-75.
25. Zhou X, Cui Y, Luan J, Zhou X, Zhang G, Zhang X, et al. Label-free quantification proteomics reveals novel calcium binding proteins in matrix vesicles isolated from mineralizing Saos-2 cells. *Bioscience Trends* 2013;7(3):144-51.
26. Chang Z, Yan G, Yan H, Zheng J, Liu Z. Reticulocalbin 2 enhances osteogenic differentiation of human vascular smooth muscle cells in diabetic conditions. *Life Sci* 2019;233:116746.
27. Xiao Z, Blonder J, Zhou M, Veenstra TD. Proteomic analysis of extracellular matrix and vesicles. *J Proteomics* 2009;72(1):34-45.
28. Kapustin AN, Davies JD, Reynolds JL, McNair R, Jones GT, Sidibe A, et al. Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization. *Circ Res* 2011;109(1):e1-12.
29. Lin P, Le-Niculescu H, Hofmeister R, McCaffery JM, Jin M, Hennemann H, et al. The mammalian calcium-binding protein, nucleobindin (CALNUC), is a Golgi resident protein. *J Cell Biol* 1998;141(7):1515-27.
30. Quirós-González I, Román-García P, Alonso-Montes C, Barrio-Vázquez S, Carrillo-López N, Naves-Díaz M, et al. Lamin A is involved in the development of vascular calcification induced by chronic kidney failure and phosphorus load. *Bone* 2016;84:160-8.

31. Carrillo-López N, Panizo S, Martín-Carro B, Mayo Barrallo JC, Román-García P, García-Castro R, et al. Redox Metabolism and Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *Biomolecules* 2023;13(9).
32. De la Cuesta F, Zubiri I, Maroto AS, Posada M, Padial LR, Vivanco F, et al. Deregulation of smooth muscle cell cytoskeleton within the human atherosclerotic coronary media layer. *J Proteomics* 2013;82:155-65.
33. Smith ER, Hewitson TD, Holt SG. Diagnostic Tests for Vascular Calcification. *Adv Chronic Kidney Dis* 2019;26(6):445-63.
34. Gil-Dones F, Martín-Rojas T, López-Almodóvar LF, Juárez-Tosina R, De la Cuesta F, Álvarez-Llamas G, et al. Obtención de un protocolo óptimo para el análisis proteómico de válvulas aórticas humanas sanas y estenóticas. *Revista Española de Cardiología* 2010;63(1):46-53.
35. Bagnato C, Thumar J, Mayya V, Hwang SI, Zebroski H, Claffey KP, et al. Proteomics analysis of human coronary atherosclerotic plaque: a feasibility study of direct tissue proteomics by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2007;6(6):1088-102.

Tabla I. Proteínas sobreexpresadas en cultivos de CMVL A7r5 cultivadas en condiciones calcificantes respecto a las cultivadas en condiciones no calcificantes e identificadas por LC-MS/MS. Se muestra el número de *spot*, el símbolo del Mascot, la función y la localización de la proteína y el valor teórico de la masa (Da) y el punto isoeléctrico (pI) obtenido de las bases de datos, es decir, sin tener en cuenta posibles alteraciones o modificaciones postraslacionales. Otros datos del análisis por espectrometría de masas, como el número de péptidos identificados, también fueron incluidos (el número de péptidos únicos se indican entre paréntesis)

N.º	Símbolo MASCO T	Nombre	Función	Localización	p	Tasa	Score	Masa	pI	Péptid
1	CO1A1_RAT	Cadena α -1 colágeno (I)	Estructural	Matriz extracelular	0,0023	3,49	80	137869	9,28	2 (1)
2	ANXA2_RAT	Anexina A2	Unión a Ca e interacción con citoesqueleto	Matriz extracelular	0,018	2,17	111	38654	7,53	3 (3)
3	CH60_RAT	Proteína de choque térmico 60 kDa mitocondrial	Estrés celular (chaperona)	Matriz mitocondrial	0,0072	1,57	136	60917	5,91	2 (2)
4	RCN2_RAT	Reticulocalbina-2	Unión a Ca	RER	0,017	1,54	131	37410	4,23	3 (2)

RER: retículo endoplasmático rugoso.

Tabla II. Proteínas inhibidas en cultivos de CMVL A7r5 sometida a tratamiento de calcificación respecto al control

N.º de spot	Símbolo MASCO T	Nombre	Función	Localización	p	Tasa de	Score	Masa (Da)	pI	Péptidos
5	TPM2_R	Tropom	Citoesqu	Citoplas	0,0	-	17	3281	4,66	6

	AT	iosina cadena beta	eleto (estruct ural)	ma	075	10, 4	0	7		(5)
6	PDIA6_ RAT	Proteín a disulfur o isomer asa A6	Chapero na	RE	0,0 16	- 6,4 5	83	4810 0	4,95	2 (1)
7	TPM1_R AT	Tropom iosina cadena alfa-1	Citoesqu eleto (estruct ural) y adhesió n celular	Citoplas ma	6 e ⁻ 006	- 6,3 9	29 9	3266 1	4,69	11 (9)
	TPM3_R AT	Tropom iosina cadena alfa-3	Citoesqu eleto (estruct ural)	Citoplas ma			10 0	2898 9	4,75	5 (3)
8	TPM1_R AT	Tropom iosina cadena alfa-1	Citoesqu eleto (estruct ural) y adhesió n celular	Citoplas ma	0,0 055	- 6,2 1	89	3266 1	4,69	2 (2)
	TPM2_R AT	Tropom iosina cadena beta	Citoesqu eleto (estruct ural)				89	3281 7	4,66	2 (2)
9	VIME_R AT	Vimenti na	Citoesqu eleto	Citoplas ma	0,0 18	- 5,1 7	24 8	5370 0	5,05	7 (7)
	NUCB1_ RAT	Nucleo bindina	Unión a Ca	Aparato de Golgi			13 8	5347 4	5,01	4 (3)

		-1								
	TBA1A_RAT	Tubulina alfa-1^a	Citoesqueleto	Citoplasma			132	50104	4,94	2 (2)
10	ENPL_RAT	Endoplasmina	Chaperona (estrés oxidativo) Unión a Ca	RE	0,02	-3,49	235	92713	4,69	4 (4)
11	ACTN1_RAT	Alfa-actinina-1	Citoesqueleto y motilidad celular interna	Citoplasma	0,0098	-2,63	523	102896	5,23	16 (13)
12	ACTB_RAT	Actina, citoplasmática 1	Citoesqueleto Estructural	Citoplasma	0,0098	-2,63	53	41710	5,21	2 (1)
13	PDIA1_RAT	Proteína disulfuro-isomerasa A1	Chaperona (estrés)	RE	0,016	-2,37	278	56916	4,77	5 (5)
14	DESM_RAT	Desmina	Estructural	Citoplasma	0,0043	-2,32	47	53424	5,21	2 (1)
15	ACTA_RAT	Actina, músculo liso aorta	Citoesqueleto y motilidad celular	Citoplasma	0.032	-2,3	159	41982	5,24	7 (5)

1 6	ACTG_R AT	Actina, 2 citoplas mática	Citoesqueleto y motilidad celular	Citoplasma	0,0 32	-	2,3	31 7	4176 6	5,31	7 (5)
	ACTA_R AT	Actina, músculo liso aorta						14 5	4198 2		
1 7	MYH9_R AT	Miosina -9	Citoesqueleto	Citoplasma	0,0 17	-	2,1 5	16 8	2261 97	5,49	5 (3)
1 8	ACTA_R AT	Actina, músculo liso aorta	Citoesqueleto y motilidad celular	Citoplasma	0,0 15	-	1,9 3	12 7	4198 2	5,24	4 (3)
	ACTB_R AT	Actina 1 citoplas mática						35 4	4771 0		
1 9	P3H1_R AT	Prolil 3- hidroxilasa 1	Estructural Componente de matriz extracelular	RE Secretado a matriz extracelular	0,0 5	-	1,8 8	22 4	8233 8	5	6 (6)
2 0	ACTN4_ RAT	Alfa- actinina-1	Citoesqueleto y motilidad celular interna	Citoplasma	0,0 49	-	1,5	32 6	1048 49	5,27	6 (6)

RE: Retículo endoplasmático.

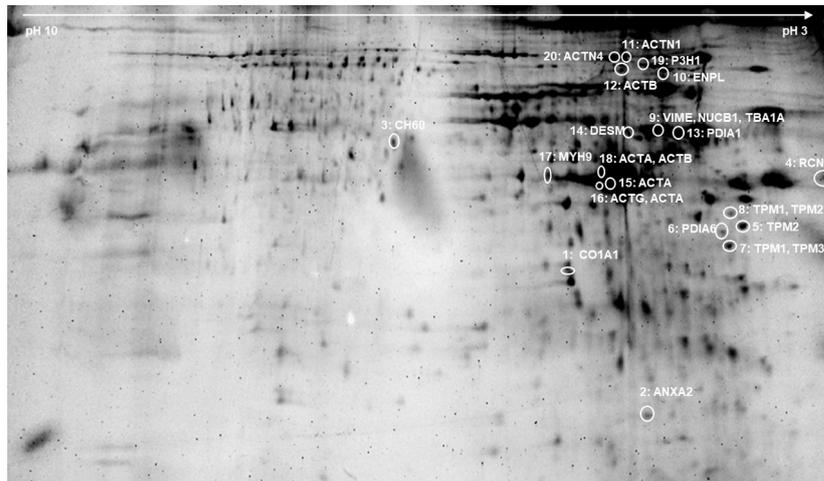
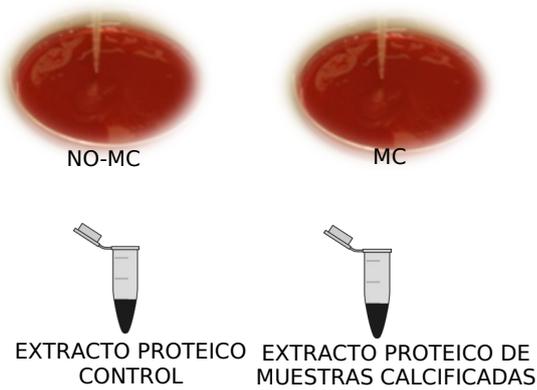
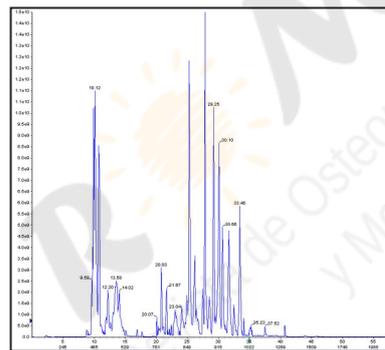
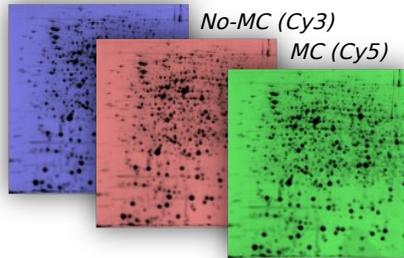


Figura 1. Mapa del perfil de proteínas expresadas de forma diferencial en cultivos de CMLV en condiciones calcificantes respecto a las no calcificantes. Gel preparativo. Se indica el número de *spot* y el símbolo MASCOT de las proteínas identificadas.

Datos suplementarios:



Estándar interno (Cy 2)



INDUCCIÓN DE LA CALCIFICACIÓN

Recogida de las células

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

CLEAN-UP (ELIMINACIÓN DE SALES)

Cuantificación proteínas

SEPARACIÓN EN GELES 2D-DIGE

*Marcaje de proteínas
Electroforesis 2D-DIGE
Análisis de imagen (DIA y BVA)
Selección y Corte de "spots"
Digestión enzimática de proteínas*

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS LC/MS-MS

*Mascot
Base de datos Swiss Prot*

Figura suplementaria 1. Tratamiento de las muestras para el análisis proteómico por LC-MS/MS.

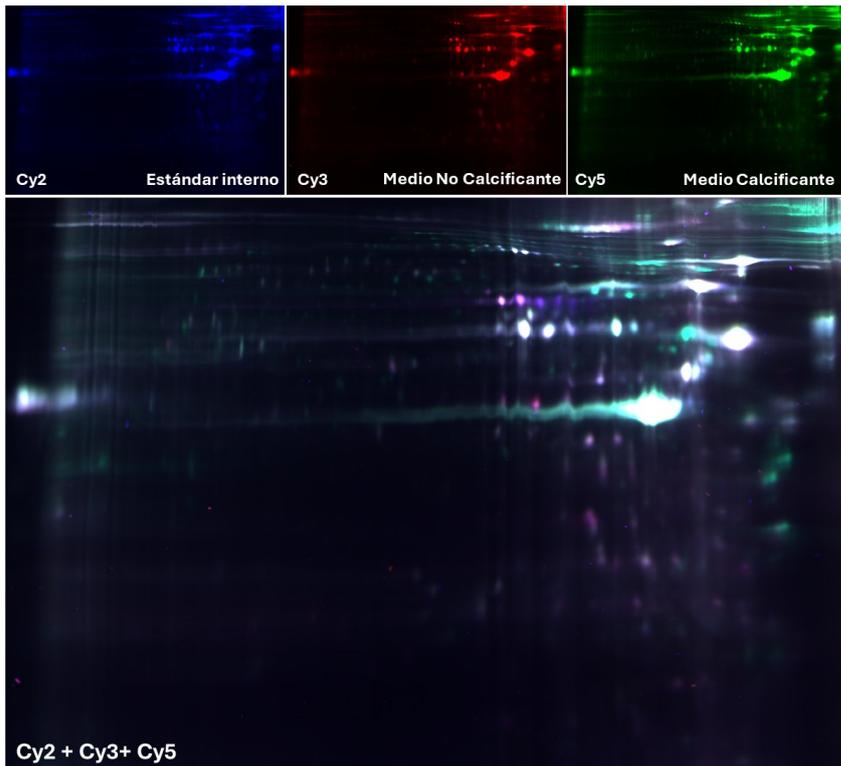


Figura suplementaria 2. Imágenes representativas de los geles resultantes de la electroforesis de las proteínas de las células cultivadas en medio no calcificante (Cy3) y calcificante (Cy5), del estándar interno (Cy2) y el resultante de la unión de los tres (Cy2 + Cy3 + Cy5).

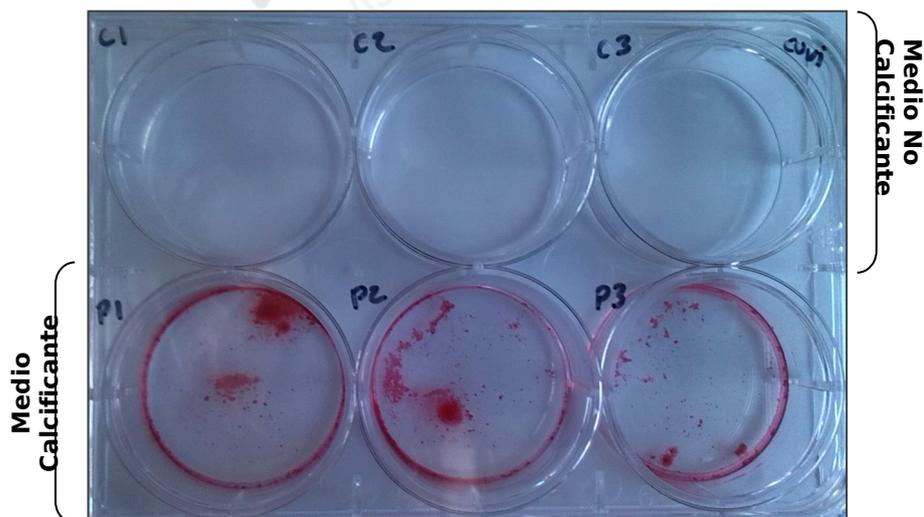


Figura suplementaria 3. Tinción con rojo alizarina de las CMLV tras 6 días de cultivo en condiciones no calcificantes y calcificantes.