



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS  
BIOMÉDICAS**

**ESTUDIOS QUÍMICO  
ESTRUCTURALES DE LAS  
MACROMOLÉCULAS BIOLÓGICAS  
IMPLICADAS EN LA BIOMINERALIZACIÓN  
CARDIOVASCULAR DE  
FOSFATO DE CALCIO**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

**Q.F.B. AZUCENA EUNICE JIMÉNEZ CORONA**

**Director de tesis: DR. ABEL MORENO CÁRCAMO**



MÉXICO, D. F.

Junio 2010.

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Abel Moreno Cárcamo. El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en los siguientes laboratorios e Instituciones: Laboratorio 3 del Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México; Laboratorio 302 del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México; y en el Departamento de Histología y Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Abel Moreno Cárcamo	Instituto de Química, UNAM
Dr. Jaime Mas Oliva	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Adela Rodríguez Romero	Instituto de Química, UNAM

Se agradece la asesoría y el apoyo en la identificación de la proteína Osteopontina por el Dr. Armando Pérez Torres, Investigador titular del departamento de Histología y Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM.

Se agradece la asesoría y el apoyo en la sobre-expresión de la proteína Osteopontina por la Dra. Nuria Sánchez Puig, Investigadora titular del departamento de Bioquímica, Instituto de Química, UNAM.

Se agradece la asesoría técnica de la Dra. Patricia Sánchez Cano, del laboratorio de Biología Molecular, del departamento de Bioquímica, Instituto de Química, UNAM.

Se reconoce la colaboración técnica del M. en C. Manuel Aguilar, del Instituto de Física, UNAM.

El presente trabajo de investigación contó con los siguientes apoyos económicos:

CONACyT; Proyectos: No. 82888 y 58515; DGAPA-UNAM Proyecto No. 214506.

Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACyT con No. de becario 203480 para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidenta	Dra. Aurora de la Peña Díaz	Facultad de Medicina, UNAM
Secretario	Dr. Abel Moreno Cárcamo	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dr. Alfredo Torres Larios	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr., Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda	Instituto Nacional de Medicina Genómica.

*A mis padres (Josefina y Victor) y  
Hermanos (Edna P. y Victor S).*

*“El valor  
no es la ausencia del miedo,  
sino el miedo  
junto a la voluntad de seguir”*

**(Feliciano Franco de Urdinarrain)**

*Gracias por estar  
conmigo siempre,  
los amo!!!.*

## AGRADECIMIENTOS

*A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por ser la casa que me ha albergado en estos años de formación académica, por lo cual la llevo tatuada en mi corazón.*

Al Dr. Abel Moreno Cárcamo por su asesoría en mi formación académica y por su apoyo en las diversas actividades académicas que he desarrollado dentro y fuera de la UNAM.

Al Dr. Jaime Mas Oliva por su asesoría en mi formación académica y por las ideas substanciales que han aportado a esta tesis doctoral.

A mis compañeros colaboradores y amigos:

- ❖ Dra. Lina Andrea Rivillas Acevedo.
- ❖ Dra. Deyanira Fuentes Silva.
- ❖ Dra. Vanessa Cabra Ledesma.
- ❖ Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda.
- ❖ Dr. David Jáuregui Zúñiga.
- ❖ Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros.
- ❖ Biol. Salvador Damián Zamacona.
- ❖ M.C. Martha Ustarroz
- ❖ M.C. Blanca Delgado Cohello.
- ❖ Biol. Edith Fernández Figueroa.
- ❖ Dr. Higinio Arzate.

# CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>I. RESUMEN</b>	7
<b>ABSTRACT</b>	8
<b>II. ABREVIATURAS</b>	10
<b>III. INTRODUCCIÓN</b>	
3.1. Antecedentes	12
3.2. Biomineralización vascular	17
3.3. Osteopontina	19
3.4. Algunos factores que inducen la biomineralización vascular	24
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	29
<b>V. OBJETIVOS</b>	30
<b>VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	31
<b>VII. MATERIALES Y METODOS (parte <i>In vitro</i>)</b>	33
<b>VIII. MATERIALES Y METODOS (parte <i>In vivo</i>)</b>	36
<b>IX. RESULTADOS (parte <i>In vitro</i>)</b>	45
<b>X. DISCUSIÓN (parte <i>In vitro</i>)</b>	50

<b>XI. RESULTADOS (parte <i>In vivo</i>)</b>	52
<b>XII. DISCUSIÓN (parte <i>In vivo</i>)</b>	65
<b>XIII. DISCUSIÓN GENERAL</b>	70
<b>XIV. CONCLUSIONES</b>	75
<b>XV. PERSPECTIVAS</b>	76
<b>XVI. REFERENCIAS</b>	79
<b>XVII. APENDICES</b>	89

**Artículo 1: Azucena E. Jiménez-Corona, Armando Pérez-Torres, Jaime Mas-Oliva, and Abel Moreno. Effect of Osteopontin, Chondroitin Sulfates (B, C), and Human Serum Albumin on the Crystallization Behavior of Hydroxyapatite in Agarose and Silica Hydrogels. *J. Crystal Growth and Design* (2008):8(4)1335-1339.**

**Artículo 2: Azucena E. Jiménez-Corona, Salvador Damián-Zamacona, Armando Pérez-Torres, Abel Moreno and Jaime Mas-Oliva. Osteopontin overexpression in atherogenesis and its role in the development of vascular calcification. *J. of Cellular Biochemistry* (2010) *In press*.**

## I. RESUMEN

En condiciones normales las sales de calcio solo precipitan en los tejidos mineralizados como huesos o dientes, mientras que, en condiciones patológicas se presenta una calcificación ectópica en diferentes tejidos normalmente no mineralizados como corazón, válvulas cardiacas, arterias y riñones, trayendo como consecuencia trastornos clínicos severos. Por lo tanto, la biomineralización vascular es considerada como un proceso degenerativo, que implica la acumulación de fosfato de calcio en la túnica íntima de la aorta. En este trabajo de tesis doctoral se determinaron las condiciones de síntesis de los cristales de hidroxiapatita (fosfato de calcio) en geles de agarosa y sílice y el efecto de la inhibición de la osteopontina, sobre la formación de estos cristales (*In vitro*). Aunado a estos estudios, se empleó un modelo animal en conejos (*Nueva Zelanda*) hipercolesterolémicos, con el objeto de aislar e identificar a la osteopontina, ya que fue la principal proteína que inhibe el proceso de nucleación de los cristales de hidroxiapatita en geles de agarosa y sílice. Los resultados del estudio *In vivo*, nos permitieron observar la interacción biomineral-biomolécula durante el desarrollo de la placa de ateroma y como consecuencia a este proceso crónico patológico, el desarrollo de la biomineralización vascular. Asimismo, se presenta un estudio sistemático del tipo de lesión en la aorta por diferentes técnicas como: Microscopía electrónica de transmisión, Microscopía electrónica de barrido, tinciones histoquímicas específicas para detectar sales de calcio y particularmente la inmunolocalización de la osteopontina, por medio de inmunohistoquímica y observar los niveles de sobreexpresión de osteopontina por western blot. De forma paralela, se observó la sobreexpresión de esta proteína localizada en los



centros de nucleación de la hidroxiapatita, particularmente en la neointima de la placa aterosclerótica. Aunado a los estudios anteriores, se desarrolló un estudio *In vitro* de internalización de lipoproteínas oxidadas y acetiladas en células de músculo liso vascular de humano, donde se observó por medio de Microscopia confocal y Western blot que estas células sobre-expresan a la osteopontina en un ambiente de estrés oxidativo.

## **ABSTRACT**

The chemical behavior of calcium in living organisms is quite interesting. For instance, calcium salts rarely crystallize in different tissues apart than bones. However, in abnormal conditions, the crystallization of calcium salts occurs in soft tissues causing severe damage in cardiac valves, arteries, and kidney. However, vascular biomineralization is considered a degenerative process, which involves the accumulation of calcium phosphate in the tunica intima of aorta. In this study we determined crystal growth of hydroxyapatite in agarose, silica hydrogels, and the inhibitory effect of osteopontin, chondroitin sulfate B and C on the formation of these hydroxyapatite crystals. In addition to these studies *in vitro*, we used an animal model of hypercholesterolemic rabbits (New Zealand), to isolate and to identify osteopontin as the main protein involved in this inhibitory process of hydroxyapatite *In vitro*. The *In vivo* involved in results allowed to observe the biostructural interaction during development of the atherosclerotic plaque, and consequently the chronic and pathological process, is related to vascular biomirelalization. It was performed a systematic study of lesion type in the aorta followed by different techniques, such as transmission electron microscopy, scanning electron microscopy, histochemistry and immunolocalization of osteopontin. In particular, by immunohistochemistry, and western

blot, the over-expression of this protein, the nucleation were observed of hydroxyapatite centers, in the neointima of atherosclerotic plaque. Finally, in order to prove our hypothesis that osteopontin is overexpressed in vascular smooth muscle cells, as well as in endothelial cells in an environment of oxidative stress conditions, inhibiting the nucleation of hydroxyapatite during the development of vascular calcification in atheroma plaque. We developed an *In vitro* internalization and visualization of oxidized lipoproteins in vascular smooth muscle cells from human, by means of confocal microscopy and western blot that showed how these cells to over-express osteopontin and participate in an oxidative stress conditions.

## **II. ABREVIATURAS:**

(Por sus siglas en inglés)

ATCC: Colección de cultivos de tipo americano

BASMC: Células de músculo liso de aorta de bovino

BMP: Proteína morfogenética ósea

BMPs: Proteínas morfogenéticas óseas

BMP2: Proteína morfogenética ósea tipo-2

BMP4: Proteína morfogenética ósea tipo-4

BV: Biomineralización vascular

CAD: Enfermedad arterial coronaria

Cbfa1: Factor de unión central- $\alpha$ 1

CKD: Enfermedad renal crónica

CSB: Sulfato de condroitina tipo B

CSC: Sulfato de condroitina tipo C

CVC: Células vasculares calcificadas

DiI: 3,3'-dioctadecilindocarbocianina

DMSO: Sulfóxido de dimetilo

ECGS: Suplemento de crecimiento celular endotelial

ECM: Matriz extracelular

HA-VSMC: Células de músculo liso vascular de aorta de humano

HAP: Hidroxiapatita

H&E: Hematoxilina y Eosina

HEPES: Ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineetanesulfónico

HSA: Albúmina de suero humano

HSMC: Células músculo liso de humano

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LDLac: Lipoproteínas de baja densidad acetiladas

LDLn: Lipoproteínas de baja densidad nativas

LDLox: Lipoproteínas de baja densidad oxidadas

MMP: Metaloproteinasas

MGP: Proteína GLA de matriz ácido  $\gamma$ - carboxiglutamico

OPG: Osteoprotegerina

OPN: Osteopontina

PPi: Pirofosfato inorgánico

RGD-región: región de unión Arginina-Glicina-Aspartato

ROS: Especies de oxígeno reactivo

TES: Ácido N-[Tris(hidroximetil)metil]-2-aminoetanesulfónico

TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante- $\beta$

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral- $\alpha$

SMC: Células de músculo liso

SR-A: Receptor basurero tipo A

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VSMC: Células de músculo liso vascular

## III. INTRODUCCIÓN

### 3.1 Antecedentes.

Muchos de los biominerales conocidos en la naturaleza presentan la propiedad de formarse a presión y temperatura ambiente. Por lo cual, este tipo de observaciones inspiraron décadas de investigaciones, enfocadas siempre en descubrir algunos de sus “secretos estructurales”; específicamente, el o los mecanismos utilizados por los organismos para formarlos. El primer trabajo formal de biomineralización lo llevó a cabo Lowenstam en 1962<sup>1</sup>, en él se describió la biomineralización de la magnetita en dientes de quitones (moluscos). Desde entonces y hasta el momento se han descrito más de 70 tipos diferentes de minerales en seres vivos (Weiner & Addadi, 2002)<sup>2</sup>. Estos biominerales participan en una amplia variedad de procesos biológicos ejemplo de estos son los huesos, dientes, conchas, cascarones de huevos (Mann 2001)<sup>3</sup>, o en procesos patológicos como las calcificaciones cardiovasculares, los cálculos renales y cálculos biliares (Anderson 1983)<sup>4</sup>. En estudios ultraestructurales y bioquímicos de depósitos de calcio en placas ateroscleróticas, demostraron que la composición de estos cristales es principalmente de hidroxiapatita (HAP)  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . [Schimid K *et al.*, 1980]<sup>5</sup>.

En 2001, Beshensky y colaboradores (2001) observaron que la presencia de algunas macromoléculas biológicas como el complejo glutation-S-transferasa-OPN, la proteína Tamm-Horsfall, el sulfato de condroitina “B”, el sulfato de condroitina “C”, la albumina de suero humano, el ácido poliaspártico y la osteopontina, inhibían el crecimiento de cristales de HAP en cálculos renales<sup>6</sup>. Debido a lo anterior, en este trabajo nosotros estudiamos el efecto de inducción o inhibición que ejerce la OPN en los cristales de HAP, desarrollando dos modelos: uno *In vitro* en geles de sílice y agarosa y otro modelo *In vivo*

desarrollado en conejos hipercolesterolémicos y de esta manera ver cuál es el efecto que ejerce la OPN sobre la cristalización de la HAP, en el mecanismo de la biomineralización vascular.

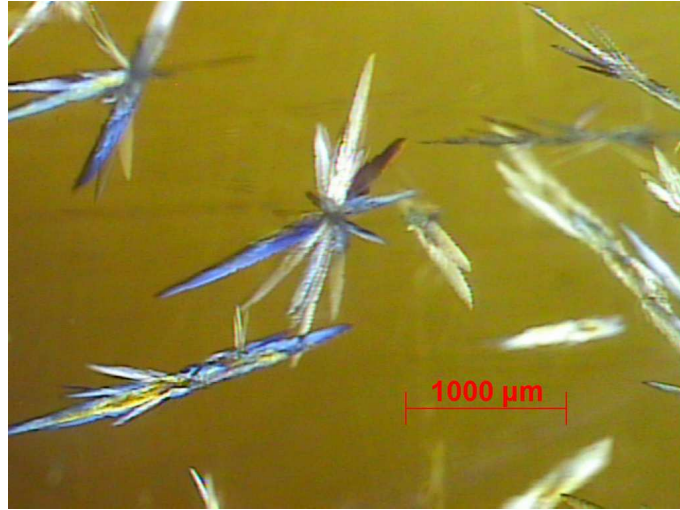
### **3.1.1 Introducción a la biomineralización.**

La biomineralización se define como el estudio de la formación, estructura y propiedades de los sólidos inorgánicos depositados en sistemas biológicos (Mann 2001)<sup>3</sup>. Desde hace aproximadamente 3500 millones de años, los organismos han estado usando minerales de una forma u otra. La evidencia de esta manera temprana de manipulación mineral está preservada en los fósiles estromatolíticos. Los estromatolitos son comunidades de organismos procarióticos que indirectamente inducen la formación de minerales para involucrarse a sí mismos, es decir, se agrupan en colonias formando rocas sedimentarias. Desde esa época, los organismos lentamente desarrollaron la habilidad de controlar la formación mineral. Hace aproximadamente 540 millones de años, en un periodo de pocos millones de años, una multitud de organismos multicelulares empezaron a producir estructuras esqueléticas mineralizadas. En este periodo crucial, las bases estructurales de la biomineralización se establecieron (Addadi, 1992)<sup>7</sup>. Hoy en día se conoce un gran número de biominerales. Estos se encuentran en organismos unicelulares y multicelulares. La mayoría contienen cationes divalentes de metales alcalinotérreos ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ) unidos a aniones como los carbonatos, oxalatos, sulfatos, fosfatos, e hidróxidos/óxidos. Menos comunes son los metales como el Mn, Au, Ag, Pt, Cu, Zn, Cd, y Pb que se depositan en algunas bacterias, generalmente como sulfitos metálicos (Mann, 1989)<sup>8</sup>. En la biomineralización, las formas cristalinas o amorfas generalmente están asociadas con una función biológica específica, por ejemplo: fuerza mecánica (dientes), soporte estructural,

para protección de tejidos blandos (esqueleto) y protección contra depredadores (huesos, conchas, cascarones de huevos). También se utilizan biominerales para incrementar la densidad celular o como sensores magnéticos y de gravedad (Mann, 1989; Chasteen & Harrison, 1999; Wilt, 1999)<sup>8,9,10</sup>. hasta el momento se han descrito dos procesos de biomineralización: el primero se conoce como mineralización **“inducida biológicamente”**, en donde la formación de los biominerales es inducida por los organismos, como resultado de la interacción entre los metabolitos biológicos y los iones presentes en el medio ambiente. El segundo proceso, se conoce como mineralización mediada por **“matriz orgánica”** y consiste en la formación de la fase mineral sobre un esqueleto estructural orgánico preformado, conocido como matriz orgánica. Esta matriz orgánica se compone principalmente de lípidos, polisacáridos y proteínas (Sarashina & Endo, 1998)<sup>11</sup>. Las matrices orgánicas son producidas como armazones insolubles constituidos por macromoléculas principalmente hidrofóbicas (colágeno, quitina, celulosa), sobre las cuales se encuentran sujetas macromoléculas hidrofílicas. *Éstas últimas pueden presentar una superficie de nucleación activa hacia la solución externa* (Mann, 2001)<sup>3</sup>.

### **3.1.2 Fosfato de calcio en su forma cristalina de hidroxiapatita.**

En la naturaleza se reconoce a las apatitas como el principal grupo de minerales de fosfato de calcio. Todos los minerales de este grupo son de tipo hexagonal o monoclinico. De manera fisiológica, los huesos y los dientes están hechos de fosfato de calcio en su forma mineral de hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (HAP) (**Fig1**), interaccionando con un gran número de proteínas.



**Figura. 1** Cristales de hidroxiapatita crecidos en geles de agarosa.

Por las sustituciones químicas en el cristal las apatitas tienen una gran variedad de especies, por lo que se conocen 6 especies de apatitas en la naturaleza. (Brown P. & Constantz B., 1994)<sup>12</sup>.

### **3.1.3 Biomineralización no patológica.**

Se le llama también mineralización biológicamente controlada, puesto que son procesos altamente regulados que producen biomateriales como; dientes, huesos, conchas, todos estos con funciones biológicas y estructurales específicas. Estos biominerales se distinguen por tener propiedades cristalino-químicas específicas de acuerdo a su especie de origen, Ejemplo:

- Tamaño uniforme de partícula
- Estructura y composición bien definida
- Niveles con alta organización espacial
- Morfologías complejas



- Agregación y textura controlada
- Orientación cristalográfica preferencial
- Alto orden de ensamble bajo jerarquías estructurales

La biomineralización no patológica se lleva a cabo tanto en organismos unicelulares, pero mayormente en organismos multicelulares.

#### **3.1.4 Biomineralización patológica de fosfato de calcio.**

La deposición y cristalización de sales de calcio es un fenómeno natural en los organismos, (huesos, dientes, conchas de moluscos, cascarones de huevos de aves). Sin embargo, en condiciones anormales y patológicas, las sales de calcio pueden causar devastadoras consecuencias, desencadenando varias enfermedades como cálculos renales, cálculos biliares, deposición de cristales en las articulaciones, varias formas de mineralización ectópica, particularmente, este fenómeno se lleva a cabo en órganos y tejidos que por su naturaleza no mineralizan, como la biomineralización vascular, en la falla de catéteres y en válvulas prostéticas (Anderson 1983)<sup>13</sup>. A pesar de todas estas diferencias, existe un gran número de similitudes entre los procesos de cristalización de tipo patológico y de tipo no patológico, por ejemplo ambos tipos de cristalización requieren de sobre saturación en el sistema y presencia de sustratos que favorezcan la nucleación y la influencia de una gran variedad de moduladores (iones positivos y negativos).

Por lo que en este trabajo de tesis doctoral nos enfocaremos a la biomineralización vascular, que tiene gran impacto en la medicina hoy en día a nivel mundial.

### **3.2 Biomineralización vascular.**

La biomineralización vascular (BV) es una consecuencia común del envejecimiento, la diabetes, la hipercolesterolemia, la disfunción mecánica de las válvulas cardíacas, y la insuficiencia renal crónica (Olson et al., 2000)<sup>14</sup>. Aunque la BV parece ser una respuesta uniforme a la lesión vascular, es un trastorno heterogéneo, con solapamientos a mecanismos distintos entre la iniciación y progresión de este proceso patológico.

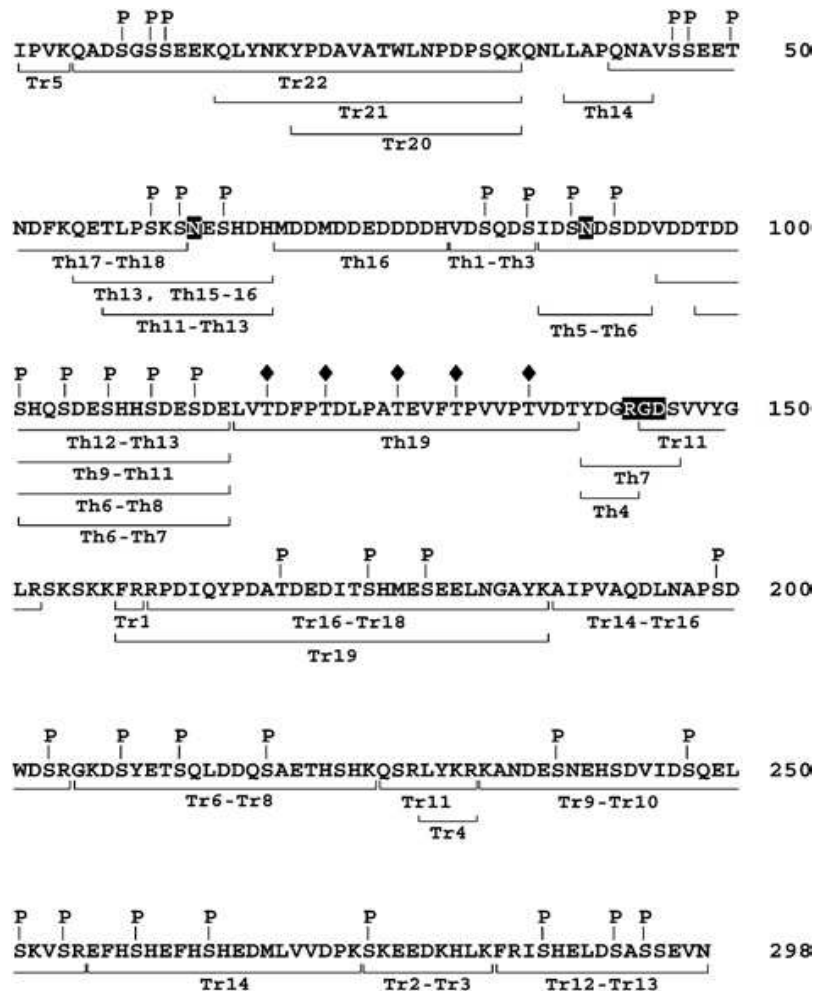
La BV se ha observado en la vasculatura de las arterias durante muchas décadas, pero hasta hace poco, este fenómeno fue visto simplemente como una consecuencia pasiva del envejecimiento. Hoy en día la acumulación de pruebas apunta hacia un proceso estrictamente regulado, con una competencia entre los factores inhibidores y los factores promotores de la mineralización, pero los mecanismos precisos moleculares y celulares que describen la deposición del mineral todavía no están claros. Además, las consecuencias clínicas específicas de la biomineralización vascular siguen siendo controvertidas. En los últimos años, un gran número de estudios en biología celular y los estudios clínicos han aportado importantes conocimientos sobre los mecanismos de la biomineralización vascular. Todos estos hallazgos han demostrado que la BV está regulada por un proceso mediado por células y no por sólo una precipitación pasiva de fosfato de calcio en la matriz extracelular, que es uno de los principales factores que causa el problema. Lo cual sugiere que podría ser posible regular la calcificación vascular y tendría un gran impacto en pacientes con morbilidad y mortalidad cardiovascular elevada. Una serie de estímulos en los pacientes con daño renal como hipercalcemia, hiperfosfatemia y daños vasculares causan la liberación de vesículas y lesiones osteo-condrocíticas, que dan paso a la

conversión de las células de músculo liso vascular (VSMC) a células osteocondroprogenitoras. Los niveles bajos de los factores inhibidores de la biomineralización vascular como la proteína GLA de matriz (MGP) y la Fetuina-A, incrementan el riesgo en el proceso de biomineralización, ya que se forman con mayor facilidad vesículas de matriz y cuerpos apoptóticos que actúan como núcleos para la formación de cristales de HAP. A su vez, existe un desbalance en cuanto los reguladores como es el caso de la proteína morfogenética ósea-2 (BMP2), Cbfa1 A, vitamina D, pirofosfato, osteopontina (OPN), osteoprotegerina (OPG), y la MGP.

El depósito de calcio en las células muertas y los depósitos de las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox), causan procesos de tipo activos endocondral (interviene un modelo cartilaginoso que sirve como precursor óseo) e intramembranoso (no interviene cartílago como precursor) que contribuyen a la osificación vascular, en respuesta a los lípidos oxidados, la inflamación y el daño mecánico, en células de músculo liso provenientes de la microvasculatura arterial. Actualmente se sabe que la BV ha evolucionado en los últimos 15 años, que resulta de un proceso de desregulación de las moléculas inhibidoras y de las precursoras, a pesar de las evidencias la etiología de la BV sigue siendo incierta, por lo que en este estudio nos hemos enfocado al estudio del papel que juega la OPN como una proteína reguladora, inhibiendo el proceso de biomineralización vascular.

### 3.3 Osteopontina

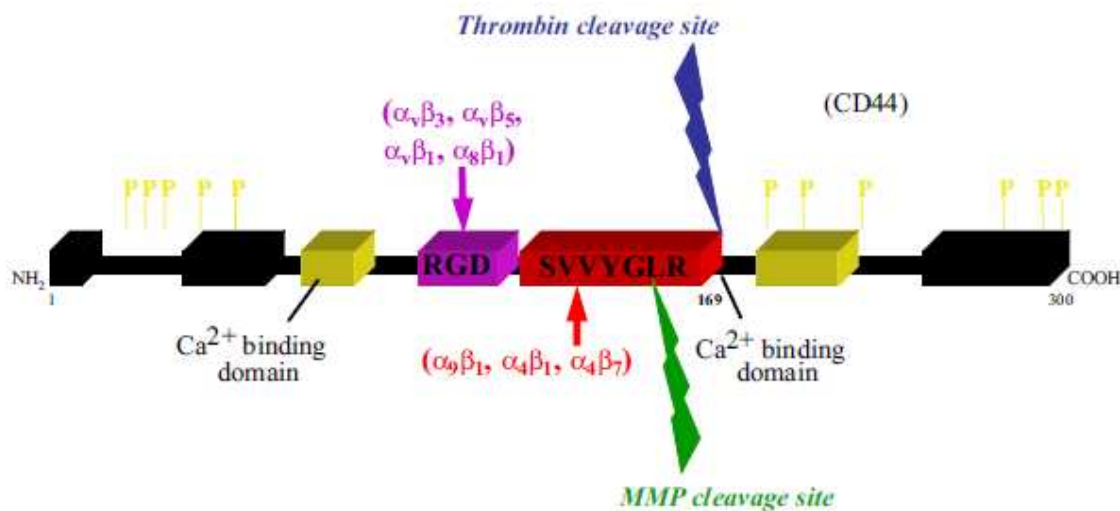
La osteopontina (OPN) es una fosfoproteína glucosilada de aproximadamente 300 aminoácidos rica en ácido aspártico y ácido siálico, es N-glucosilada y/o O-glucosilada, altamente fosforilada en serinas y treoninas (Christensen et al., 2005)<sup>15</sup> (**Fig.2**). La función de esta proteína va a estar regulada por estas modificaciones postraduccionales. En un estudio desarrollado por Christensen et al., (2005), demostraron que la hiperfosforilación (36 sitios fosforilados) de la OPN en leche de humano promueve la cristalización de cristales de HAP de tejido oseó<sup>15</sup>. Sin embargo, en otro estudio se observó que la OPN en orina (uropontina), con 30 sitios de fosforilación es un potente inhibidor de la nucleación y crecimiento de cristales de oxalato de calcio (Christensen et al., 2008), por lo tanto la función de esta proteína esta regulada por estas modificaciones postraduccionales, y dependerá del fluido, del tipo celular, del tejido y la especie de su origen. OPN es una proteína sintetizada de 32kDa, pero de acuerdo a sus modificaciones postraduccionales su peso molecular varia de 45 kDa hasta 75 kDa (Kazanecki et al 2007)<sup>17</sup>.



**Figura 2.** Secuencia de osteopontina de humano y localización de las diferentes modificaciones postraduccionales. P= fosforilación ♦ = Glucosilación (Christensen et al, 2005).

A lo largo de su secuencia la OPN contiene una región: arginina-glicina-aspartato (RGD), este tripeptido se encarga de la adhesión de varias moléculas de matriz hacia la superficie de receptores de integrinas (Hynes, R.O., 1992)<sup>18</sup> (**Fig.3**). La región RGD es un dominio de adhesión de la OPN que media interacciones a través de  $\alpha\beta1$ ,  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$ ,  $\alpha\beta6$ ,  $\alpha8\beta1$ ,  $\alpha5\beta1$  y las integrinas (Liaw et al., 1995; Yokosaki et al., 2005; Denda et al., 1998; Hu et al., 1995)<sup>19-22</sup>. Inmediatamente después de esta región, continúa un dominio SVVYGLR hacia la región C-terminal, esta secuencia queda expuesta con un sitio de reconocimiento a

metaloproteinasas (MMP) y trombina encargada de mediar las interacciones con  $\alpha_9\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$  y  $\alpha_4\beta_7$  integrinas (Yokosaki et al., 1999; Ito et al., 2009; Green et al., 2001)<sup>23-25</sup>.



**Figura 3.** Diferentes dominios estructurales de OPN. En color se muestran los sitios de adhesión celular: en magenta se muestra la región RGD, que es el sitio de unión específico a integrinas y enseguida en rojo se encuentra la región SVVYGLR, que también es de unión a integrinas y de adhesión celular. Los sitios de unión a calcio ( $Ca^{2+}$ ) son dominios que se muestran en color amarillo. Así mismo, se muestran los sitios de fosforilación (P). Las flechas indican los sitios de unión a trombina y MMP, en azul se muestra el sitio de exposición a trombina y en verde a MMP (Lund et al., 2009).

Funcionalmente, la OPN es una proteína reguladora secretada con un papel importante en procesos fisiológicos y patológicos. Esta proteína en condiciones normales es secretada en tejidos mineralizados como los huesos y los dientes, además de la orina y las células del epitelio de diferentes órganos. Sin embargo en condiciones de lesión o enfermedad esta asociada también a la reparación de tejidos, fibrosis y calcificaciones distróficas tras lesiones inmunológicas (Yumoto K, 2002)<sup>26</sup>. No obstante, la OPN participa en el crecimiento tumoral, en el desarrollo de cáncer y metástasis (Wang KX, 2008)<sup>27</sup>.

La OPN también tiene un papel fundamental en el sistema inmune ya que actúa como una molécula quimiotáctica que promueve la migración de células inflamatorias. Por lo tanto, la OPN actúa como una citocina inflamatoria que puede modular la respuesta inmune bajo la sobreexpresión de linfocitos Th1. Debido a estas características la OPN ha sido clasificada como una citocina proinflamatoria.

En un estudio desarrollado por Giachelli y colaboradores (1993), reportaron que la OPN se presenta de forma abundante en los sitios de calcificación de las placas ateroscleróticas además de las calcificaciones en válvulas cardiacas<sup>28</sup>. Otros grupos también determinaron que la expresión del ARNm de OPN en placas ateroscleróticas de humanos está estrechamente asociada con la severidad de la aterosclerosis y el desarrollo de la calcificación vascular (Nakase et al., 1994, Agnholt et al., 2007)<sup>29,30</sup>. Debido a sus características la OPN es vista como una proteína multifuncional que promueve la adhesión y la migración celular (Smith L. L., 1996)<sup>31</sup>. La OPN es una de las proteínas más abundantes expresadas por los macrófagos, y es expresada debido a un potente estímulo quimiotáctico; por el contrario, la OPN no se expresa en los monocitos circulantes; de hecho, la OPN parece regular la infiltración de macrófagos en la respuesta inflamatoria (Crawford 1998, Weber GF 1996)<sup>32,33</sup>. Un hallazgo importante es que la OPN inhibe la formación de los cristales de hidroxipatita *In vitro* (Jiménez-Corona et al., 2008)<sup>34</sup>.

En estudios llevados a cabo en humanos, se observó que la OPN se expresó en las lesiones ateroscleróticas en SMC, en células endoteliales, en células angiogénicas, y en los macrófagos (Giachelli CM 1993)<sup>28</sup>. Estos hallazgos señalan que existe una estrecha correlación entre la proliferación y la migración de SMC y la sobreexpresión de OPN (Liaw 1995)<sup>35</sup>. En base a lo anterior todas estas evidencias indican que, durante la lesión vascular las SMC y las células endoteliales migran, proliferan, y se acumulan en el proceso de

reparación y remodelación de la vasculatura sobre-expresando a la OPN, que a su vez actúa modulando el proceso de BV.

En estudios anteriores se reportó que la OPN es un importante regulador de la calcificación vascular y se asocia con los depósitos de mineralización en los seres humanos (Isoda K 2002, Giachelli CM 2001)<sup>36,37</sup>. En correlación con las evidencias anteriores, en un estudio *In vitro* llevado a cabo por Jiménez-Corona et al., (2008), se demostró que la OPN inhibe la formación de cristales de hidroxapatita en hidrogeles de agarosa y sílice<sup>34</sup>. De acuerdo a todos estos hallazgos se sugiere que la OPN se expresa en la lesión vascular como inhibidor del crecimiento de los cristales de HAP. Actualmente la OPN está siendo estudiada como un agente potencial terapéutico local para limitar o eliminar la mineralización patológica en el sistema cardiovascular (Giachelli CM 2001)<sup>37</sup>.

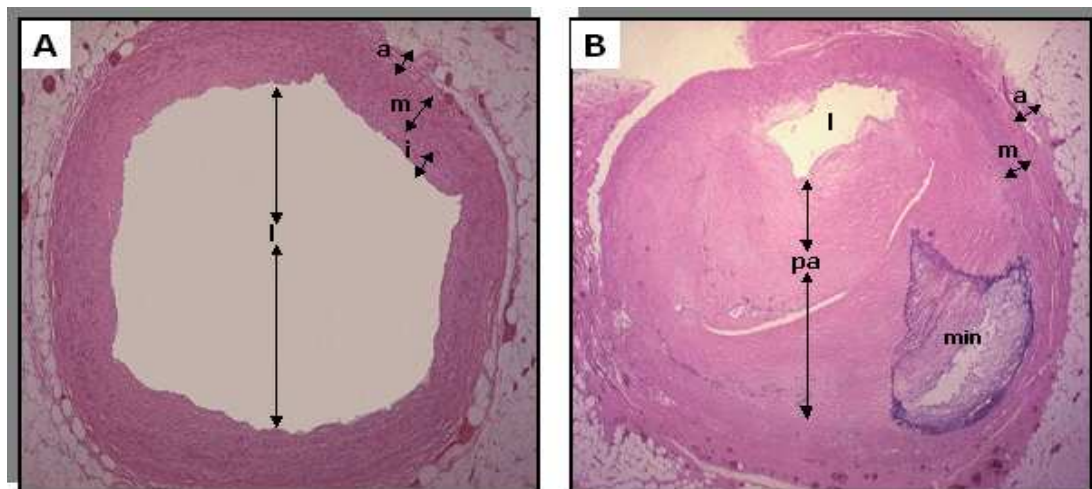


## 3.4 ALGUNOS FACTORES QUE INDUCEN LA BIOMINERALIZACION VASCULAR

### 3.4.1 Aterosclerosis

La biomineralización vascular puede ocurrir en varias condiciones patológicas, una de ellas es la aterosclerosis. Las lesiones ateroscleróticas frecuentemente traen como consecuencia la mineralización vascular que se refiere a la deposición de fosfato de calcio, en su forma cristalina de hidroxiapatita, en el endotelio de la pared vascular (**Fig 4B**) (Rumberger et al., 1995; Trion Astrid., 2004)<sup>38,39</sup>.

La aterosclerosis se caracteriza por la presencia de una placa de ateroma (constituida por detritos celulares, trombos y un depósito nodular de grasa, fundamentalmente de LDLox) en la túnica íntima de la aorta (Lehto et al., 1996)<sup>40</sup>. Además se pueden precipitar sales de calcio en la estría grasa primaria que desencadena una calcificación variable de la lesión (**Fig.4B**). Los principales factores de riesgo que desarrollan este proceso patológico son los niveles altos de lipoproteínas de baja densidad (LDL-colesterol), niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad (HDL-colesterol), niveles altos de triglicéridos, obesidad, hipertensión, tabaquismo, diabetes, insuficiencia renal y factores genéticos (Mc Gill et al., 1996)<sup>41</sup>.



**Figura 4.** Microfotografías de dos cortes transversales de dos arterias coronarias humanas teñidas con una tinción de tricrómico de Masson. A) Corresponde a una arteria coronaria humana en condiciones normales. B) Corresponde a una arteria coronaria humana con una lesión avanzada, que presenta la placa de ateroma y la mineralización. a: adventicia; i: íntima; l: lumen; m: media; min: mineralización; pa: placa aterosclerótica.

La acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) parece ser uno de los primeros episodios asociados al desarrollo de lesiones ateroscleróticas. Las LDL retenidas en la pared sufren procesos de oxidación (LDLox) y generan productos con actividad quimiotáctica para monocitos y SMC. Los monocitos atraviesan el endotelio, y se diferencian a macrófagos captan de forma masiva LDLox y se transforman en células espumosas cuya acumulación en la íntima origina la formación de la estría grasa (Brown & Goldstain 1983)<sup>42</sup>. En la aterogénesis intervienen múltiples factores de crecimiento, citocinas y otras sustancias producidas por las células endoteliales, las SMC, los macrófagos y los linfocitos T, que regulan la respuesta inflamatoria y la proliferación celular (Ros 1993)<sup>43</sup>. El resultado de la interacción de estos factores es una respuesta fibroproliferativa que hace evolucionar la estría grasa a placa aterosclerótica más compleja. La rotura o ulceración de las placas inestables tiene como consecuencia la exposición de

superficies procoagulantes y protrombóticas que provocan la activación de plaquetas y la formación de trombos, que pueden desencadenar complicaciones clínicas, o bien contribuir al crecimiento de la placa de forma asintomático (Badimon et al., 1992)<sup>44</sup>. En la estabilidad de las placas desempeña un papel clave su cubierta fibrosa, formada fundamentalmente por proteínas de matriz extracelular sintetizadas por las SMC como el colágeno y proteoglicanos. Las placas más vulnerables contienen un gran núcleo lipídico envuelto por una cubierta fibrosa delgada. Este núcleo se compone de material lipídico intracelular, que ha sido internalizado por macrófagos, SMC y lípido extracelular, que deriva de la retención de lipoproteínas circulantes y del liberado por las células que sufren necrosis.

Como se mencionó anteriormente, en los procesos ateroscleróticos están implicados varios tipos celulares, inicialmente los monocitos los cuales son atraídos al endotelio, otro tipo son las células de músculo liso vascular (VSMC), que participan en el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas por su migración, proliferación y secreción de componentes de matriz. Debido a este hecho las VSMC son consideradas como las responsables en la formación de la biomineralización vascular (Trion Astrid, et al. 2004)<sup>45</sup>. Para elucidar este mecanismo se han desarrollado estudios *In vitro*, los cuales han demostrado que el tejido vascular contiene células endoteliales que pueden diferenciarse hacia osteoblastos (Severson AR, et al 1995)<sup>46</sup>, por lo cual estas células forman espontáneamente nódulos mineralizados, que expresan importantes proteínas morfogenéticas de hueso y proteínas de matriz (Watson Ke, 1994)<sup>47</sup>.

### **3.4.2 Especies de oxígeno reactivo (ROS)**

En general el desarrollo de la aterosclerosis implica un aumento del estrés oxidativo (Carew 1987, Keaney 1995)<sup>48,49</sup>, por lo que un factor muy importante en el desarrollo de la

aterosclerosis es la actividad de los macrófagos en la lesión aterosclerótica, que conlleva la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el anión superóxido  $\text{O}_2^- \cdot$  (Badwey 1980)<sup>50</sup>. Otro factor son las células endoteliales que están directamente asociadas en la señalización de ROS en la pared arterial en respuesta a los diversos agentes y condiciones, tales como la bradicinina, la hipoxia, y la hipercolesterolemia (Shimizu 1994, Yang 1995, Ohara 1993)<sup>51-53</sup>. Del mismo modo, el mínimo aumento en la generación de ROS intracelular en las células de músculo liso vascular, activa la producción de la NADPH oxidasa, en respuesta a  $\text{TNF-}\alpha$  y la angiotensina II (Griendling 1998, Sundaresan 1995, Meyer 1994)<sup>54-56</sup>. Dado estos hallazgos presentados en las lesiones ateroscleróticas, han desencadenado importantes consecuencias y trastornos clínicos como la BV.

La definición precisa de estrés oxidativo y la subyacente participación de reacciones oxidoreducción implica que cualquier forma de “inclinarse la balanza” provoca un “desequilibrio” en la homeostasis celular. Esto ha llevado a generar en paralelo otro concepto llamado “estrés reductor”, que describe una situación donde el equilibrio se modifica en favor de agentes reductores (Wendel 1987)<sup>57</sup>. El estrés reductor está estrechamente relacionado con el estrés oxidativo. Por ejemplo, una sobreproducción de especies reductoras, tales como NAD(P)H, puede dar lugar a ciclos redox debido al aumento de las sustancias que pueden someter a ciclos repetitivos de oxidación/reducción, en última instancia estos hallazgos conducen al aumento en la generación del anión radical superóxido ( $\text{O}_2^- \cdot$ ) y oxidantes secundarios.

### 3.4.3 LDLox y ROS

Es bien conocido, que la forma oxidada de las LDL (LDL<sub>ox</sub>) es la principal característica necesaria para el desarrollo de la aterosclerosis, por lo que esta el tipo de LDL<sub>ox</sub> son las que se han localizado en las lesiones ateroscleróticas.

Por otro lado, se sabe que el principal tipo celular que da lugar a células espumosas por la internalización de LDL modificadas químicamente son los macrófagos, los cuales fueron identificados en la aterosclerosis temprana. En otro estudio, se observó que estas no fueron internalizadas por el receptor de las LDL de los macrófagos, debido a una baja regulación del receptor de las LDL (Goldstein 1977)<sup>58</sup>. Así, la formación de células espumosas no parece estar mediada por el receptor de LDL, por lo que, en la búsqueda de receptores alternativos Goldstein et al., (1979) observaron, que la acetilación de las LDL lleva a la mayor absorción de colesterol de los macrófagos y por consiguiente la formación de células espumosas. Este fenómeno está mediado por un receptor específico, más tarde llamado el "receptor acetil-LDL"<sup>59</sup>. Actualmente se sabe que este receptor es uno de los llamados "receptores basureros" presentes en los macrófagos y otros tipos de células (Krieger 1993)<sup>60</sup>. Mas tarde Henriksen *et al.*, (1981) encontraron que las células endoteliales incubadas con LDL, servían como ligando para el desarrollo de macrófagos hacia células espumosas<sup>61</sup>. Desde entonces se ha establecido que, varios receptores en los macrófagos y en otras células funcionan como "receptores basureros" (Krieger 1997)<sup>62</sup>. En otros estudios realizados demostraron que el receptor original de acetil-LDL fue identificado en dos formas conocidas como receptores basureros de tipo A1 y A2 (Kodama, 1990)<sup>63</sup>. Otro tipo de receptores tales como CD68, CD36, SR-B1, y LOX-1 se conoce que también poseen propiedades similares a los receptores basureros clásicos y que actúan en diferentes tipos celulares para internalizar a las LDL<sub>ox</sub> (Shanahan 1999)<sup>64</sup>.

## **IV. HIPÓTESIS**

Algunas macromoléculas biológicas como la osteopontina, se encuentran interactuando con los cristales de HAP encontrados en forma de precipitados cardiovasculares, por lo tanto esta proteína está implicada en los procesos de regulación en la biomineralización vascular, actuando como inhibidor o nucleador de estos cristales.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 General

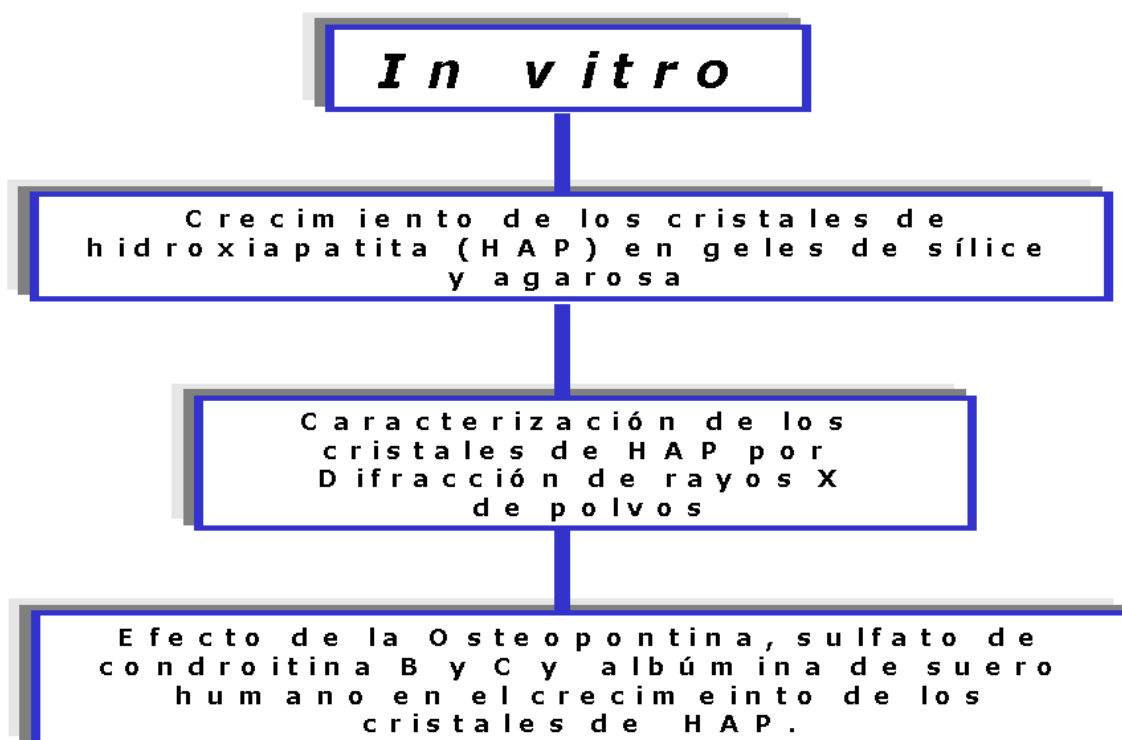
Estudiar el efecto de inhibición o nucleación, que ejerce la osteopontina sobre la hidroxiapatita, en el mecanismo de biomineralización vascular.

### 5.2 Particulares

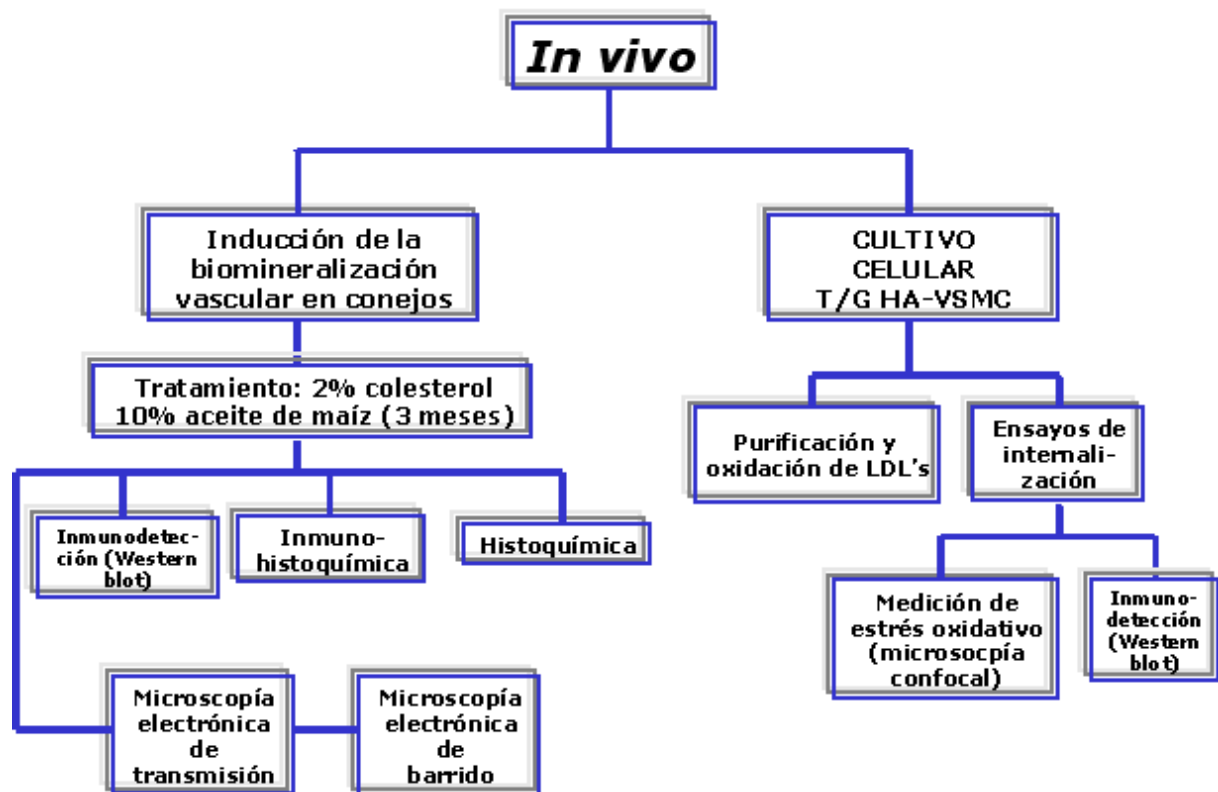
- Establecer un método *in vitro* de síntesis de HAP, simulando algunas condiciones fisiológicas.
- Establecer un sistema de interacción entre los cristales de HAP, formados en geles de agarosa y sílice, entre algunas macromoléculas como; osteopontina, sulfato de condroitina “B”, sulfato de condroitina “C” y albúmina de suero humano, para observar el efecto que ejercen éstas en la formación de los cristales.
- Desarrollar un modelo de estudio *in vivo* del mecanismo de biomineralización vascular en conejos Nueva Zelanda.
- Correlacionar los datos obtenidos en el modelo *in vitro* y los obtenidos en el modelo *in vivo*, para establecer si la interacción de la OPN con la HAP en la BV, es de inhibición o nucleación en la formación de los cristales de HAP.

## VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental que se desarrolló para alcanzar los objetivos trazados en esta tesis doctoral quedaron divididos en dos partes; una parte *In vitro* y otra parte *In vivo*. A continuación se describen todos los procedimientos y técnicas que se emplearon para alcanzar dichos objetivos.







## VII. Materiales y Métodos (Parte *In vitro*)

### 7.1 Síntesis *In vitro* de los cristales de hidroxiapatita en geles de agarosa.

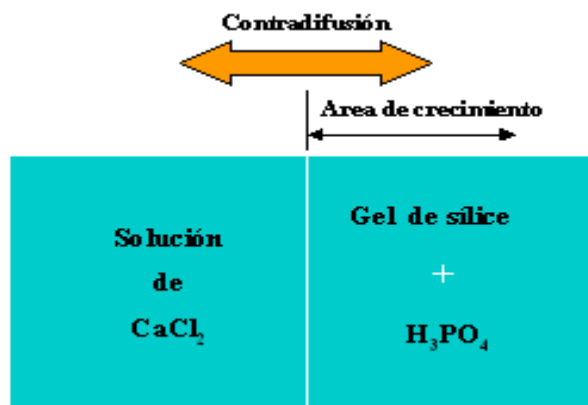
La síntesis de los cristales se realizó de acuerdo con los métodos reportados por y Hunter & Goldberg (1993)<sup>65</sup> y Eiden & Assmann (2002)<sup>66</sup>, con las siguientes modificaciones: se construyeron cassettes de vidrio de 10 x 7 cm<sup>3</sup>, separados con caucho de 4 mm de espesor, semejando una cámara de electroforesis. Estos cassettes se sellaron perfectamente con silicón y grasa de vacío para evitar la evaporación de los reactantes y se llenaron de gel de agarosa al 0.1% (w/v). Inicialmente se adicionaron 2mL de cloruro de calcio 0.4 M en buffer de Tris-HCl pH 7.4 y 2 mL de agarosa. Después de que se formó la primera capa de gel se adicionaron 2 mL de fosfato dibásico de sodio 0.4 M en buffer de Tris-HCl pH 7.4 y 2 mL de agarosa 0.1%, formándose así una segunda capa de gel (**Fig.5**). Estos sistemas se mantuvieron a una temperatura controlada de 18°C, este experimento se hizo por triplicado. Los cristales se formaron después de 5 días.



**Figura 5.** Esquema que representa el cassette de vidrio construido para la formación de los cristales de HAP en geles de agarosa.

## 7.2 Síntesis *In vitro* de los cristales de hidroxiapatita en geles de sílice.

Se construyeron cassettes de vidrio como se mencionó anteriormente. El crecimiento de los cristales se realizó de acuerdo con el método reportado por Villacampa y García-Ruiz (2000)<sup>67</sup>, con las siguientes modificaciones: El gel fue preparado con una solución de silicato de sodio (Aldrich, 27% SiO<sub>2</sub>, 14% NaOH, densidad de 1.06g/cm<sup>3</sup>) esta solución fue acidificada con una solución de ácido fosfórico 1 M. El pH final del gel fue de 10.42. La polimerización del gel se llevo a cabo en aproximadamente 1.12 min. Posteriormente, sobre la capa de gel se puso una solución de CaCl<sub>2</sub> (Sigma 98%) 1 M hasta llenar el cassette, después se selló con silicón y grasa de vació para evitar evaporación de los reactantes, siguiendo este procedimiento se permitió la difusión del cloruro de calcio y el ácido fosfórico sobre la matriz del gel de sílice (**Fig.6**). Los cassettes se dejaron a una temperatura controlada de 18°C. Estos experimentos se repitieron por triplicado. Los cristales se formaron después de 7 días.



**Figura 6.** Esquema que representa el cassette de vidrio construido para la formación de los cristales de HAP en geles de sílice.

### **7.3 Efecto de las macromoléculas biológicas en el proceso del crecimiento de los cristales de hidroxiapatita.**

La interacción de las macromoléculas biológicas se acopló a los dos sistemas de hidrogeles antes mencionados. En el caso del sistema de hidrogeles de agarosa, se adicionó una concentración 10  $\mu\text{M}$  de proteína, mezclando con la solución de cloruro de calcio 0.4 M y agarosa, y sobre esta capa se puso la segunda capa de gel con la solución de fosfato dibásico de sodio. En el caso de los hidrogeles de sílice, se formó el gel que contiene los iones fosfato y sobre de él se adicionó una concentración 10  $\mu\text{M}$  de proteína mezclada con la solución de  $\text{CaCl}_2$  1 M. Las macromoléculas que se adicionaron en ambos sistemas fueron: Osteopontina PM: 31 kDa (Sigma-O2260), Sulfato de condroitina “B” PM: 40 kDa (Sigma-C3788), Sulfato de condroitina “C” PM: 40 kDa (Sigma-C4384), Albúmina de suero humano PM: 66.3 kDa (Sigma-A9511). Los experimentos se hicieron por triplicado y mantuvieron a una temperatura controlada de 18°C.

### **7.4 Caracterización por difracción de rayos X de los cristales de hidroxiapatita.**

Después de obtener los cristales de HAP, se dejó a los sistemas alcanzar el equilibrio en un tiempo aproximado de un mes. Transcurrido este tiempo los cristales fueron colectados mecánicamente, y perfectamente lavados con etanol. Posteriormente fueron analizados por difracción de rayos X de polvos. Para este análisis se utilizó un difractómetro de rayos X (D8 Advance 2 Theta) con un monocromador de grafito y con un tiempo de medición de 0.5 segundos.

## VIII. Materiales y Métodos (Parte *In vivo*)

### 8.1.1 Desarrollo de la placa aterosclerótica en conejos

Para este estudio se utilizaron 2 conejos machos adultos de la cepa Nueva Zelanda, de 6 meses de edad, con un peso aproximado de 2 kg. Los animales se alojaron en conejeras individuales de acero inoxidable con una superficie de piso de 0.46 m y una altura de 0.40 m; con una temperatura controlada de 18 a 22° C, con 10 a 20 cambios de aire por hora, humedad relativa de 40 a 50%, control de iluminación 12 h de luz y 12 h de oscuridad. El alimento que recibieron los animales fue un concentrado comercial (Harlan 2031), compuesto por 14.4% de proteína total, 2.7% de lípidos, 21.10% de celulosa, 43.20% de carbohidratos, 8.40% de ceniza, 1.14% de calcio y 0.58% de fósforo. El alimento de tipo hipercolesterolémico se elaboró mezclando 2% de colesterol (Sigma C-8503) y 10% de aceite de maíz (p/p), esta dieta fue administrada durante 3 meses, proporcionándoles agua y alimento *ad libitum*. La eutanasia se practicó con una inyección intravenosa de pentobarbital sódico 70 mg/kg de peso.

### 8.2 Colección y procesamiento de las muestras

Las aortas se extrajeron mediante una incisión longitudinal desde la cavidad torácica hasta la abdominal, removiéndose así el tejido conectivo y el adiposo. Inmediatamente después, a las aortas se les hizo un corte longitudinal y un raspado del endotelio de la túnica íntima. El extracto celular fue resuspendido y homogeneizado en buffer de lisis compuesto de; 50 mM de Tris-HCl, 0.15 M de NaCl, 1% de Triton X-100, 0.25% de Deoxicolato de sodio, 1µg/mL de leupeptina, 10µg/mL de aprotinina, 1mM de PMSF, 0.5mM de ortovanadato de sodio, 1 mM de benzamidina, 1mM de EDTA. Se tomo una alícuota de cada

homogeneizado celular para la cuantificación de proteína usando ácido bicinónico (PIERCE-23225).

### **8.3 Inmunodetección de OPN de las aortas de conejos (Western blot)**

Las proteínas extraídas del lisado celular de los conejos, fueron analizadas por SDS-PAGE al 12% en condiciones reductoras y desnaturalizantes. La transferencia se realizó en una cámara semiseca (Trans-blot SD semy dry transfer cell BIO-RAD) a una membrana de PVDF a 20 Volts durante 90 min, y se bloqueo con TBST (0.1 M de Tris pH 7.5; 0.15 M de NaCl; 0.1% Tween 20) y 5% de albúmina de suero bovino a temperatura ambiente durante 1 h, después se hicieron cuatro lavados de 15 min con TBST. Posteriormente, la membrana fue incubada con el primer anticuerpo anti-OPN de ratón desarrollado en cabra (SIGMA O7635) en una relación 1/500 a 4°C durante toda la noche. A la membrana se le hicieron cuatro lavados de 15 min con TBST y se incubó con el segundo anticuerpo Ig-G desarrollado en cabra HRP (1/10000), a temperatura ambiente durante 1 h, posteriormente se lavó durante 2 h cada 15 min con TBST. La membrana fue revelada con un kit de quimioluminiscencia (Super Signal No cat: 34080, PIERCE) de acuerdo a las instrucciones especificadas. Como control positivo se usó OPN recombinante de ratón (Sigma-O2260).

### **8.4 Histoquímica para la demostración de calcio**

Los fragmentos de la aorta torácica y de la aorta abdominal de los conejos fueron fijados en formaldehído al 10% amortiguado durante 24 h. Posteriormente fueron lavados con agua destilada y procesados para inclusión y corte en parafina. Los cortes, de 6 µm de grosor

fueron teñidos con hematoxilina y eosina, y con las técnicas de Von Kossa y rojo de alizarina S, que son tinciones histoquímicas no enzimáticas para demostrar calcio.

### **8.5 Localización de OPN mediante inmunohistoquímica**

Los fragmentos de 5 mm de longitud, tanto de la aorta del conejo control como del conejo tratado, fueron incluidos en un polímero (OCT) e inmediatamente se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Las aortas fueron orientadas para hacer cortes transversales, los cuales fueron montados o adheridos a portaobjetos cargados positivamente. La inmunolocalización de OPN se realizó con el sistema de estreptavidina-biotina-peroxidasa, utilizando como anticuerpo primario un anti-OPN (IgG de ratón) y un anticuerpo secundario biotinilado (anti-IgG de ratón hecho en cabra). Al final, se reveló con peróxido-diaminobencidina (DAB) y la contratinción se hizo con hematoxilina de Mayer. Los controles de la técnica fueron cortes de ambas aortas en los cuales se omitió el anti-OPN.

### **8.6 Análisis por microscopía electrónica de barrido y transmisión**

Después de sacrificar a los animales con sobre dosis de anestesia, se realizó la necropsia para obtener dos fragmentos de 5 mm de longitud de cada una de las aortas. Los especímenes fueron fijados por inmersión en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M (pH 7.4) durante 24 h a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se lavaron en el mismo amortiguador 3 veces durante 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y fueron post-fijados en tetróxido de osmio al 1% diluido en amortiguador de cacodilato de sodio 0.2M (pH 7.4) durante 45 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Después de deshidratar los dos fragmentos de las aortas en etanoles mediante un proceso de degradación creciente hasta óxido de propileno, posteriormente estos fragmentos fueron sometidos a desecado por punto crítico y cubiertos con oro ionizado para

su observación con el microscopio electrónico de barrido JEOL JSM5410LV. Los otros fragmentos se infiltraron y polimerizaron en la resina epóxica de Araldita para obtener cortes ultrafinos con cuchilla de diamante, los cuales fueron contrastados con citrato de plomo y acetato de uranilo. Por último, el análisis del tejido tanto del conejo control como el tejido del conejo con tratamiento se llevó a cabo en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM-10.

### **8.7 Línea celular T/G HA-VSMC**

Esta línea de músculo liso se obtuvo por medio de ATCC (CRL-1733). Esta cepa procede de la vena aorta de un paciente femenino sano, con un cariotipo 46, XX, presentando una tasa muy baja de poliploidias; edad de 11 meses. Designada como **T/G HA-VSMC**.

Las células se sembraron en cajas de cultivo de 10 cm de diámetro inmediatamente después de haberlas resuspendido. Posteriormente se dejó que las células se fijaran a su sustrato por 24h y se efectuaron de 2 a 3 recambios de medio de cultivo por semana.

### **8.8 Medio de Cultivo**

La base para la preparación del medio de cultivo de esta línea celular fue el medio F-12K complementado con 0.05mg/mL de ácido ascórbico, 0.01mg/mL de insulina, 0.01mg/mL de transferrina, 10 ng/mL de selenita de sodio, 0.03 mg/mL de suplemento de crecimiento celular endotelial (ECGS), 10 mM HEPES, 10 mM TES, 10% suero fetal bovino,

100 U/mL penicilina, 100 U/mL estreptomicina y como antifúngico 0.01% de anfotericina B.

Los cultivos celulares fueron mantenidos en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C.



## **8.9 Purificación, oxidación y marcaje de las LDLs**

### **8.9.1 Purificación**

Las lipoproteínas se aislaron de donadores sanos de plasma humano, después de un periodo de ayuno de 12h o toda la noche. Aproximadamente de 500 mL de plasma se obtuvieron 150 mg de LDLs. Posteriormente para su preservación se agregó 0.01% de benzamidina, 0.01% de inhibidor de tripsina, 1.5mM de DTNB, 1.0mM PMSF y 160 mg de sulfato de gentamicina.

Se ajustó la densidad a 1.019g/mL con KBr multiplicando el volumen del plasma por el factor 0.01906 y se centrifugo 49,000 rpm durante 20h a 4°C en un rotor 60Ti. Se descarta la fracción superior y se recupera la fracción inferior. Se mide el volumen para ajustar la  $\delta$  a 1.053 con KBr multiplicando el volumen del plasma por el factor 0.0436. Posteriormente, se centrifugó por 24h, 4°C, 49,000 rpm, en un rotor 60Ti y se recuperaron las LDLs de la fracción superior. La  $\delta$  se ajustó a 1.63 con KBr multiplicando el volumen del plasma por el factor 0.034 y se centrifugó a 49,000 rpm durante 18h a 4°C, en un rotor 60Ti. Se recuperó nuevamente la fracción superior con las LDLs y se dializó en 12 L de amortiguador (150mM de NaCl y 0.24mM de EDTA pH 7.4) por 72 h con tres recambios. Finalmente, la muestra se centrifugó a 10,000 rpm, 30 min a 4°C y se filtró a través de una membrana de 0.45 $\mu$ m. Por ultimo, la muestra se cuantifico y almaceno con aeración de N<sub>2</sub> en alícuotas a 4°C para evitar oxidación.

### **8.9.2 Oxidación de las LDLs**

Se partió de una fracción de lipoproteínas de baja densidad LDL (densidad 1.019 a 1.063) separadas por ultra-centrifugación secuencial como se describió anteriormente. Primero, se elimino el EDTA mediante diálisis extensiva a 4°C contra un amortiguador PBS libre de EDTA. Se cuantificó la fracción proteica de las LDL por BSA.

La oxidación se llevó a cabo incubando las LDLn (1ml de LDL's a 100mg/L) en una solución 1-10mM de CuSO<sub>4</sub> en PBS libre de EDTA de 1-5h a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo, el Cu<sup>2+</sup> debe ser removido por medio de diálisis extensivas a 4°C contra un amortiguador 150 mM de NaCl, 0.01% de EDTA, pH 8.0 y se cuantificó proteína.

El grado de oxidación debe ser medida por reacción con ácido tiobarbitúrico (TBARS) y/o por la movilidad electroforética en geles de agarosa en amortiguador barbitural a pH 8.6

### **8.9.3 Marcaje Fluorescente**

El marcaje fluorescente de las LDLs se realizó de la siguiente manera: se preparo una solución de 2µg/mL de LDLs en 0.24 mM EDTA pH 7.4 150mM NaCl. Todo esto se diluyó en 2mL de suero deficiente de lipoproteínas por mg de lipoproteína, se filtró por un tamaño de poro de 0.45µm y posteriormente se diluyó en 50µL de 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetrametil-indocarbocianida (DiI) en DMSO (3 µg/mL) por cada mg de lipoproteína. Después se incubó durante 15h a 37°C, transcurrido ese tiempo se ajustó la densidad a 1.63g/mL con KBr (20h, 4°C, 49,000 rpm). Se recupero la fase media y la interfase se resuspendió en 400µL de PBS. Se dializó contra 4L de amortiguador 150 mM NaCl y 0.24mM EDTA pH 7.4 por 24 h, posteriormente se filtró a través de una membrana de 0.45µm y se cuantificó proteína.

### **8.10 Ensayos de internalización de las LDLs**

Con la finalidad de preparar a las células para los experimentos de internalización, se incubaron en condiciones de ayuno para que las células expusieran en su superficie la mayor cantidad de receptores. Esto permitió que toda la maquinaria endocítica celular se activara cuando fueron estimuladas con las lipoproteínas. El procedimiento completo se describe a continuación.

En cada caja se aspiró el medio de cultivo con ayuda de una bomba de vacío. Posteriormente se lavó 2 veces con PBS y se agregó el volumen correspondiente de medio sin suero. Cada cultivo celular se mantiene a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub> durante 1h.

Se aspiró el medio de ayuno y se añadió medio fresco sin suero y sin factor mitogénico con 10 mg/mL de proteína de LDLox. Los diferentes cultivos se mantuvieron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 2hrs.

### **8.11 Lisis Celular**

Después de haber llevado a cabo los experimentos de internalización, se hicieron 5 lavados con PBS/2mg de albúmina. Posteriormente, se hicieron 3 lavados más solo con PBS. Las células se despegaron de su sustrato incubando 5 min a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en PBS 5 mM EDTA. Se recuperó la pastilla celular por centrifugación, 2500 rpm y se resuspendió en un amortiguador de lisis (1% de Triton X-100, 150mM de NaCl, 10mM de Tris pH 7.4, 1mM de EDTA pH 8.0, 1mM de EGTA pH 8.0, 2mM de Ortovanadato de Sodio, 0.5% de NP40 (Igepal), 1 mM de Benzamidina, 37.5ug/mL de Leupeptina, 2μg/mL de Aprotinina y 1mM de PMSF).

Las proteínas celulares se recuperaron por centrifugación (2500-3000 rpm durante 5 min) y fueron resuspendidas en SDS al 0.1%. Se cuantificó proteína por el método de ácido bicinconínico.

### **8.12 Inmunodetección de Osteopontina y β-Actina por Western blot.**

Se realizó una separación de 30μg de proteína total por SDS-PAGE. Para esto, se emplean geles de acrilamida a una concentración del 12%. Posteriormente se llevó a cabo una

electrotransferencia en cámara semihúmeda (Trans-blot SD semy dry transfer cell BIO-RAD) a dos membranas de PVDF, aplicando una corriente de 20 Volts durante 90 min.

### **8.12.1 Osteopontina**

Para evitar inespecificidad, la membrana se bloqueó incubando en una solución TBST (0.1 M de Tris. pH 7.5; 0.15 M de NaCl; 0.1% de Tween 20) y 5% albúmina de suero bovino a temperatura ambiente durante 1 h. Posteriormente, se realizaron 4 lavados de 15min con TBS. Una vez lavada la membrana, se incubó con el anticuerpo primario (IgG de cabra contra OPN de ratón SIGMA O7635) en una relación 1/500 a 4°C durante toda la noche.

Transcurrido ese tiempo, se hicieron tres lavados a la membrana con TBST. Inmediatamente después se incubó la membrana con el anticuerpo secundario contra IgG de ratón, acoplado a la peroxidasa de rábano (1:5000), a una temperatura ambiente por 1h e inmediatamente después se lavó la membrana 8 veces con TBST durante 15min. La reacción de hidólisis de la HRP se realizó con un el kit de quimioluminiscencia Super Signal (No cat: 34080, PIERCE).

### **8.12.2 $\beta$ -actina**

La inespecificidad se bloqueó incubando la membrana de PVDF con las proteínas transferidas, en una solución TBST (Tris 0.1 M. pH 7.5; 0.15 M NaCl; 0.1% Tween 20) y 3% albúmina de suero bovino a temperatura ambiente durante 1 h. Posteriormente, se realizaron 4 lavados de 15 min con TBST. Una vez lavada la membrana, se incubó con el anticuerpo primario (IgG de ratón contra  $\beta$ -actina) en una relación 1:500 a 37°C 1h.

Después de haber incubado la membrana con el anticuerpo primario, se lavó tres veces con TBST. El anticuerpo secundario contra IgG de ratón, acoplado a la peroxidasa de rábano se incubó a 37°C en una dilución de 1:5000 durante 1h e inmediatamente después se lavó la

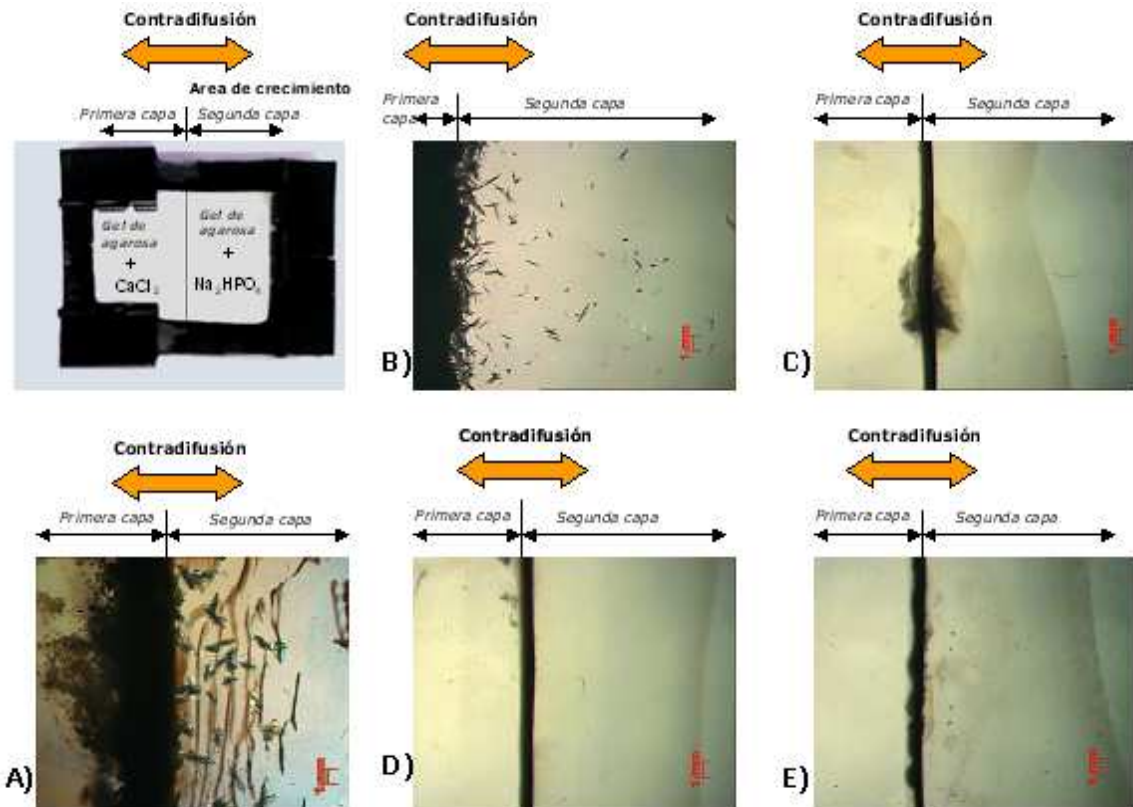
membrana 4 veces con TBST durante 15min. La reacción de hidólisis de la HRP se realizó usando kit de quimioluminiscencia Super Signal (No cat: 34080, PIERCE).

## **IX. RESULTADOS (Parte *In vitro*)**

### **9.1 Síntesis *In vitro* de los cristales de hidroxiapatita y su interacción con las diferentes macromoléculas en geles de agarosa.**

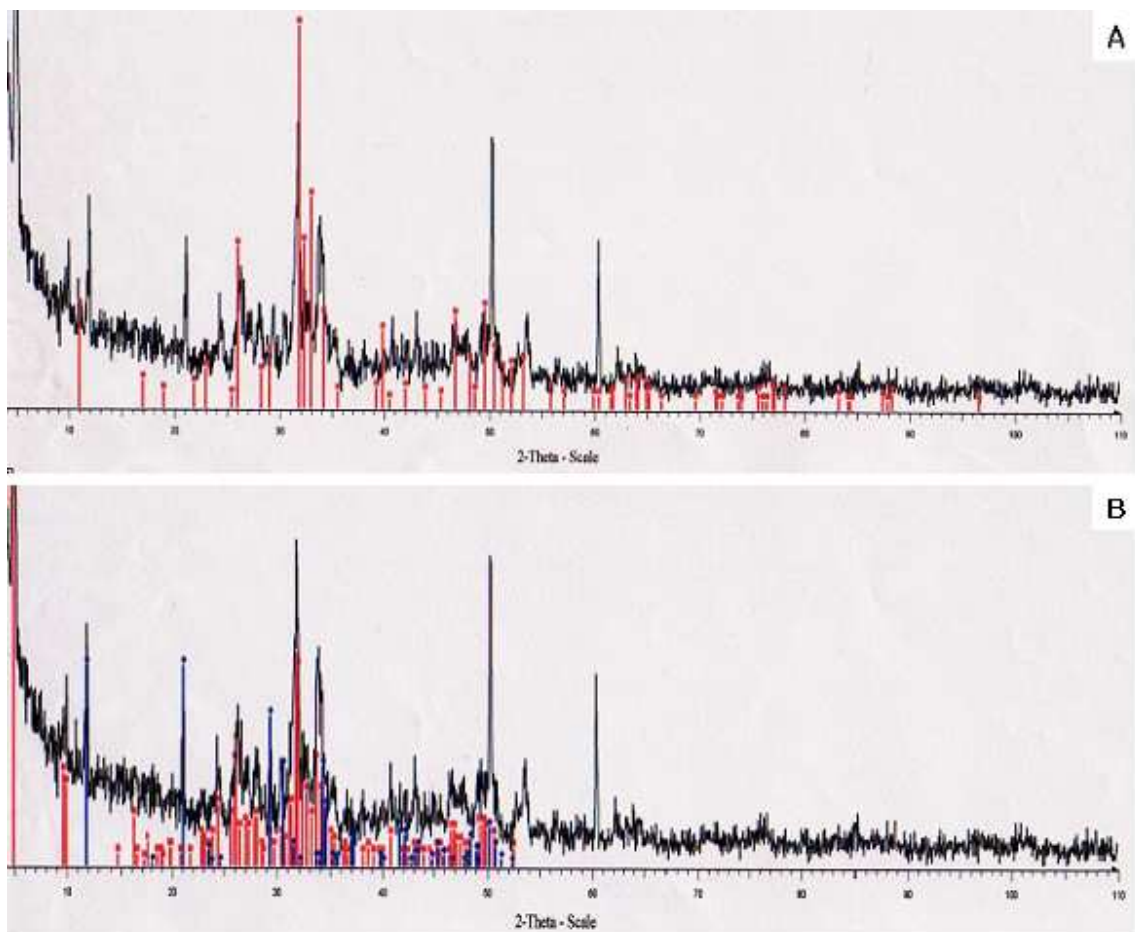
La formación de los cristales de HAP se llevó a cabo en la segunda capa del gel **Fig. 7 (A)**, por contradifusión de los iones calcio y fosfato, este experimento se usó como control positivo. Tal fenómeno tuvo lugar después de que los reactantes contradifunden y llegan al punto de meta-estabilidad. Los cristales obtenidos tenían forma de dendritas los cuales se forman inicialmente en la interfase entre las dos capas de geles.

En la **Fig. 7 (B)** se observó que al adicionar la HSA en el sistema no se observa ningún efecto en la formación de los cristales de HAP, sin embargo al adicionar la OPN, CSB y CSC al sistema, interesantemente no se formaron los cristales, lo cual significa que estas macromoléculas inhibieron el crecimiento de los cristales (**Fig. 7**) (C, D, E).



**Figura. 7** Síntesis de cristales de HAP en hidrogeles de agarosa, (primera capa 0.4 M de  $\text{CaCl}_2$ , segunda capa 0.4 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a pH 7.4 y su interacción con las diferentes macromoléculas biológicas. A) Cristales de hidroxapatita, sin adición de las macromoléculas biológicas (control positivo). B) Hidrogeles de agarosa, adicionados con albúmina de suero humano 10  $\mu\text{M}$ , obsérvese la formación de cristales de HAP. C) Hidrogeles de agarosa, adicionados con osteopontina 10  $\mu\text{M}$ . D) Hidrogeles de agarosa, adicionados con sulfato de condroitina “B” 10  $\mu\text{M}$ . E) Hidrogeles de agarosa, adicionados con sulfato de condroitina “C” 10  $\mu\text{M}$ . En C, D, y E se observa la inhibición del crecimiento de los cristales de HAP.

Los cristales que se formaron en los controles positivos en ambos sistemas de hidrogeles fueron caracterizados por difracción de rayos X de polvos. En la **Fig. 8** se presentan los difractogramas de dicho análisis. En (A) se observan los picos característicos correspondientes a la HAP y en (B) se observan los picos característicos a los precursores de la HAP (octacalcio de fosfato y brushita).

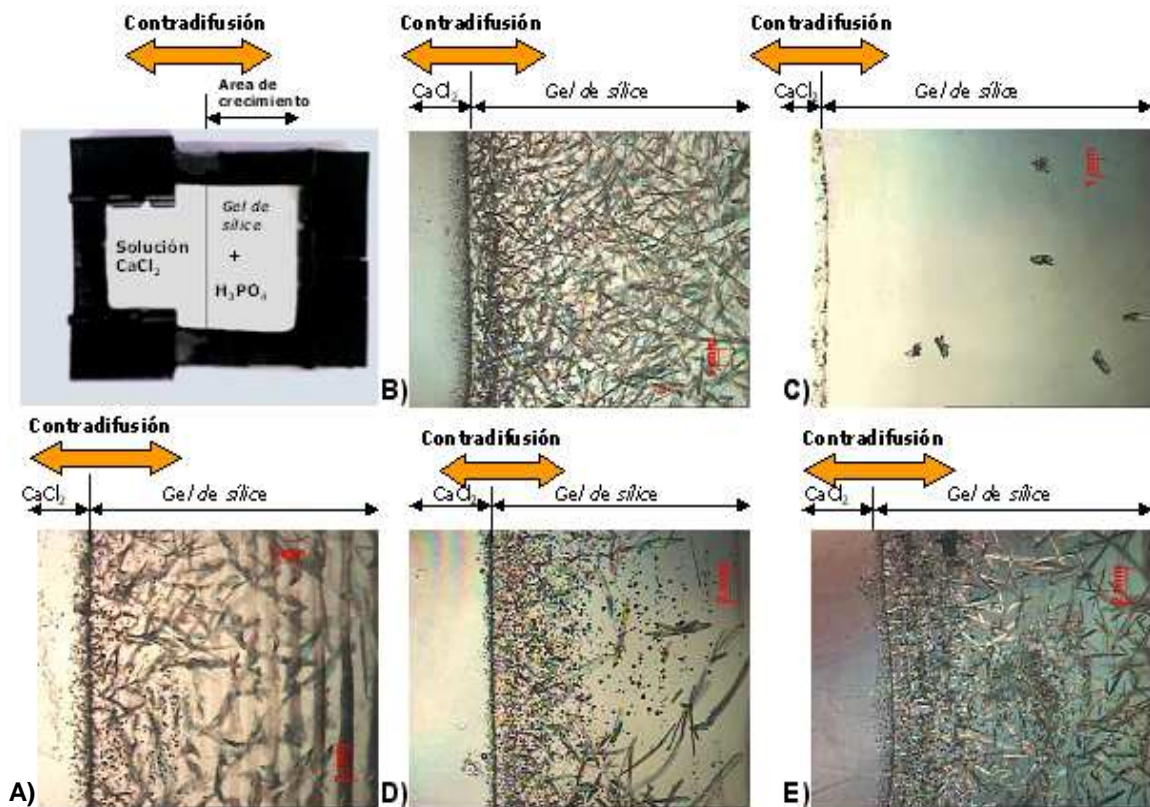


**Figura. 8** Difractogramas de rayos X de los cristales de HAP crecidos en geles de agarosa y sílice, sin las macromoléculas biológicas. A) Difractograma que muestra en rojo los picos característicos de la HAP. B) Difractograma que muestra en rojo los picos característicos del fosfato de octacalcio y en azul los picos característicos de la brushita. Ambos precursores de la HAP.



## **9.2 Síntesis *In vitro* de los cristales de hidroxiapatita y su interacción con las diferentes macromoléculas en geles de sílice.**

En este sistema la formación de los cristales también se llevó a cabo en la segunda fase del sistema, los cuales se formaron con un mayor tamaño en comparación a los crecidos en los hidrogeles de agarosa **Fig. 9 (A)**. Cuando se adicionó la HSA al sistema, no hubo inhibición en la formación de los cristales, se observó la presencia de un mayor número de cristales en comparación con el control positivo, lo cual sugiere que la HSA podría estar actuando como un precursor en la formación de los cristales de HAP **Fig. 9 (B)**. En el caso particular de OPN, la inhibición en la formación de los cristales fue parcial, sin embargo, se observó una disminución considerable en el tamaño y en la cantidad de los cristales **Fig. 9 (C)**. Con el CSB, el efecto de inhibición en la formación de los cristales fue menor comparado con el efecto de inhibición que presentó la OPN **Fig. 9 (D)**, en el caso del CSC, no se observó el efecto de inhibición.



**Figura. 9** Síntesis de cristales de HAP, en hidrogeles de sílice (primera fase  $\text{CaCl}_2$  1M, segunda fase gel de sílice que contiene los iones fosfato). A) Cristales de hidroxiapatita, sin adición de las macromoléculas biológicas (control positivo). B) Hidrogeles de sílice, adicionados con albúmina de suero humano  $10 \mu\text{M}$ , obsérvese que no existe inhibición de los cristales. C) Hidrogeles de sílice, adicionados con osteopontina  $10 \mu\text{M}$ , obsérvese la notable disminución en la formación de cristales, comparado con el control positivo. D) Hidrogeles de sílice, adicionados con sulfato de condroitina “B”  $10 \mu\text{M}$ . E) Hidrogeles de sílice, adicionados con sulfato de condroitina “C”  $10 \mu\text{M}$ .

## X. Discusión (parte *In vitro*)

Por el método de crecimiento de cristales en hidrogeles de agarosa se pudieron sintetizar cristales de buena calidad, sin embargo en hidrogeles de sílice se aumento la calidad y pureza de estos cristales, puesto que se ha demostrado que la composición del vidrio de tipo  $\text{Na}_2\text{O-CaO-SiO}_2$ , favorece la formación de la hidroxiapatita, promoviendo el intercambio de protones de  $\text{Na}^+$  por protones de  $\text{Ca}^{+2}$  en el fluido del sistema aumentando los grupos Si-OH, lo cual induce la nucleación de la HAP en el sistema (Kokubo 1997)<sup>68</sup>.

Cuando se adicionaron las macromoléculas biológicas en ambos sistemas de hidrogeles, se observó que la OPN tiene un efecto de inhibición evidente en el crecimiento de los cristales de HAP, en comparación con las otras macromoléculas biológicas adicionadas a los sistemas. Esto se explica debido a la alta fosforilación que tiene esta proteína, ya que los grupos fosfato de la OPN adsorben la superficie de la HAP por reemplazo de los iones ortofosfato con la celda del cristal, ocasionando un impedimento estérico en la deposición de los iones en la celda cristalina (Shimabayashi S, *et al* 1998)<sup>69</sup>. En estudios recientes se demostró que las diferencias en la fosforilación de la OPN pueden ocasionar efectos de inhibición y/o nucleación en los cristales de HAP (Gericke A., *et al* 2005)<sup>70</sup>, por lo cual la importancia de estos cambios en la fosforilación de la OPN esta directamente relacionada en la regulación de los procesos de biomineralización.

En cuanto a la inhibición en la formación de los cristales de HAP que ejercen el CSB y el CSC en los hidrogeles de agarosa, actúan inhibiendo la nucleación y el crecimiento de los cristales por impedimento estérico, lo cual se propone como un posible mecanismo de

inhibición de la HAP, ya que estos glucosaminoglicanos ocupan extensos dominios hidrodinámicos (Hunter G K, *et al* 1985)<sup>71</sup>.

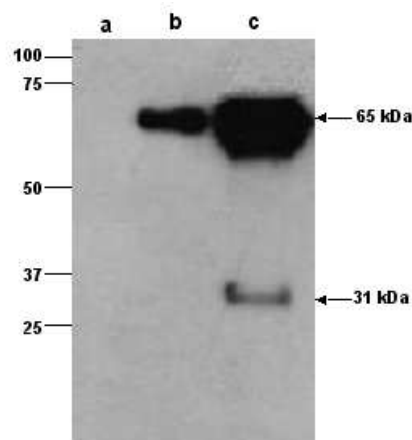
En los hidrogeles de sílice, el CSB, tiene un menor efecto de inhibición comparado con el efecto de la OPN, en cambio con el sulfato de condroitina C se promueve la formación de los cristales, por lo que se sugiere que este efecto se debe a la disminución en la viscosidad del gel y aumenta el proceso de difusión en la matriz.

## XI. RESULTADOS (Parte *In vivo*)

### 11.1 Detección de OPN en placas ateroscleróticas

Como se mencionó anteriormente, se sabe que el peso molecular de la OPN puede variar desde 75 kDa hasta 32 kDa, debido a las modificaciones postraduccionales que presenta por el tejido de su extracción. (Rittling and Feng., 1998)<sup>72</sup>. Por lo tanto, la OPN presenta un corrimiento errático en SDS-PAGE.

Para observar la sobreexpresión de OPN, en el desarrollo de la biomineralización vascular, se llevó a cabo la inmunodetección de OPN mediante Western blot, en las muestras de las aortas del conejo control y del conejo con tratamiento. En dicho análisis usamos como control positivo a la OPN recombinante (SIGMA-O2260), que migró en un doblete de 65 kDa y otro de 31 kDa (**Fig. 10c**). De acuerdo al protocolo experimental descrito anteriormente, se detectó a la OPN en la muestra del conejo con tratamiento de colesterol (**Fig. 7b**), sin embargo en la muestra del conejo sin tratamiento no se observó ninguna banda que correspondiera a los pesos moleculares en base al control positivo de OPN (**Fig. 10a**).

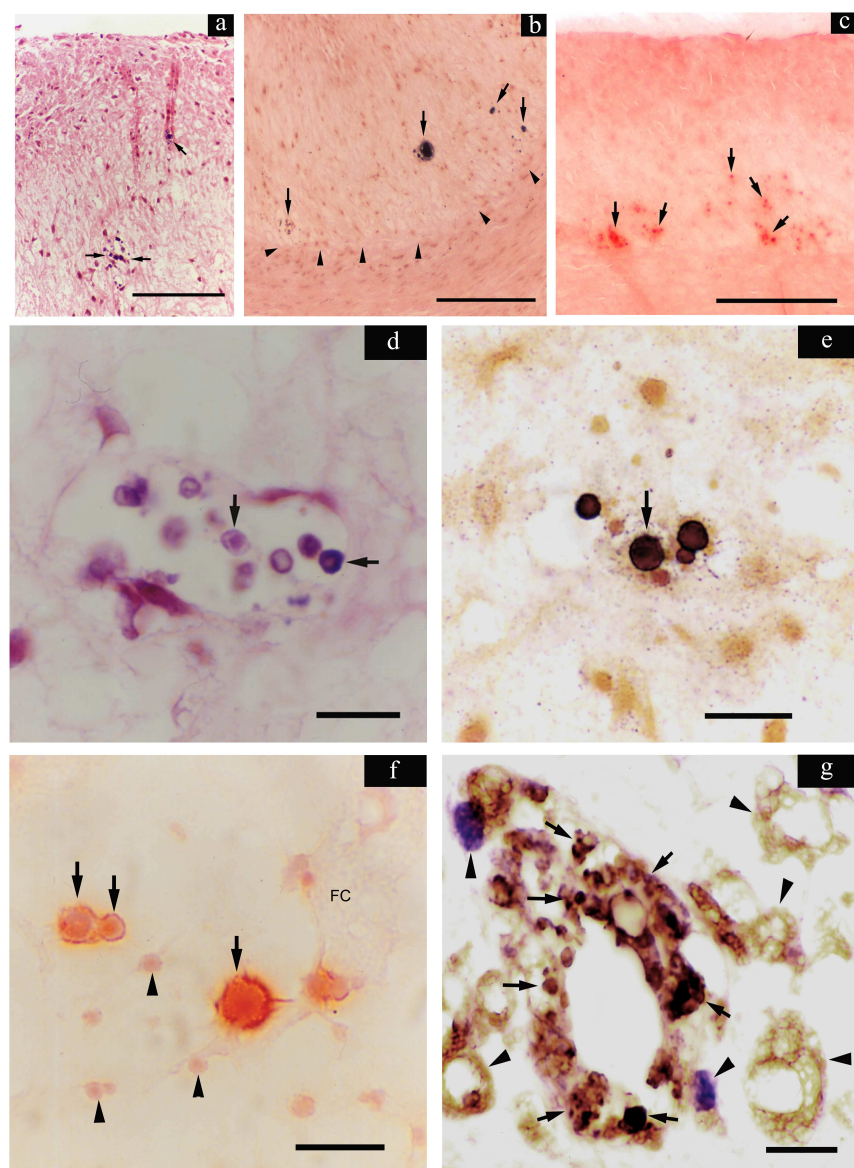


**Figura 10.** Inmunodetección de Osteopontina por western blot. (a) Muestra de aorta conejo-control, (b) Muestra de aorta de conejo con tratamiento. (c) Control de Osteopontina (SIGMA-O2260).

## 11.2 Histopatología

Después de tres meses de tratamiento, los animales que recibieron la dieta adicionada con colesterol desarrollaron aterosclerosis como un patrón característico e histopatológico. La aorta torácica y abdominal mostró un engrosamiento de la túnica íntima del 50% del perímetro normal de la luz. La capa subendotelial de la neoíntima estaba compuesta de células fusiformes, probablemente correspondientes a SMC y / o fibroblastos, y agregados de células espumosas, todos integrados en el tejido conjuntivo (**Fig. 11a**). Estas características también se observaron en lesiones ateromatosas en el interior de la capa subendotelial de la aorta con aparentemente estructura normal de la túnica íntima.

Fueron identificados agrupaciones de gránulos basófilos en las proximidades de la túnica media, cerca de la lámina elástica. También se observaron gránulos individuales dispersos en la neoíntima (**Fig. 11a**), rodeados de células espumosas y células estrelladas mostrando un citoplasma vacuolado. Muchos gránulos basófilos mostraron una estructura con un centro o blanco en lugar de luz y un centro eosinófilo (**Fig. 11d**).



**Figura 11.** Lesiones ateroscleróticas de las aortas de conejos tratados con dieta hipercolesterolémica. La neointima mostró las características de una placa aterosclerótica con la presencia de gránulos basófilos (a, d, flechas), que también fueron teñidos por el método de Von Kossa (b, e) en la frontera entre la neointima y la túnica media (b, puntas de flecha). La tinción con Rojo de alizarina S, se usó también como una tinción

alternativa para demostrar calcio, y confirmó que estas estructuras en forma de células blanco (c, f), rodeaban a las células espumosas (F, FC), lo que podría estar asociada a la mineralización de calcio. La tinción inmunohistoquímica demostró una estrecha relación entre la presencia de OPN extracelular (g, flechas) y celular (g, células espumosas marcadas con puntas de flecha) y los depósitos de calcio. Barras: a-c 250  $\mu\text{m}$ ; d-g 50  $\mu\text{m}$ .

### **11.3 Tinciones específicas para la demostración de calcio**

Los cortes de tejido de la aorta torácica y abdominal aterosclerótica, se tiñeron con el método de Von Kossa, donde se mostraron gránulos de color marrón oscuro, los cuales se visualizaron como puntos aislados y formando grupos a lo largo y cerca de la lámina elástica interna, y en la neoíntima (**Fig. 11b, e**). El diámetro de los pequeños gránulos de plata metálica, corresponden a los depósitos de sales calcio correspondientes a 1-2  $\mu\text{m}$  de diámetro, mientras que los gránulos más grandes corresponden a 10  $\mu\text{m}$  aproximadamente. Muy pocos tenían un tamaño cercano a 30  $\mu\text{m}$  y la mayoría de los gránulos positivos con la tinción de Von Kossa mostraron morfologías parecidas a células diana, muy parecidas a lo observado a los gránulos basófilos teñidos con H & E (**Fig. 11e**), ambos ubicados en lugares similares en la neoíntima.

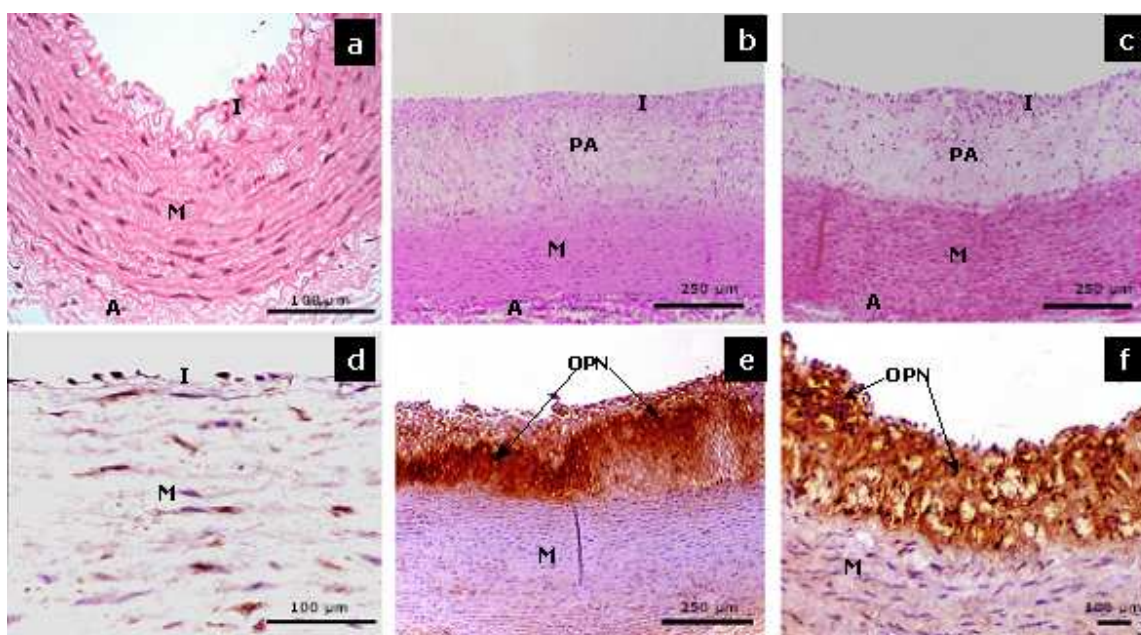
Las muestras teñidas con rojo de alizarina S resultaron ser similares a lo descrito anteriormente, con la diferencia de que con rojo de alizarina S el complejo de calcio formado el proceso de quelación da lugar a gránulos de color naranja (**Fig. 11c, f**).

### **11.4 Localización de OPN por inmunohistoquímica**

El análisis inmunohistoquímico de la sobre-expresión de OPN en la aorta de conejos tratados con dieta adicionada de colesterol, mostraron que la neoíntima se tiño intensamente y en general toda la placa aterosclerótica. De acuerdo a estos resultados, la



inmunoreactividad aparece en la túnica media y es menos evidente en células dispersas de la túnica adventicia (**Fig. 12 e, f**). La sobre-expresión de la OPN apareció en la neointima, principalmente en el citoplasma y en presencia de células endoteliales, macrófagos rodeados de células espumosas, y células fusiformes similares a SMC y fibroblastos. La más extensa tinción extracelular, de células positivas a OPN, se observó alrededor de estructuras esféricas morfológicamente compatibles con gránulos basófilos que se mostraron de igual forma con reacción positiva con el método de Von Kossa y con la tinción de rojo de alizarina (**Fig. 11 g**). Las muestras de las aortas de los animales control mostraron un nivel menor en la expresión de OPN, en su mayoría situados en las células endoteliales y SMC de la túnica media (**Fig. 12 a, d**).



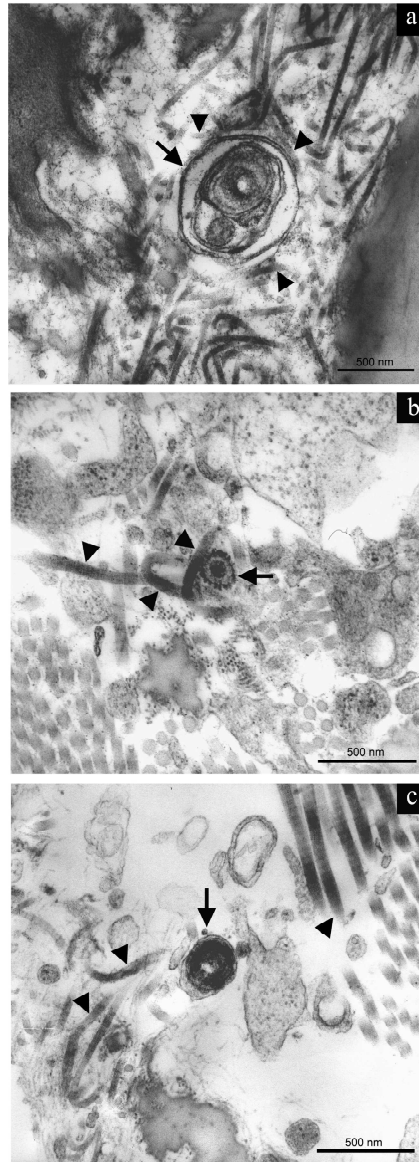
**Figura. 12.** (a) Muestra de aorta torácica de conejo control teñida con Hematoxilina & Eosina. (b y c). Muestras de aortas torácica y abdominal de conejo con tratamiento teñidas con Hematoxilina & Eosina. Inmunohistoquímica para detectar Osteopontina en la aorta torácica de conejo control (d). Inmunohistoquímica para detectar Osteopontina en la aorta torácica (e) y abdominal (f) de conejo con tratamiento. Obsérvese, que las regiones de sobreexpresión de OPN se situaron en la mayor parte de la placa

aterosclerótica, principalmente en la neointima (**e, f**). Las SMC de la túnica media también presentan una débil expresión de OPN (**f**).

## **11.5 Análisis ultraestructural de las aortas ateroscleróticas**

### **A) Microscopía electrónica de transmisión**

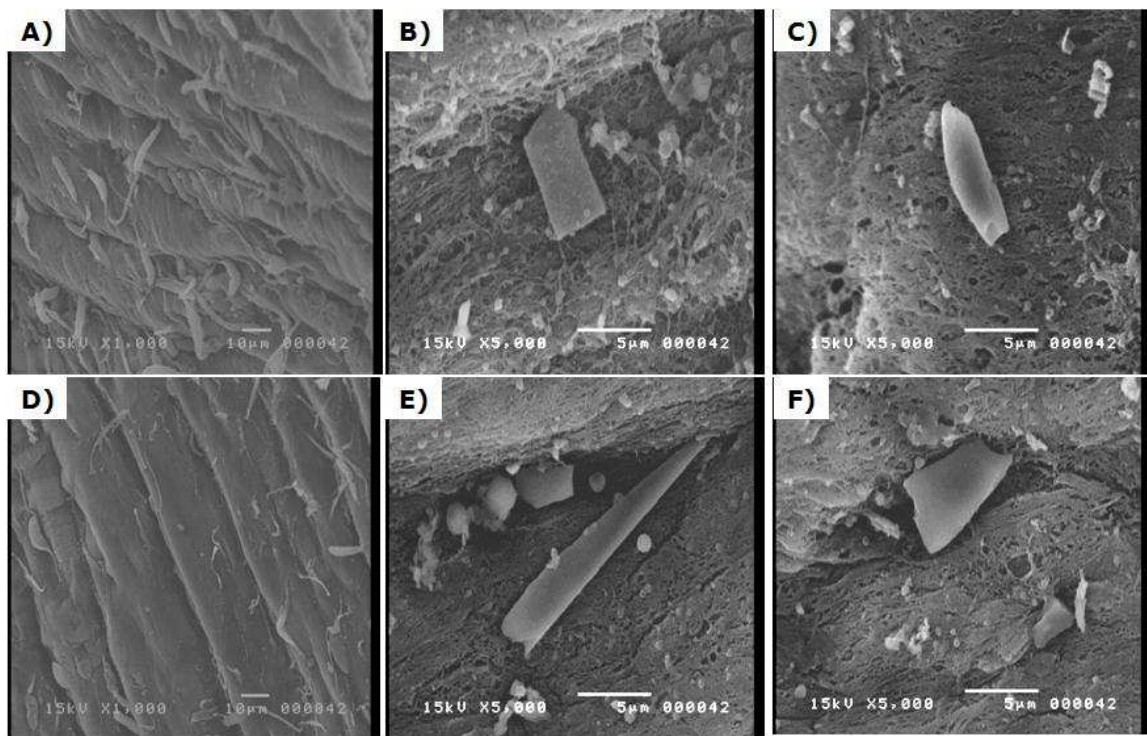
Se analizaron por medio de microscopía electrónica de transmisión, los fragmentos de la aorta normal (conejo sin tratamiento) y los fragmentos de las aortas ateroscleróticas (conejos con tratamiento), y se encontró en las aortas ateroscleróticas estructuras extracelulares con anillos concéntricos electro-densos y la presencia de estructuras parecidas a células diana electrodensas situadas en el límite entre la neointima y la túnica media (**Fig. 13a-c**). Este hallazgo es consistente con los experimentos realizados con las tinciones específicas para detectar calcio, donde estas estructuras están asociadas a la biomineralización vascular (Senger et al., 1983)<sup>73</sup>. La mayoría de estas estructuras se observaron cerca de las fibrillas de colágeno y relativamente cerca de material amorfo rodeado de microfibras que corresponden a la capa más profunda de la elástica, presentes en la túnica media de la pared vascular de la aorta.



**Figura 13.** Microscopía electrónica de transmisión de la neointima en el límite con la túnica media de aortas ateroscleróticas de conejo. Obsérvese la presencia de estructuras extracelulares parecidas a células diana (flechas) muy cercanas a fibrillas de colágeno (puntas de flecha), cerca de material amorfo rodeado de microfibrillas asociado a la lámina elástica. (a, b) Muestras tomadas de tórax y (c) aorta abdominal.

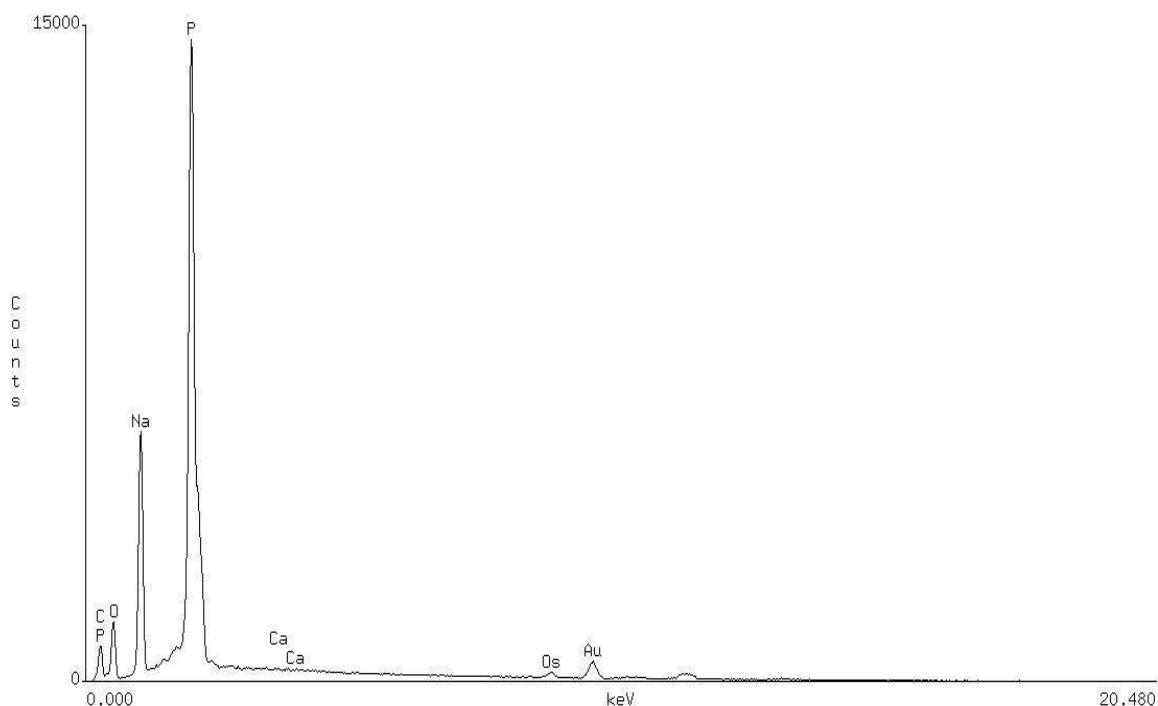
## B) Microscopía electrónica de barrido

El análisis por microscopía electrónica de barrido de la superficie luminal del endotelio de la túnica íntima de la aorta de los conejos con tratamiento (**Fig. 14**), comprobó la presencia de cristales de fosfato de calcio (HAP), debido al desarrollo de aterosclerosis. Este proceso provocó la acumulación de desechos celulares, especialmente de membrana los cuales tienen un alto contenido en fosfolípidos que promueven la nucleación de la HAP.

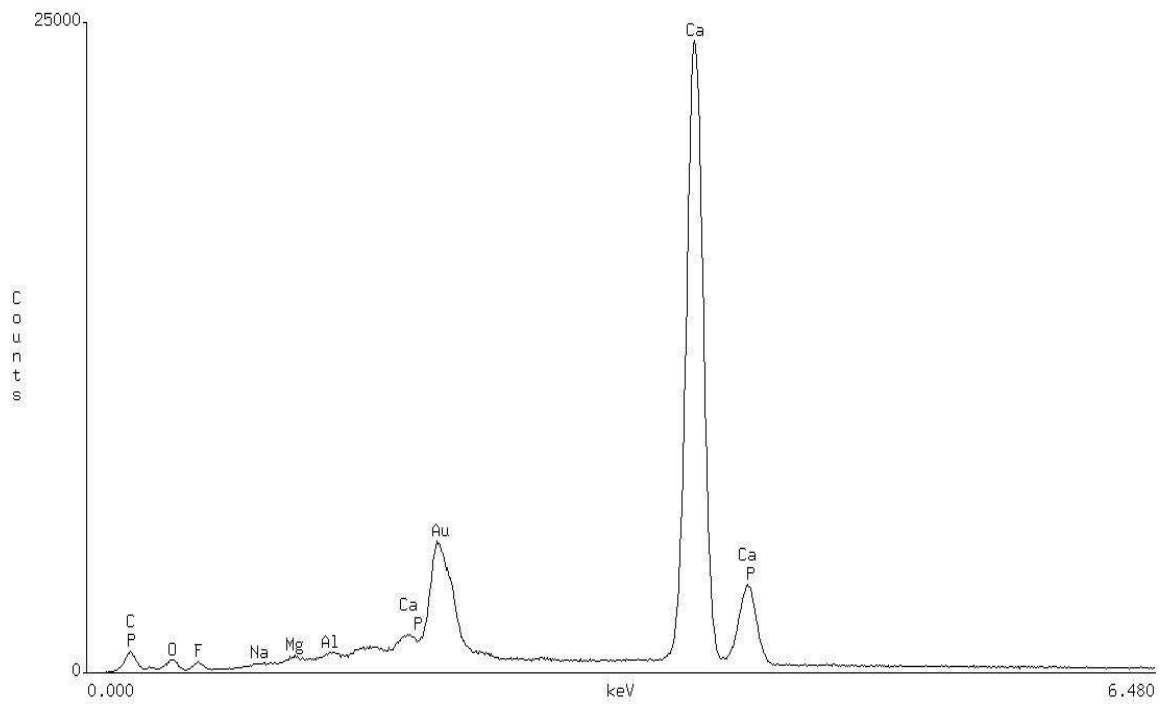


**Figura 14.** Fotomicrográficas electrónicas de barrido de la superficie luminal de la túnica íntima de la aorta de conejos. (A y D) aortas de conejos sin tratamiento (B, C, D y E) aortas de conejos con tratamiento hipercolesterolémico. Obsérvese en los cuatro campos la presencia de cristales.

Con la finalidad de analizar la composición química de los cristales encontrados en la superficie luminal de los conejos con tratamiento, se llevo a cabo un análisis de microscopia electrónica de barrido acoplada a rayos-X (SEM-EDS). Donde se encontró que estos cristales están constituidos por fósforo (P) (**Fig. 15**) y calcio (Ca) (**Fig.16**).



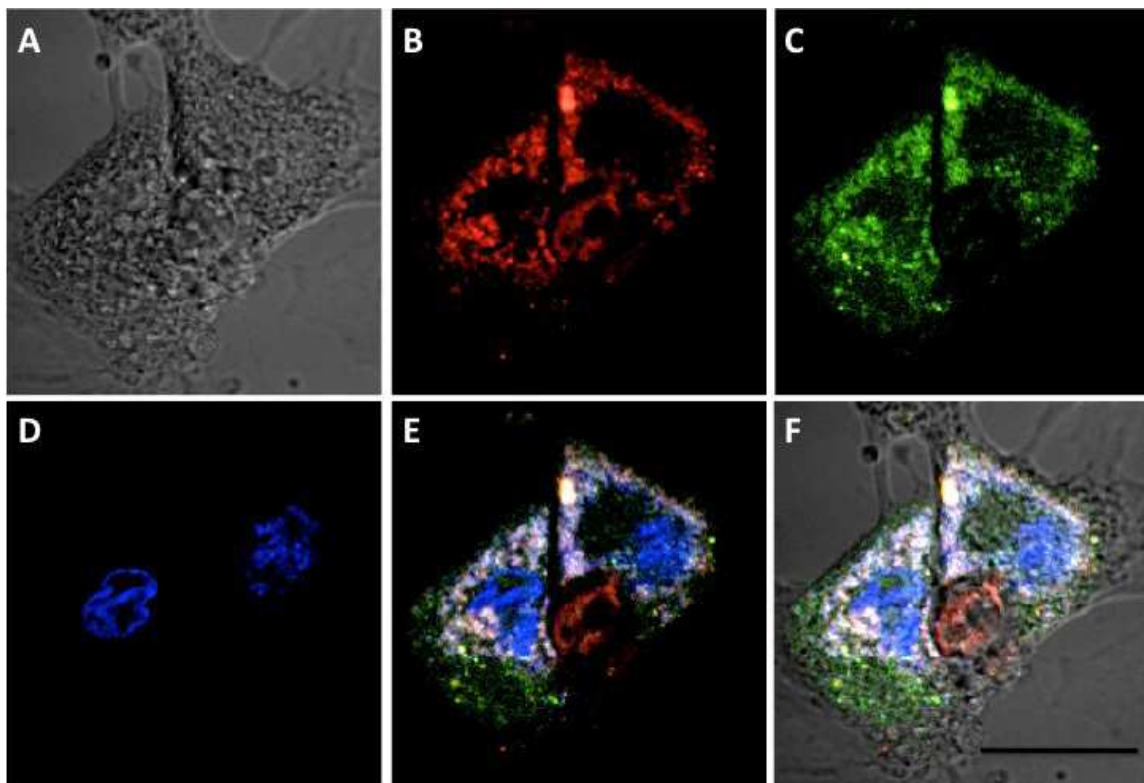
**Figura 15.** Análisis por SEM-EDS de la composición química de los cristales encontrados en la superficie luminal de la túnica intima en la aorta de conejo con tratamiento hipercolesterolémico. Obsérvese el pico característico de P.



**Figura 16.** Análisis por SEM-EDS de la composición química de los cristales encontrados en la superficie luminal de la túnica intima en la aorta de conejo con tratamiento hipercolesterolémico. Obsérvese el pico característico de Ca.

### 11.6 Inducción de estrés oxidativo

Para comprobar nuestra hipótesis de que con la exposición de las VSMC con LDLox y LDLac se provoca un microambiente celular de estrés oxidativo, se llevaron a cabo las pruebas de internalización de las LDLox marcadas con DiI (DiI-LDLox) y (DiI-LDLac), al mismo tiempo se incubaron con un compuesto llamado 6 Carboxi-H<sub>2</sub>DCFA, el cual permite reaccionar con los radicales libres como ROS y emitir fluorescencia. Se observó, que con la internalización de las LDLox por las VSMC es propiciado un ambiente de estrés oxidativo y por lo tanto la formación de ROS, lo cual se observó claramente con la colocación de ambos, ROS-fluorescencia (verde) y LDLox internalización (rojo) **Figura 17**. Así mismo, de manera muy similar se observó la reacción de estrés oxidativo en las VSMC con la internalización de las LDLac.

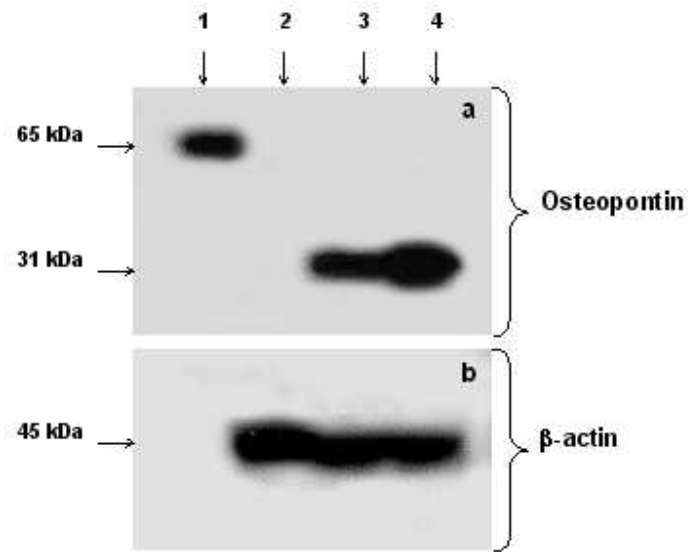


**Figura 17.** Internalización de las LDLox y la generación de ROS en células de músculo liso vascular T/G HA-VSMC incubadas con DiI-oxLDL (para observar la internalización de las LDLox/ac) (B), 6-carboxi-H<sub>2</sub>DCFA (marcador de estrés oxidativo) (C) y Hoechst 33258 marcador (para etiquetar los núcleos celulares) (D). Imagen de contraste de fase que muestra a T/G HA-CMLV (A). LDLox internalización (B). Marcadores de estrés oxidativo asociado a la generación de ROS (C). Núcleos marcados (D). (E) Combinación de B-D. (F) Combinación de A-D.  $\lambda$  Excitación para 6-carboxi-H<sub>2</sub>DCFA, DiI y Hoechst, 488, 543 y 405, respectivamente.  $\lambda$  emisión 519, 569 y 461 respectivamente. Barra= 30 $\mu$ m

#### 11.7 Detección de OPN en células de músculo liso vascular de humano (T/G HA-VSMC).

Con el fin de demostrar la presencia de estrés oxidativo en las VSMC fue provocada la endocitosis de LDLox/ac, lo cual desarrolló una modificación en la expresión de la OPN en las VSMC. Mediante un análisis por Western blot, se demostró que las VSMC tratadas con LDLox y LDLac expresaron OPN, en cambio las células cultivadas sin la internalización de las lipoproteínas modificadas químicamente no expresaron OPN (**Fig. 18**). Como se describió anteriormente, la apoptosis puede ser detonada a través de la internalización de las lipoproteínas por medio de los receptores basureros tipo A y B (SR-A y SR-B), en paralelo con la presencia de estrés oxidativo (Manzano-León et al., 2006)<sup>74</sup>.





**Figura 18.** Identificación de OPN mediante análisis por Western blot. Control de OPN recombinante (carril 1); VSMC cultivadas en ausencia de las lipoproteínas modificadas químicamente (control) (carril 2), CMLV después de la internalización de las LDLac y LDLox (carriles 3-4, respectivamente). Immunoblots desarrollado para osteopontina (a) y  $\beta$ -actina como control de carga de proteína (b).

## XII. DISCUSIÓN (parte *In vivo*)

De acuerdo a nuestros resultados anteriores *In vitro*, en este estudio *In vivo* se demostró que la OPN es una proteína inhibidora muy importante e inducible, debido a una respuesta adaptativa desarrollada por la hipercolesterolemia. La OPN se expresó gracias a la proliferación de las células vasculares y migratorias asociadas a la neoíntima y también asociadas a las lesiones ateroscleróticas. Este hallazgo se correlaciona directamente con la proliferación de células de músculo liso vascular y la producción de metaloproteasas de matriz (Castellano et al., 2008)<sup>75</sup>. Nuestros resultados pueden explicarse, de acuerdo a evidencias presentadas anteriormente ya que los nódulos calcificados parecen formarse primero en las regiones de depósitos lipídicos, en particular los involucrados con los lípidos oxidados (Olsson et al., 1999)<sup>76</sup>. Estos hallazgos se derivan en respuesta al colesterol oxidado, al TGF- $\beta$ 1 y a la BMP2 (Mohler et al., 1999)<sup>77</sup>, y RANKL (Kaden, et al., 2004)<sup>78</sup>, y la tasa de calcificación aumenta favoreciendo así la formación de nódulos y la expresión de los marcadores de osteoblastos. De acuerdo con nuestros resultados observados por microscopia electrónica de transmisión los depósitos mineralizados llamados calcosferitas, demuestran que, la biomineralización vascular inicia con pequeñas estructuras vesiculares conocidas como "vesículas de la matriz", donde se han detectado cristales de HAP, similarmente a la formación de tejido óseo. Dados estos hallazgos es interesante observar que, estas "vesículas de la matriz" se han encontrado en las lesiones ateroscleróticas (Hsu et al., 2002)<sup>79</sup>. Estas evidencias apoyan directamente nuestros resultados y confirman que, la OPN es una proteína inducida por el estrés oxidativo en células de músculo liso y células espumosas en las lesiones ateroscleróticas asociadas a depósitos de calcio *In vivo*. En otros estudios desarrollados *In vitro* e *In vivo*, se observó que las VSMC de humano presentan un

cambio fenotípico, que esta asociado con su capacidad para adquirir características de una amplia gama de linajes celulares mesenquimales; osteoblásticas, condrocíticas y adiposas (Tyson et al., 2003)<sup>80</sup>, por lo que estos hallazgos correlacionan muy bien con lo observado en la diferenciación de las VSMC a CVC entre el límite de la media con la neoíntima, de las aortas de conejos hipercolesterolémicos. En estudios anteriores se observó, que las lipoproteínas estimulan la calcificación de las VSMC y el cambio en la expresión de los genes de proteínas de hueso, que resulta en una notable diferenciación hacia células de tipo osteogénicas (Parhami et al., 2002; Proudfoot et al., 2002)<sup>81,82</sup>.

Recientemente, se ha informado que la biomineralización vascular puede producirse a través de la inducción de la osteogénesis y el establecimiento de un fenotipo osteocondrogénico regulado por BMPs. De acuerdo a todos estos hallazgos se ha demostrado que la BMP2, fomenta la utilización de fosfato y promueve la calcificación de VSMC de humano (Li et al., 2008)<sup>83</sup>, todas estas evidencias sugieren que las BMPs se encuentran promoviendo la diferenciación celular hacia la formación de hueso en las lesiones aterocleróticas promoviendo así la inducción de la osteogénesis. Una vez que se induce el fenotipo osteogénico, las células expresan factores de transcripción específicos como, MSX2. Cheng y colaboradores (2003), observaron que MSX2 promueve la osteogénesis y suprime la diferenciación adipogénica de células progenitoras mesenquimales pluripotenciales, en un modelo experimental en ratones cuando presentan hiperlipidemia y diabetes, a la par aportaron pruebas de que los miofibroblastos pueden ser desviadas a un linaje osteogénico mediante BMP2-MSX2<sup>84</sup>, tales factores de transcripción promueven la señalización que puede contribuir a la biomineralización vascular. En otros estudios se demostró que la OPN se sobreexpresó después de una lesión cardíaca llevada a cabo por traumas mecánicos o agentes de oxidación y quedo propuesta como una

importante molécula en la reducción de la inflamación y en la remodelación de tejidos (Kossmehl *et al.*, 2005; Okamoto, 2007)<sup>85,86</sup>. Por lo tanto, de acuerdo a nuestros resultados obtenidos *In vitro* e *In vivo*, la OPN regula el proceso de inflamación en los tejidos y repara el tejido vascular y se encuentra asociada con las respuestas específicas asociadas a células T, macrófagos y fibroblastos. Esta evidencia es apoyada por el hecho de que la OPN se expresa durante el proceso de la calcificación distrófica y esta correlacionada con la infiltración de tejidos de células T y los macrófagos (Giachelli *et al.*, 1998)<sup>87</sup>. Así, dependiendo de las condiciones específicas celulares, la OPN podría favorecer la influencia o efectos anti-inflamatorios durante la experimentación *In vitro*. Un claro ejemplo de este fenómeno se observó al aumentar y disminuir los niveles de IL-12 e IL-10, respectivamente (Ashkar *et al.*, 2000)<sup>88</sup>. Dado que la inflamación ha sido directamente relacionada con un estado de estrés oxidativo, nuestros experimentos sugieren que a mayor nivel de ROS en las células, se provoca la modulación de la expresión génica de OPN. Varios estudios han sugerido que ROS pueden considerarse como segundos mensajeros en la transducción de señales dependientes de ligandos llevado a cabo a través de la fosforilación de la tirosina y la señalización del calcio, así como la expresión de genes de proteínas específicas (Doan *et al.*, 1994; Finkel, 1998; Mietus-Snyder *et al.*, 2000; Suzuki & Ford, 1992)<sup>89-92</sup>. En el caso de las LDLox, se demostró que estimulan la cascada de señalización de calcio, por lo tanto aumenta la concentración de calcio libre en el citoplasma de las células, este hallazgo explica el porque las LDLox desencadenan el aumento de la concentración de calcio intracelular provocando así un desequilibrio intracelular y de esta manera se promueve la formación de precipitados mineralizados. Otra explicación a este fenómeno fue lo observado en un estudio desarrollado por Mietus-Snyder *et al.*, (2000)<sup>91</sup>, demostraron que existe un bloqueo específico en los canales de calcio en la membrana plasmática de las

células, así como el uso de un ionóforo de calcio (A23187), inhibiendo la expresión de SR-A. Por tal evidencia se ha propuesto que la expresión de SR-A es dependiente de la concentración de calcio intracelular. Por lo tanto en un estado de estrés oxidativo se promueve un incremento en la expresión del SR-A en VSMC, tal proceso esta directamente correlacionado con la activación del factor de transcripción AP1/c-Jun (Mietus-Snyder *et al.*, 2000; Mietus-Snyder *et al.*, 1998)<sup>91,93</sup>. En estudios llevados a cabo por Wang y Denhardt, (2008)<sup>94</sup> encontraron que, los sitios defosforilados de AP-1 se unen a sitios específicos en el promotor de TGF- $\beta$ , a la laminina, al colágeno tipo 1, la angiotensina tipo II y la OPN y se encuentran directamente relacionados con la señalización, proliferación, diferenciación celular y respuesta a ROS. Particularmente las LDLox no solamente actúan en la transformación de los macrófagos en células espumosas, sino también inducen la producción anormal de citocinas, dichos factores son un blanco importante en el desarrollo de la aterosclerosis y como consecuencia desencadenan la biomineralización vascular. En otro estudio desarrollado por Hsu *et al.*, 2001<sup>95</sup>, reportaron que la interleucina 1 beta (IL-1) y factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), los cuales son de las principales citocinas pro-inflamatorias, se encuentran inducidas por varios ligandos de tipo SR-A. Además, la actividad del SR-A en las VSMC puede ser modulado por ésteres de forbol, junto con la combinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y vanadato (Mietus-Snyder *et al.*, 1997)<sup>96</sup>. En este sentido, en nuestro laboratorio hemos desarrollado un estudio en células CHO (ovario de hámster chino) y RAW (ratón leucémicas macrófagos monocitos) y encontramos que en un estado de estrés oxidativo esta directamente asociado con los eventos postraduccionales del SR-A sin ninguna alteración en el proceso de transcripción del receptor. Partridge *et al.*, (2008)<sup>97</sup> emplearon un programa computacional para la identificación de una amplia gama de genes cuyos estados en la transcripción fueron predictivos en la expresión génica de OPN, donde

encontraron también que, varios de estos genes están asociados y regulados por la transcripción en condiciones oxido-reducción (Mietus-Snyder *et al.*, 2000; Partridge *et al.*, 2008)<sup>93,97</sup>.

### **XIII. DISCUSIÓN GENERAL**

En el presente estudio se demuestra por primera vez que el estrés oxidativo inducido por la internalización de las LDLox y LDLac causa la sobreexpresión de OPN en la neointima de la aorta de los conejos con una dieta alta en colesterol y en las VSMC, estas evidencias son correlacionados con nuestros resultados *In vitro* (geles de agarosa y sílice), donde la OPN causa una notable inhibición de los cristales de HAP, por lo tanto cabe resaltar, que el papel de la OPN es de un regulador inducible durante el proceso de biomineralización vascular y actúa inhibiendo la nucleación de los cristales de HAP en la lesión aterosclerótica. Nuestros resultados se explican debido a los múltiples dominios en la secuencia de la OPN, ya que tiene diversas funciones que puedan ser moduladas por estos dominios, así también como por diferentes fragmentos en la proteína (Chellaiah M. A. et al., 2003)<sup>98</sup>. En otros estudios realizados en cultivos celulares específicamente en células de músculo liso de aorta de bovino (BASMC) y células músculo liso de humano (HSMC), se demostró que las fosforilaciones de la OPN se encuentran directamente asociadas con el bloqueo en el crecimiento de los cristales de hidroxapatita, esta unión se lleva a cabo por la región RGD, la cual induce la resorción de los minerales en los tejidos cardiovasculares (Wada et al., 1999; Jono S et al., 2000)<sup>99,100</sup>.

Por otro lado, en estudios llevados a cabo por Harmey et al., (2004)<sup>101</sup> y Johnson et al., (2003)<sup>102</sup>, sugieren que la OPN es un componente de señalización celular y actúa antagónicamente en la deposición de minerales, por lo que inhibe la calcificación aórtica. Por lo tanto, nuestros resultados, afirman que la OPN es un regulador en la deposición mineral arterial bajo condiciones de lesión y/o enfermedad, entonces la OPN junto con

otros inhibidores, pueden controlar la biomineralización vascular bajo estas condiciones patológicas.

Debido a que, el principal objetivo de este estudio es contribuir en la elucidación del papel que ejerce la OPN en la biomineralización vascular, tratamos de hacer evidente la sobreexpresión de OPN en un ambiente de estrés oxidativo causado por la internalización celular de las LDLox y LDLac, sugerimos así que el factor principal por el cual se sobreexpresa OPN bajo estas condiciones de lesión, es por la presencia del promotor AP-1 encontrado en el gen de OPN y que también se encuentra involucrado en la diferenciación celular bajo la presencia de ROS según lo reportado por Wang, D. et al., (2000)<sup>103</sup>.

Por otro lado, se sabe que las especies reactivas de oxígeno (ROS) son productos naturales que inevitablemente se generan con el metabolismo celular. Debido a su capacidad de reacción extrema, puede dañar el ADN, las proteínas y los lípidos. Por lo anterior, se sabe que la biomineralización vascular es desarrollada de manera similar a la formación de hueso y por tanto algunos factores de transcripción como BMP-2 y Cbfa1 son estimulados por el estrés oxidativo, ya que ROS induce la señalización de estos marcadores de transcripción y de otros marcadores para la diferenciación osteoblástica. En otro estudio llevado a cabo por Steitz S.A. *et al.*, (2001)<sup>104</sup>, en cultivos de BASMC, encontraron la presencia de Cbfa1 el cual es un factor de transcripción de genes que normalmente codifica a proteínas que se encuentran en el tejido óseo. Cheng S.L. et al., (2003)<sup>105</sup> demostraron, que Msx2 otro factor de transcripción muy importante, interviene en la calcificación vascular y se encuentra directamente relacionado con genes adipocíticos, células osteogénicas y los miofibroblastos vasculares. Además, demostraron que Msx2 promueve la diferenciación de VSMC hacia miofibroblastos y osteoblastos, por la sobre regulación de *Osx* inducido por la transcripción de BMP2, el cual es un factor de transcripción osteoblastico específico en la



formación de hueso (Thomas, T. *et al.*, 1999)<sup>106</sup>. Otras evidencias sugieren que la señalización de BMP2 puede ser mediada a través de la formación de ROS. En estudios anteriores se observó, que cuando las células endoteliales se exponen a LDL oxidadas, expresan BMP2 (Mody N *et al.*, 2001)<sup>107</sup>. Otros estudios demostraron que la BMP2 aumenta la expresión de la subunidad oxidasa nox1 y NADPH, en las células endoteliales, lo cual aumenta la formación de superóxido y detona los efectos pro-inflamatorios río abajo del gen BMP2 de estas células, incluyendo el aumento en la expresión de la molécula de adhesión intracelular-1, lo cual tiene dependencia sobre el aumento de la expresión nox1 y de la actividad, según lo confirmado por la inhibición de siRNA y la expresión de nox1 (Sorescu G P *et al.*, 2004)<sup>108</sup>. Por lo tanto ROS trae como consecuencia una cascada de señalizaciones que inducen la formación de la calcificación vascular, lo cual sugiere que existe un estrecho vínculo entre la inflamación y la calcificación vascular, que a menudo se co-localiza en la lesión aterosclerótica. En ese mismo estudio llevado a cabo por Sorescu G. P. *et al.*, (2004)<sup>108</sup>, demostraron que BMP4 estimula la producción de ROS por los mecanismos dependientes del gen p47 basados en la NADPH oxidasa. Por lo tanto ROS en respuesta a BMP4, desempeña un papel crítico en la respuesta inflamatoria de células endoteliales: activando la expresión de moléculas de superficie como la molécula de adhesión celular intracelular (ICAM) y la adhesión de los monocitos; dando como consecuencia que el flujo oscilatorio forzado aumente la expresión de ARNm de nox1 y nox2, y la disminución de nox4; y además observaron que sólo con el aumento de BMP4 aumenta el nivel de ARNm de nox1<sup>108</sup>. En conjunto, estos hallazgos junto con nuestros resultados observados sugieren, que BMP4 esta producido en células endoteliales en respuesta al flujo oscilatorio forzado, que actúa como un mecanismo pro-inflamatorio estimulando la activación de citocinas, la producción de ROS y como consecuencia la

expresión de nox1, desencadenando la respuesta de la adhesión de los monocitos. Por todo lo anterior, un punto clave en nuestro estudio es que, la inducción del estrés oxidativo puede favorecer la osteogénesis en sub-poblaciones de células vasculares calcificadas (CVC). Un hallazgo importante de cómo poder explicar la transformación de las VSMC hacia células vasculares calcificadas, fueron los experimentos llevados a cabo por el grupo de Demer *et al.*, (1993)<sup>109</sup> quienes demostraron que, la biomineralización vascular puede desarrollarse a través de procesos moleculares similares a los de la osteogénesis, y demostraron que la BMP2 y algunos otros morfogenes de hueso se expresaron en las placas ateroscleróticas calcificadas de humanos. De acuerdo a lo anterior, la biomineralización vascular a menudo se asocia con elementos morfológicos y bioquímicos que intervienen en la osteogénesis.

De acuerdo a lo observado en nuestros resultados, proponemos que la sobreexpresión de OPN esta directamente relacionada con el estrés oxidativo el cual constituye un estímulo celular extrínseco y además es característico en este tipo de lesiones ateroscleróticas. Por esta razón, en este estudio se ha demostrado que, las células de músculo liso vascular, son capaces de sobreexpresar OPN como respuesta al estímulo del estrés oxidativo provocado por la presencia de LDLox y LDLac. En este contexto, proponemos que esta proteína es exportada al medio ambiente extracelular (el endotelio vascular *In vivo*), donde actúa inhibiendo la nucleación de cristales de hidroxapatita. Por lo tanto, la sobreexpresión de OPN localizada en los depositos mineralizados de la lesion aterosclerotica de los conejos con tratamiento hipercolesterolemico, junto con los resultados *In vitro* en los hidorgeles de agarosa y silice, confirma nuestra hipotesis de que la OPN en la biomineralizacion vascular inhibe la nueclacion de los cristales de HAP. Así mismo, el presente estudio demuestra que el estrés oxidativo producido por la acumulación de lípidos oxidados, como las LDLox y

LDLac, en la pared vascular puede ser el mecanismo subyacente común detrás del desarrollo paralelo de la biomineralización vascular. Por lo tanto, las diferencias en la comprensión de los mecanismos y las relaciones entre la función anti-calcificante frente a las propiedades proinflamatorias de OPN, podrían ayudar a crear terapias específicas dirigidas a la orientación de estas funciones de manera selectiva.

## XIV. CONCLUSIONES

- Se demostró en el estudio *In vitro* en hidrogeles de agarosa y sílice, que la osteopontina es un potente inhibidor del crecimiento de cristales de HAP.
- En el estudio *In vivo* se observó, que esta proteína se sobreexpresó en la neoíntima de las aortas de los conejos hipercolesterolémicos y se colocalizó en las células positivas a calcio, con las técnicas específicas correspondientes. Por lo tanto bajo estas condiciones, la OPN es un importante regulador en el proceso inflamatorio y una proteína clave en el proceso de inhibición en la biomineralización vascular.
- A su vez, se demostró que el estrés oxidativo intracelular promueve la sobreexpresión de la OPN en las VSMC, aumentando la diferenciación celular hacia células vasculares calcificadas, desarrollando así la Biomineralización Vascular.

## **XV. PERSPECTIVAS**

La próxima etapa de este estudio debe estar centrada en la sobre-expresión, purificación, cristalización y resolución estructural en 3D de la osteopontina (OPN) a través de difracción de rayos X.

Adicionalmente, mediante el proceso de difusión de los iones calcio y fosfato a través de los cristales de la OPN, nos permitirá determinar de manera estructural los sitios de unión y las interacciones entre el calcio y el fosfato en la estructura de la proteína. Por lo que este estudio contribuirá significativamente en la elucidación en el mecanismo de la biomineralización vascular.

### **➤ ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARA LA SOBRE-EXPRESIÓN DE OPN Y RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL.**

- 1.- Aislamiento del RNA mensajero de células de osteoblastos.
- 2.- Preparación de cDNA.
- 3.- Amplificación por PCR del gen de la OPN, mediante oligonucleótidos específicos para la región codificante del gen de la OPN.
- 4.- Clonación del gen en un vector para la manipulación de DNA, ejemplo, pBluescript.
- 5.- Re-clonación de la OPN en un vector de expresión de *E. coli* **pHLTEV** (vector no comercial derivado del pRSET-A). Este vector contiene el dominio dihidrolipoil acetiltransferasa de *Bacillus stearothermophilus* y un sitio de corte de la proteasa **TEV** ENLYFQG.5.- Análisis de la secuencia clonada por ensayos de restricción y secuenciación.

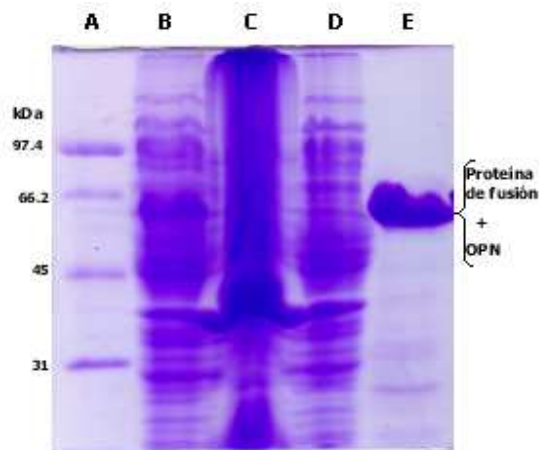
- 6.- Transformación de células **C41** de expresión de *E. coli* con el plásmido pHLTEV-OPN que contiene el gen de la OPN.
- 7.- Purificación de la OPN, mediante técnicas cromatográficas convencionales, ejem; afinidad a metales de Ni<sup>2+</sup>, intercambio iónico, filtración en gel.
- 8.- Cristalización de la OPN, mediante métodos convencionales de difusión en fase de vapor.
- 9.- Difracción de los cristales mediante radiación sincrotrón.
- 10.- Resolución tridimensional de la estructura de la OPN mediante programas computacionales.

➤ **RESULTADOS PRELIMINARES DE LAS PERSPECTIVAS.**

**Sobre-expresión de OPN en células de *E. coli*.**

Como se mencionó anteriormente se utilizaron células de *E. coli* **C41** para la sobre-expresión. Posteriormente, en el paso de la inducción se usaron 0.5 mM de IPTG a una temperatura de incubación de 37 °C durante 4h. Enseguida se recuperaron del medio de cultivo las células C41. Enseguida, las células se rompieron por sonicación y se separó la parte soluble de la parte insoluble mediante ultra-centrifugación. Se tomaron muestras tanto de la parte soluble y la insoluble (pellet) y se separaron en un gel de poliacrilamida en condiciones reductoras y desnaturizantes (Fig. 16).

Después la parte soluble se paso a través de una columna de Ni<sup>2+</sup>, donde por medio de un proceso de afinidad se separó la OPN que contiene una cola de histidinas de forma contraria a las demás proteínas (Fig. 19).



**Figura 19.** SDS-PAGE que contiene las muestras de la sobre-expresión de la OPN A) Marcadores de peso molecular, B) Fracción soluble, C) Fracción insoluble (pellet), D) Proteínas que no se unieron a la columna de  $\text{Ni}^{2+}$ , E) OPN mas la proteína de fusión resultante de la elución de la columna de  $\text{Ni}^{2+}$ .

Continuando con la estrategia experimental planteada anteriormente, la siguiente etapa será la digestión de la OPN de la proteína de fusión con la proteasa TEV, y se volverá a pasar por una columna de afinidad para obtener a la proteína liberada. Posteriormente, se desarrollarán otros pasos de purificación hasta obtener a la proteína con una pureza mayor al 98%.

Finalmente, para obtener la estructura en 3D se procederá con las pruebas de cristalización, difracción de los cristales, la colecta y procesamiento de los datos y la resolución estructural en 3D.

## XVI. REFERENCIAS:

1. Lowenstam, H. A. (1962). Goethite in radular teeth of recent marine gastropods. *Science* 137;279-80.
2. Weiner, S. & Addadi, L. (2002). Biomineralization. At the cutting edge. *Science* 298;375-376.
3. Mann, S. (2001). Biomineralization, principles and concepts in Bioinorganic Materials Chemistry, Oxford University Press.
4. Anderson, H.C. (1983). Calcific Diseases, *Arch Path and Lab Med.* 107, 341-8.
5. Schmid K, McSharry WO, Pameijer CH, Binette JP. (1980) Chemical and physicochemical studies on the mineral deposits of the human atherosclerotic aorta. *Atherosclerosis.* 37(2):199-210.
6. Beshensky A. M. & Wesson J. A. (2001). Effects of Urinary Macromolecules on Hydroxyapatite Formation. *Journal of the American Society of Nephrology.* 12:2108-2116.
7. Addadi, L.; Weiner, S. (1992) Control and Design Principles in Biological Mineralization. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 31, 153-169.
8. Mann, S.; Webb, J & Williams, J. P. (ed). (1989). Biomineralization. Chemical and biochemical perspectives. *VCH. N. Y. USA.* 541 pp.
9. Chasteen, N. D. & Harrison, P. M. (1999). Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage. *Journal of Structural Biology.* 126, 182-194.
10. Wilt, F. (1999). Matrix and mineral in the sea urchin larval skeleton. *Journal of Structural Biology.* 126, 216-226.
11. Sarashina, I. & Endo, K. (1998). Primary structure of a soluble matrix protein of scallop shell: Implications for calcium carbonate biomineralization. *American Mineralogist.* 83, 1510-1515.
12. Paul W. Brown & Brent Constantz. (1994) Hydroxyapatite and related materials Hydroxyapatite and Related Materials. Stanford University, Stanford, California, USA Stanford University.
13. Anderson H.C. (1983) Calcific diseases. *Arch. Path. and Lab Med.* 107, 341-8.



14. Olson JC, Edmundowicz D, Becker DJ, Kuller LH, Orchard TJ. (2000) Coronary calcium in adults with type 1 diabetes: A stronger correlate of clinical coronary artery disease in men than in women. *Diabetes*;49:1571–1578.
15. Christensen, Brian; Nielsen, Mette S.; Haselmann, Kim F.; Petersen, Torben E.; Sorensen, Esben S. (2005) Post-translationally modified residues of native human osteopontin are located in clusters: identification of 36 phosphorylation and five O-glycosylation sites and their biological implications. *Biochemical Journal* 390(1), 285-292.
16. Christensen, Brian; Petersen, Torben E.; Sorensen, Esben S. (2008). Post-translational modification and proteolytic processing of urinary osteopontin. *Biochemical Journal* 411(1):53-61.
17. Kazanecki CC, Uzwiak DJ, Denhardt DT (2007) Control of osteopontin signaling and function by post-translational phosphorylation and protein folding. *J Cell Biochem* 102(4):912–924.
18. Hynes RO. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 69(1):11-25.
19. Liaw L, Skinner MP, Raines EW, Ross R, Cheresch DA, Schwartz SM, Giachelli CM (1995) The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. Role of alpha v beta 3 in smooth muscle cell migration to osteopontin in vitro. *J Clin Invest* 95(2):713–724.
20. Yokosaki Y, Tanaka K, Higashikawa F, Yamashita K, Eboshida A (2005) Distinct structural requirements for binding of the integrins alphavbeta6, alphavbeta3, alphavbeta5, alpha5beta1 and alpha9beta1 to osteopontin. *Matrix Biol* 24(6):418–427.
21. Denda S, Reichardt L, Muller U (1998) Identification of osteopontin as a novel ligand for the integrin alpha8 beta1 and potential role for this integrin-ligand interaction in kidney morphogenesis. *Molecular biology of the cell* 9(6):1425–1435.
22. Hu DD, Lin EC, Kovach NL, Hoyer JR, Smith JW(1995) A biochemical characterization of the binding of osteopontin to integrins alpha v beta 1 and alpha v beta 5. *J Biol Chem* 270(44):26232–26238.
23. Yokosaki Y, Matsuura N, Sasaki T, Murakami I, Schneider H, Higashiyama S, Saitoh Y, Yamakido M, Taooka Y, Sheppard D (1999) The integrin alpha(9)beta(1) binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin. *J Biol Chem* 274(51):36328-36334.

24. Ito K, Kon S, Nakayama Y, Kurotaki D, Saito Y, Kanayama M, Kimura C, Diao H, Morimoto J, Matsui Y, Uede T (2009) The differential amino acid requirement within osteopontin in alpha4 and alpha9 integrin-mediated cell binding and migration. *Matrix Biol* 28(1):11–19.
25. Green PM, Ludbrook SB, Miller DD, Horgan CM, Barry ST (2001) Structural elements of the osteopontin SVVYGLR motif important for the interaction with alpha(4) integrins. *FEBS Lett* 503(1):75–79.
26. Yumoto K, Ishijima M, Rittling SR, et al. (2002). "Osteopontin deficiency protects joints against destruction in anti-type II collagen antibody-induced arthritis in mice". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (7): 4556–61.
27. Wang KX, Denhardt DT (2008). "Osteopontin: role in immune regulation and stress responses". *Cytokine Growth Factor Rev.* 19(5-6): 333–45.
28. Giachelli, C. M., Bae, N., Almeida, M., Denhardt, D. T., Alpers, C. E., and Schwartz, S. M. (1993) Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* 92, 1686–1696.
29. Nakase T, Takaoka K, Hirakawa K, Hirota S, Takemura T, Onoue H, Takebayashi K, Kitamura Y, Nomura S. (1994) Alterations in the expression of osteonectin, osteopontin and osteocalcin mRNAs during the development of skeletal tissues in vivo. *Bone Miner* 26:109-122.
30. Agnholt J, Kelsen J, Schack L, Hvas CL, Dahlerup JF, Soerensen ES. (2007) Osteopontin, a protein with cytokine-like properties, is associated with inflammation in Crohn's disease. *Scand J Immunol* 65:453-460.
31. Smith, L. L., Cheung, H. K., Ling, L. E., Chen, J., Sheppard, D., Pytela, R., and Giachelli, C. M. (1996) Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by alpha9beta1 integrin. *J. Biol. Chem.* 271, 28485–28491.
32. Crawford HC, Matrisian LM, Liaw L. (1998) Distinct roles of osteopontin in host defense activity and tumor survival during squamous cell carcinoma progression in vivo. *Cancer Res* 58:5206-5215.
33. Weber GF, Cantor H. (1996) The immunology of Eta-1/osteopontin. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7:241-248.

34. Jiménez-Corona AE, Pérez-Torres A, Mas-Oliva J, Moreno A. (2008) Effect of Osteopontin, Chondroitin Sulfates (B, C), and Human Serum Albumin on the Crystallization Behavior of Hydroxyapatite in Agarose and Silica Hydrogels *J. Crystal Growth and Design* 8(4),1335-1339.
35. Liaw L, Lindner V, Schwartz SM, Chambers AF, Giachelli CM. (1995) Osteopontin and beta 3 integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium in vivo and stimulate Arg-Gly-Asp-dependent endothelial migration in vitro. *Circ Res* 77:665-672.
36. Isoda K, Nishikawa K, Kamezawa Y, Yoshida M, Kusuhara M, Moroi M, Tada N, Ohsuzu F. (2002) Osteopontin plays an important role in the development of medial thickening and neointimal formation. *Circ Res.* 91:77-82.
37. Giachelli CM. (2001) Ectopic calcification: new concepts in cellular regulation. *Z Kardiol.* 90:31-7.
38. Rumberger, J.A., Simons, L.A. Fitzpatrick, P.F. Sheedy, and R.S. Schwartz. (1995). Coronary artery calcium area by electron-beam computed tomography and coronary atherosclerotic plaque area. A histopathologic correlative study. *Circulation.* 92:2157-2162.
39. Trion Astrid, MSc, and Arnoud van der Laarse. (2004) Vascular smooth muscle cells and calcification in atherosclerosis. *American Heart Journal.* 147:5:808-814.
40. Lehto, S., L Niskanen, M. Suhonen, T. Ronnema, and M. Laakso. (1996). Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16:978-983.
41. Mc Gill HC, Infuster V, Ross R, (1996) Topol EJ, editors. Atherosclerosis and coronary artery disease. Philadelphia: Lippincott Raven. 25-41.
42. Brown MS, Goldstein JL. (1983) Lipoprotein receptors in the liver. Control signals for plasma cholesterol traffic. *J Clin Invest.* 72(3):743-7.
43. Ross, Russell. (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362(6423), 801-9.
44. Badimon L, Chesebro JH, Badimon JJ. 1992 Thrombus formation on ruptured atherosclerotic plaques and rethrombosis on evolving thrombi. *Circulation.* 86:III74-85.
45. Trion Astrid, MSc, and Arnoud van der Laarse. (2004) Vascular smooth muscle cells and calcification in atherosclerosis. *American Heart Journal.* 147:5:808-814.

46. Severson AR, Ingram RT, Fitzpatrick LA. (1995) Matrix proteins associated with bone calcification are present in human vascular smooth muscle cells grown in vitro. *In vitro cell Dev Biol.* 31:853-857.
47. Watson Ke, Bostrom K, Ravindranath R, Lam T, Norton B, Demer LL. (1994) TGF- $\beta$  1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J Clin Invest.* 93:2106-2113.
48. Carew, T. E.; Schwenke, D. C.; Steinberg, D. (1987) Antiatherogenic effect of probucol unrelated to its hypocholesterolemic effect: evidence that antioxidant *in vivo* can selectively inhibit low density lipoprotein degradation in macrophage-rich fatty streaks and slow the progression of atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:7725–7729.
49. Keaney, J. F. Jr.; Xu, A.; Cunningham, D.; Jackson, T.; Frei, B.; Vita, J. A. (1995) Dietary probucol preserves endothelial function in cholesterol-fed rabbits by limiting vascular oxidative stress and superoxide generation. *J. Clin. Invest.* **95**:2520–2529.
50. Badwey, J. A.; Karnovsky, M. L. (1980) Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *Annu. Rev. Biochem.* **49**:695–726.
51. Shimizu, S.; Ishii, M.; Yamamoto, T.; Kawanishi, T.; Momose, K.; Kuroiwa, Y. (1994) Bradykinin induces generation of reactive oxygen species in bovine aortic endothelial cells. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **84**:301–314.
52. Yang, W.; Block, E. R. (1995) Effect of hypoxia and reoxygenation on the formation and release of reactive oxygen species by porcine pulmonary artery endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 164:414–423.
53. Ohara, Y.; Peterson, T. E.; Harrison, D. G. (1993) Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J. Clin. Invest.* 91:2546–2551.
54. Griendling, K. K.; Ushio-Fukai, M. (1998) Redox control of vascular smooth muscle proliferation. *J. Lab. Clin. Med.* **132**:9–15.
55. Sundaresan, M.; Yu, Z.-X.; Ferrans, V. J.; Irani, K.; Finkel, T. (1995) Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* **270**:296–299.
56. Meyer, M.; Schreck, R.; Muller, J. M.; Baeuerle, P. A. (1994) Redox control of gene expression by eukaryotic transcription factors NF- $\kappa$ B, AP-1 and SRF/TCF. In: Pasquier, C.; Olivier, R.Y.; Auclair, C.; Packer, L., eds. *Oxidative stress, cell activation and viral infection*. Basel, Boston, Berlin: Birkhauser Verlag; 217–234.

57. Wendel A. (1987) Measurement of in vivo lipid peroxidation and toxicological significance. *Free Radic Biol Med* 3: 355–358.
58. Goldstein JL and Brown MS. (1977) The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 46: 897–930.
59. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, and Brown MS. (1979) Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 333–337.
60. Krieger M, Acton S, Ashkenas J, Pearson A, Penman M, and Resnick D. (1993) Molecular flypaper, host defense, and atherosclerosis. Structure, binding properties, and functions of macrophage scavenger receptors. *J Biol Chem* 268: 4569–4572.
61. Henriksen T, Mahoney EM, and Steinberg D. (1981) Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 6499–6503.
62. Krieger M. (1997) The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Curr Opin Lipidol* 8: 275–280.
63. Kodama T, Freeman M, Rohrer L, Zabrecky J, Matsudaira P, and Krieger M. (1990) Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature* 343: 531–535.
64. Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME. (1999) Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation*. 100:2168–2176.
65. Hunter, G. K.; Goldberg, H. A. (1993) Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8562–8565.
66. Eiden-Assmann, S.; Viertelhaus, M.; Heiss, A.; Hoetzer, K. A.; H. A. Felsche, J. (2002) The influence of the amino acids on the biomineralization of hydroxyapatite in gelatin. *J. Inorg. Biochem.* 91, 481–486.
67. Villacampa, A. I.; Garcia-Ruiz, J. M. (2000) Synthesis of a new hydroxyapatite-silica composite material. *J. Cryst. Growth* 211, 111–115.
68. Kokubo, Tadashi. (1997) Novel bioactive materials. *Anales de Quimica International Edition* 93, S49-S55.

69. Shimabayashi, S.; Uno, T. (1998) Crystal Growth of Calcium Phosphates in the Presence of Polymeric Inhibitors. *Calcium Phosphates in Biological and Industrial Systems*; Kluwer Academic Publishers: Boston, Chapter 9, pp 193–216.
70. Gericke, A.; Qin, C.; Spevak, L.; Fujimoto, Y.; Butler, W. T.; Sorensen, E. S.; Boskey, A. L. (2005) Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcif. Tissue Int.* 77, 45–54.
71. Hunter, G. K.; Allen, B. L.; Grynepas, M. D.; Cheng, P. T. (1985) Inhibition of hydroxyapatite formation in collagen gels by chondroitin sulphate. *Biochem. J.* 228, 463–469.
72. Rittling SR, Feng F. (1998) Detection of mouse osteopontin by western blotting. *Biochemical and biophysical research communications* 250(2):287-92.
73. Senger DR, Asch BB, Smith BD, Perruzzi CA, Dvorak HF. (1983) A secreted phosphoprotein marker for neoplastic transformation of both epithelial and fibroblastic cells. *Nature* 302:714-5.
74. Manzano-Leon N, Delgado-Coello B, Guaderrama-Diaz M, Mas-Oliva J. (2006) Betaadaplin: key molecule for microglial scavenger receptor function under oxidative stress. *Biochemical and biophysical research communications* 351(3):588-94.
75. Castellano G, Malaponte G, Mazzarino MC, Figini M, Marchese F, Gangemi P, et al. (2008) Activation of the osteopontin/matrix metalloproteinase-9 pathway correlates with prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* 14(22):7470-80.
76. Olsson M, Thyberg J, Nilsson J. (1999) Presence of oxidized low density lipoprotein in nonrheumatic stenotic aortic valves. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19(5):1218-22.
77. Mohler ER, 3rd, Chawla MK, Chang AW, Vyavahare N, Levy RJ, Graham L, et al. (1999) Identification and characterization of calcifying valve cells from human and canine aortic valves. *The Journal of heart valve disease* 8(3):254-60.
78. Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R, Haase KK, Sarikoc A, Kilic R, et al. (2004) Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *Journal of molecular and cellular cardiology* 36(1):57-66.
79. Hsu HH, Camacho NC, Tawfik O, Sun F. (2002) Induction of calcification in rabbit aortas by high cholesterol diets: roles of calcifiable vesicles in dystrophic calcification. *Atherosclerosis* 161(1):85-94.

80. Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM. (2003) Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 3(3):489-94.
81. Parhami F, Basseri B, Hwang J, Tintut Y, Demer LL. (2002) High-density lipoprotein regulates calcification of vascular cells. *Circulation research*. 91(7):570-6.
82. Proudfoot D, Davies JD, Skepper JN, Weissberg PL, Shanahan CM. (2002) Acetylated low-density lipoprotein stimulates human vascular smooth muscle cell calcification by promoting osteoblastic differentiation and inhibiting phagocytosis. *Circulation* 106(24):3044-50.
83. Li X, Yang HY, Giachelli CM. (2008) BMP-2 promotes phosphate uptake, phenotypic modulation, and calcification of human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 199(2):271-7.
84. Cheng SL, Shao JS, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. (2003) MSX2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors. *The Journal of biological chemistry*. 278(46):45969-77.
85. Kossmehl P, Schonberger J, Shakibaei M, Faramarzi S, Kurth E, Habighorst B, et al. (2005) Increase of fibronectin and osteopontin in porcine hearts following ischemia and reperfusion. *Journal of molecular medicine* 83(8):626-37.
86. Okamoto H. (2007) Osteopontin and cardiovascular system. *Molecular and cellular biochemistry* 300(1-2):1-7.
87. Giachelli CM, Lombardi D, Johnson RJ, Murry CE, Almeida M. (1998) Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *The American journal of pathology* 152(2):353-8.
88. Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, et al. (2000) Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* 287(5454):860-4.
89. Doan TN, Gentry DL, Taylor AA, Elliott SJ. (1994) Hydrogen peroxide activates agonistsensitive Ca<sup>2+</sup>-flux pathways in canine venous endothelial cells. *The Biochemical journal* 297( Pt 1):209-15.
90. Finkel T. (1998) Oxygen radicals and signaling. *Current opinion in cell biology* 10(2): 248-53.

91. Mietus-Snyder M, Gowri MS, Pitas RE. (2000) Class A scavenger receptor up-regulation in smooth muscle cells by oxidized low density lipoprotein. Enhancement by calcium flux and concurrent cyclooxygenase-2 up-regulation. *The Journal of biological chemistry* 275(23):17661-70.
92. Suzuki YJ, Ford GD. (1992) Superoxide stimulates IP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release from vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *The American journal of physiology* 262(1 Pt 2):H114-6.
93. Mietus-Snyder M, Glass CK, Pitas RE. (1998) Transcriptional activation of scavenger receptor expression in human smooth muscle cells requires AP-1/c- and C/EBPβ: both AP-1 binding and JNK activation are induced by phorbol esters and oxidative stress. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 18(9): 1440-9.
94. Wang KX, Denhardt DT. (2008) Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine & growth factor reviews* 19:333-45. 30.
95. Hsu HY, Chiu SL, Wen MH, Chen KY, Hua KF. (2001) Ligands of macrophage scavenger receptor induce cytokine expression via differential modulation of protein kinase signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* 276(31):28719-30.
96. Mietus-Snyder M, Frieria A, Glass CK, Pitas RE. (1997) Regulation of scavenger receptor expression in smooth muscle cells by protein kinase C: a role for oxidative stress. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 17(5):969-78.
97. Partridge CR, He Q, Brun M, Ramos KS. (2008) Genetic networks of cooperative redox regulation of osteopontin. *Matrix Biol* 27(5):462-74.
98. Chellaiah MA, Hruska KA. (2003) The integrin α(v)β(3) and CD44 regulate the actions of osteopontin on osteoclast motility. *Calcif Tissue Int.* 72:197–205.
99. Wada T, McKee MD, Stietz S, Giachelli CM. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by osteopontin. *Circ Res.* 1999; 84:1– 6.
100. Jono S, Peinado C, Giachelli CM. (2000) Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Biol Chem.* 275:20197–20203.
101. Harmeý D, Hessle L, Narisawa S, Johnson KA, Terkeltaub R, Millan JL. (2004) Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by akp2, enpp1, and ank: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders. *Am J Pathol.* 164:1199–1209.



102. Johnson K, Goding J, Van Etten D, Sali A, Hu SI, Farley D, Krug H, Hesse L, Millan JL, Terkeltaub R. (2003) Linked deficiencies in extracellular PP(i) and osteopontin mediate pathologic calcification associated with defective PC-1 and ANK expression. *J Bone Miner Res.* 18:994–1004.
103. Wang D, Yamamoto S, Hijiya N, Benveniste EN, Gladson CL. (2000) Transcriptional regulation of the human osteopontin promoter: functional analysis and DNA-protein interactions. *Oncogene.* 23;19(50):5801-9.
104. Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebersold R, Schinke T, Karsenty G, Giachelli CM. (2001) Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res.* 7;89(12):1147-54.
105. Cheng SL, Shao JS, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. (2003) MSX2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors. *J Biol Chem.* 14;278(46):45969-77.
106. Thomas, T., Gori, F., Spelsberg, T. C., Khosla, S., Riggs, B. L., and Conover, C. A. (1999) Response of bipotential human marrow stromal cells to insulin-like growth factors: effect on binding protein production, proliferation, and commitment to osteoblasts and adipocytes. *Endocrinology* 140, 5036–5044.
107. Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL. (2001) Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med.* 31:509–519.
108. Sorescu GP, Song H, Tressel SL, Hwang J, Dikalov S, Smith DA, Boyd NL, Platt MO, Lassegue B, Griending KK, Jo H. (2004) Bone morphogenic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress induces monocyte adhesion by stimulating reactive oxygen species production from a nox1-based NADPH oxidase. *Circ Res.* 95:773–779.
109. Bostrom, K., Watson, K. E., Horn, S., Wortham, C., Herman, I. M., and Demer, L. L. (1993) Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.* 91 ;1800–1809.

## **XVII. APENDICES**

# Effect of Osteopontin, Chondroitin Sulfates (B, C), and Human Serum Albumin on the Crystallization Behavior of Hydroxyapatite in Agarose and Silica Hydrogels

Azucena E. Jiménez-Corona,<sup>†</sup> Armando Pérez-Torres,<sup>‡</sup> Jaime Mas-Oliva,<sup>§</sup> and Abel Moreno<sup>\*,\*†</sup>

*Instituto de Química, Facultad de Medicina, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, C.U. 04510 México, D.F., Mexico*

Received November 20, 2007; Revised Manuscript Received December 20, 2007

**ABSTRACT:** This contribution describes the nucleation and crystal growth behavior of hydroxyapatite (HAP) crystals grown in agarose and silica hydrogels as well as their characterization via powder X-ray diffraction. The effect of several biological macromolecules such as osteopontin, chondroitin sulfates B and C, and human serum albumin (HSA) on crystal growth behavior of HAP is evaluated. From our results, osteopontin and chondroitin sulfates B and C inhibit the HAP crystal growth in agarose hydrogels. Nevertheless, employing silica hydrogels, only osteopontin inhibits the crystal growth of HAP. On the other hand, HSA does not show any effect on the formation of HAP crystals in both types of hydrogels.

## 1. Introduction

The chemical behavior of calcium in living organisms is quite interesting. For instance, calcium salts rarely crystallize in different tissues apart than bones. However, in abnormal conditions, the crystallization of calcium salts occurs in soft-tissues causing severe damage in cardiac valves, arteries, and kidney. Atherosclerosis is characterized by the formation of atheroma plaque in the tunica intima and tunica media of arteries.<sup>1</sup> Consequently, the main risk factors that promote development of this thickening and hardening process are high levels of low-density apolipoproteins (LDL) cholesterol, and triglycerides, associated with diseases such as obesity, hypertension, nicotine poisoning, diabetes, renal failure, and genetic predisposition.<sup>2</sup> One of the late mechanisms associated with the formation of atheroma lesions is the vascular mineralization by deposition of calcium phosphate.<sup>3</sup>

The onset and progression of calcification in arterial plaques is poorly understood. However, accumulating evidence suggests that pathologic calcification of atherosclerotic vessels shares common features with normal bone growth such as cellular proliferation, matrix deposition, and calcification. Type I collagen is associated with bone formation, and it is the main collagen found in atherosclerotic plaques.<sup>4,5</sup> Another common feature of bone and calcified atherosclerotic arteries is the presence of phosphatases and calcium binding phospholipids in matrix vesicles that serve as nucleants of crystal formation.<sup>6–9</sup> The mineral deposits in arterial plaques consist of crystalline hydroxyapatite (HAP), the major inorganic component of bone.<sup>10,11</sup>

The most appropriate methodology to study the in vitro formation of HAP crystals is to grow these crystals under diffusion control. For a long time, crystal growth in gels has been demonstrated to be the best media to work in well-controlled conditions, perfectly emulating the crystal growth in biological systems. Nevertheless, it took a quarter of a century to apply crystal growth in gels using proteins in order to increase

crystal quality. This enhancement in the crystal quality showed also the important role of gels in the transport control as well as in the crystal size of proteins and inorganic compounds.<sup>12</sup>

Recently, several investigations have described proteins as the main component of the organic matrices associated with a variety of biominerals, including tooth enamel,<sup>13</sup> the nacreous layer in mollusk shells,<sup>14</sup> and trout otoliths.<sup>15</sup> Synthetically, crystal growth in hydrogels<sup>16–20</sup> is an alternative to solution-based strategies<sup>21–26</sup> for controlling the morphology (growth) of crystals. One advantage of using gels as a media for crystal growth is that this method provides a stable mass transport mechanism dominated by diffusion processes.<sup>27–30</sup>

We grew HAP crystals in gels to test the crystal growth behavior in two different systems of hydrogels, agarose and silica. In this contribution, it is demonstrated that crystal growth in gels improves the direction, morphology, and quality of HAP crystals. Additionally, the effect of biological macromolecules, such as osteopontin (OPN), chondroitin sulfate (CS), and human serum albumin (HSA), on the formation of these crystals was also evaluated due to their importance in kidney problems and other medical reasons.<sup>31</sup> Finally, the influence of the type of gel matrix on the obtaining of HAP crystals was also studied. These results could contribute to elucidation in part of the mechanisms related to cardiovascular biomineralization, and the role of several biological macromolecules on the formation of mineral.

## 2. Experimental Procedures

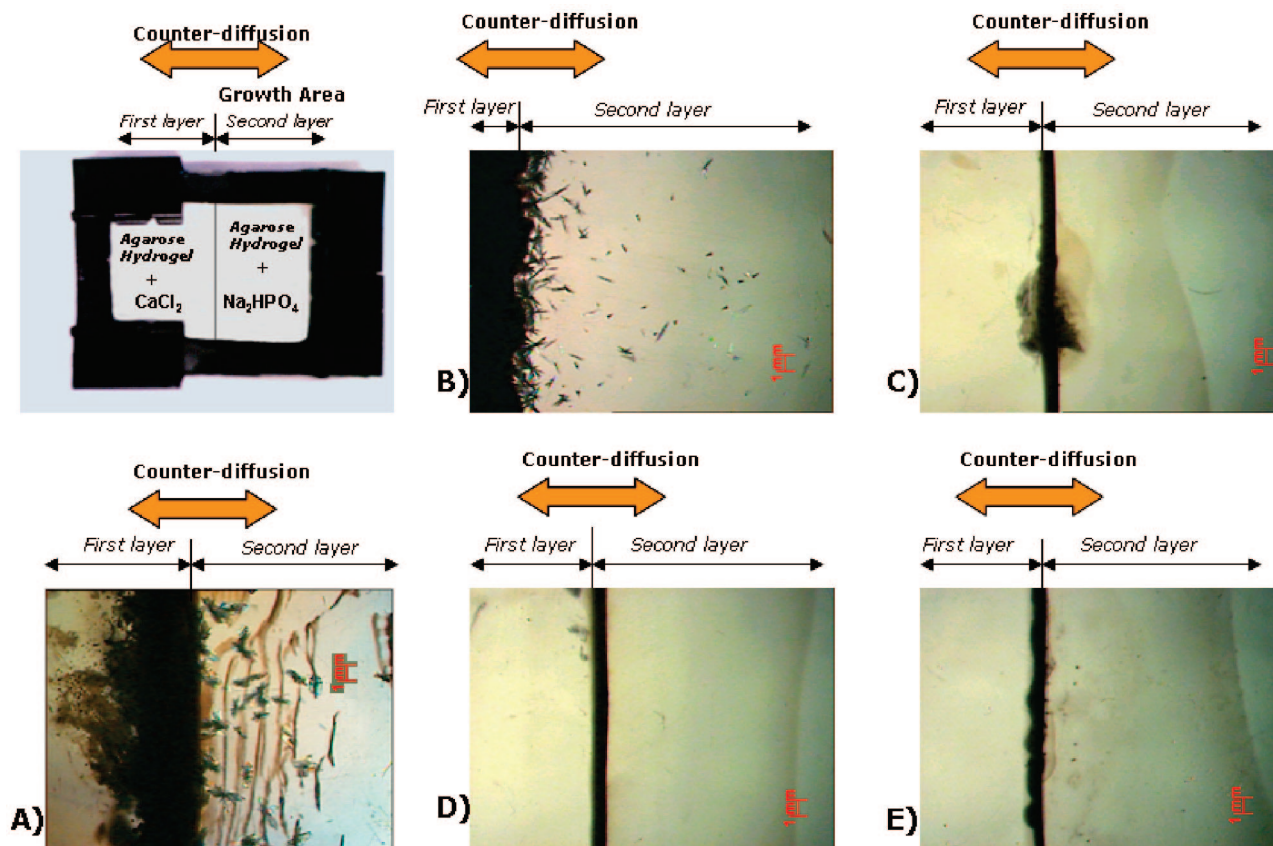
**2.1. In Vitro Synthesis of Hydroxyapatite in Agarose Hydrogels.** The synthesis of HAP was performed following the procedures reported by Hunter and Goldberg<sup>32</sup> and Eiden-Assmann et al.<sup>33</sup> with a few modifications and adapted to our crystallization setup. The experimental setup is described as follows: a crystallization box (cassette) was constructed consisting of two siliconized glass slides of  $10 \times 7 \text{ cm}^2$  separated by a rubber separator of 4 mm thickness in order to create a free space between glasses (in a similar way to the well-known commercial protein electrophoresis cameras). It is recommended to use a set of clamps around the cassette to fit the glasses and to avoid dripping of the reactants or evaporation (drying off the cassette). After building the cassette, this was filled with 2 mL 0.1% (w/v) agarose gel containing 0.4 M calcium chloride prepared in Tris-HCl buffer pH 7.4. After the gelling part of this first layer was obtained, 2 mL of 0.1%

\* Corresponding author. E-mail: carcamo@servidor.unam.mx; abel.moreno@mac.com. Phone: +52 55-56224467. Fax: +52-55-56162217.

<sup>†</sup> Instituto de Química.

<sup>‡</sup> Facultad de Medicina.

<sup>§</sup> Instituto de Fisiología Celular.



**Figure 1.** HAP crystal synthesis in agarose hydrogels and its interaction with different biological macromolecules. The first layer contained  $\text{CaCl}_2$ , while the second layer had  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.4 M to pH 7.4. (A) Control HAP crystals, without addition of biological macromolecules. (B) Agarose hydrogel, added with  $10 \mu\text{M}$  HSA. (C) Agarose hydrogel, added with  $10 \mu\text{M}$  OPN. (D) Agarose hydrogel, added with  $10 \mu\text{M}$  CSB. (E) Agarose hydrogel, added with  $10 \mu\text{M}$  CSC. Note the inhibition of HAP crystal formation by biological macromolecules in the second layer (C–E). The magnification is the same in all micrographs. The red scale bar corresponds to 1 mm.

(w/v) agarose gel containing 0.4 M of dibasic sodium phosphate was prepared in the same buffer solution. The addition of the second layer of gel (inside the cassette) was performed by using a couple of syringe needles, one of them to avoid the air pressure and the second for introducing the subsequent layer of gel.

## 2.2. In vitro Synthesis of Hydroxyapatite in Silica Hydrogels.

For these experiments, the crystallization cassettes were constructed as it was previously mentioned. The synthesis of crystals was made according to the procedure reported by Villacampa and García-Ruiz in 2000,<sup>34</sup> with the following modifications: the gel was prepared with a sodium silicate solution (Aldrich, 27%  $\text{SiO}_2$ , 14% NaOH), density  $1.06 \text{ g cm}^{-3}$  acidified with a 1 M phosphoric acid solution. The final pH of the gel was 10.42. The polymerization time of the gel ranged between 1 and 2 min. On the gel layer, a solution of 1 M  $\text{CaCl}_2$  was added (Sigma 98%) until the cassette was filled, and later it was sealed with silicone and high vacuum grease to avoid evaporation, allowing the diffusion of the calcium chloride and the phosphoric acid through the matrix of the silica gel. The crystallization cassettes were stored at  $18^\circ\text{C}$  and crystals were formed after approximately seven days. These experiments were made in triplicates.

## 2.3. The Interaction of Biological Macromolecules (Promotion or Inhibition) on the Crystal Growth Process of Hydroxyapatite.

The interaction of biological macromolecules with HAP crystals was evaluated following the same experimental setup as described above. For the agarose and silica hydrogels experiments,  $10 \mu\text{M}$  of either one of the following proteins: OPN (SIGMA-O2260), chondroitin Sulfate “B” (CSB) (SIGMA-C3788), chondroitin sulfate “C” (CSC) (SIGMA-C4384), and HSA (SIGMA-A9511) was added to the  $\text{CaCl}_2$  solutions. All experiments were done three-times and performed at  $18^\circ\text{C}$ .

## 2.4. X-ray Characterization of the Hydroxyapatite Crystals.

Once HAP crystals were obtained, the system was allowed to reach equilibrium for one month. Afterward, crystals were separated, perfectly

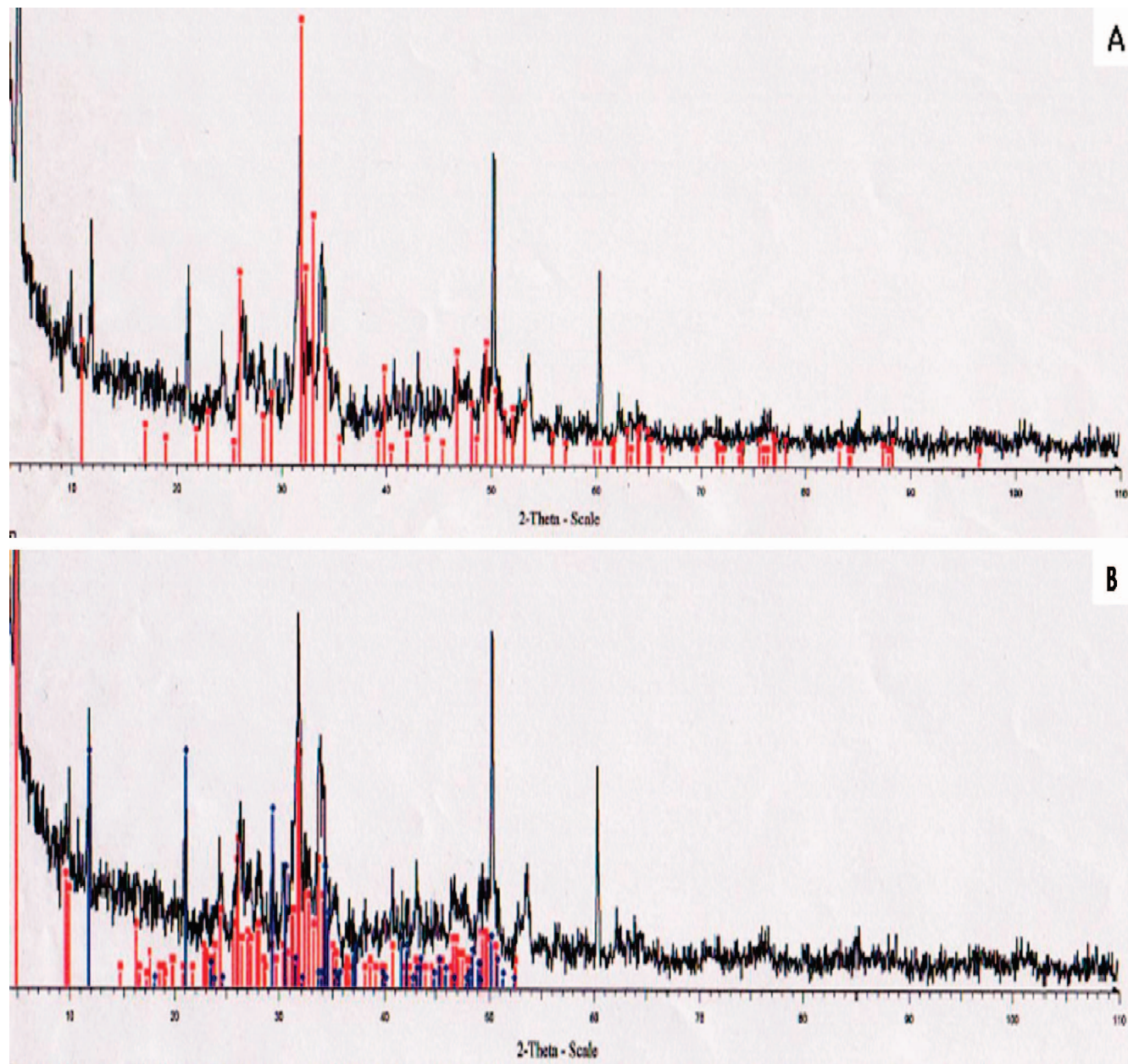
washed with ethanol, and analyzed by X-ray powder diffraction in a Bruker D8 Advance 2-Theta powder X-ray diffractometer installed with a graphite monochromator. Data were collected every 0.5 s.

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Interaction of Biological Macromolecules (Promotion or Inhibition) on the Crystal Growth Process of Hydroxyapatite in Agarose Hydrogels.

From the analysis of the crystal growth process, Figure 1 shows that all crystals of HAP were obtained in the second layer of the gel by counter diffusion of calcium and phosphate ions. The explanation is that calcium ions are smaller and diffuse more easily. These crystals showed a dendrite-like shape and were initially formed in the interface of the two gel layers. When the crystal growth process of HAP is happening (look to the right on each image), the number of crystals is reduced because at the interface the supersaturation settles first and is higher than elsewhere. Figure 1A shows the crystallization of HAP in the absence of any protein (control experiment). In the presence of HSA, HAP crystals grew with a similar morphology as in the control experiment, indicating a null effect on the morphology of crystals (Figure 1B). However, when the experiments were carried out in the presence of OPN (Figure 1C), CSB (Figure 1D), and CSC (Figure 1E), no crystals were formed. Each of these biological macromolecules inhibits the crystal growth of HAP.

The crystals obtained in the control experiment were characterized by X-ray powder diffraction. All showed the typical pattern of characteristic peaks for HAP (Figure 2A), as well as



**Figure 2.** Powder X-ray diffractograms of HAP crystals grown in agarose gels, without biological macromolecules. (A) Typical diffractogram of HAP. (B) Diffractogram showing the characteristic profile of octacalcium phosphate and brushite, precursors of the HAP.

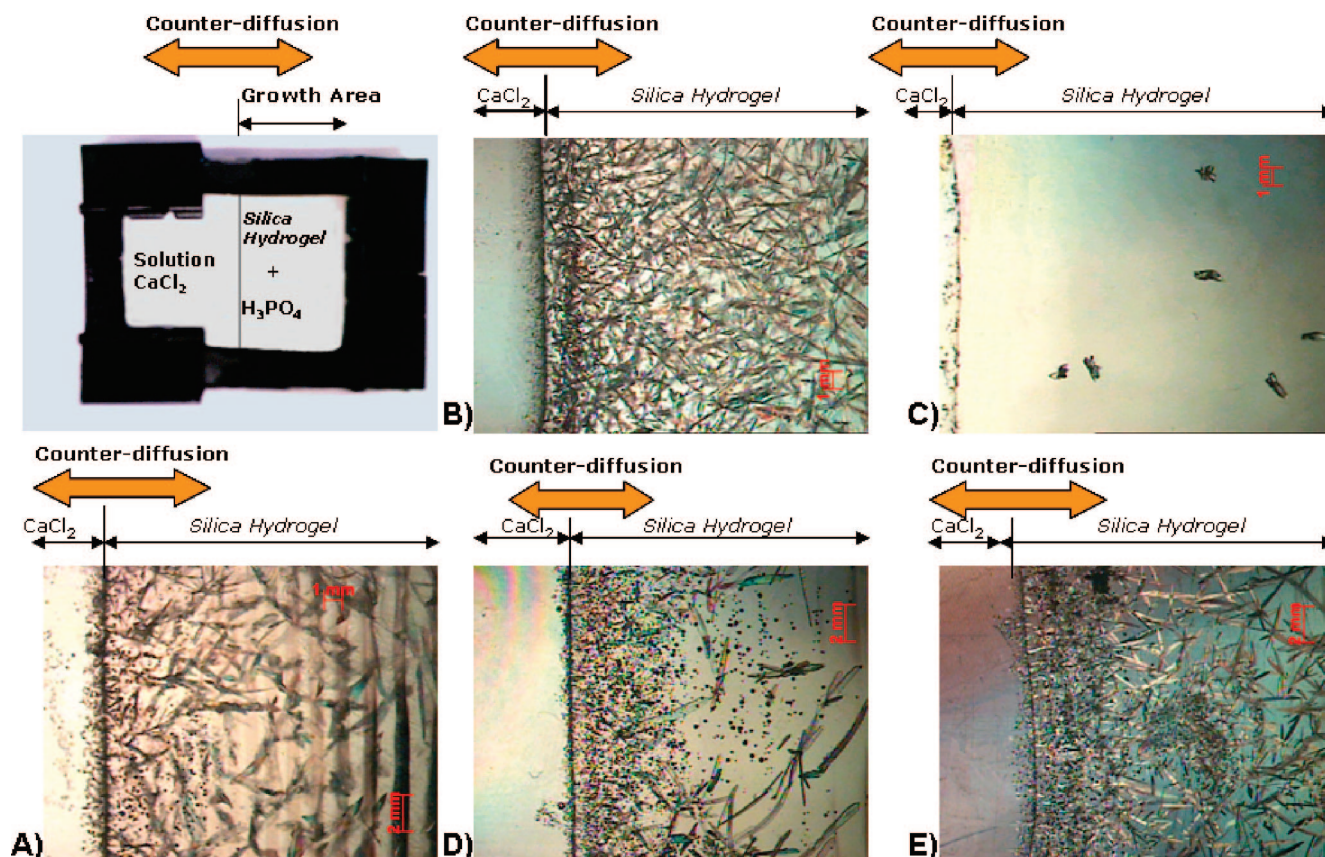
octacalcium phosphate and brushite, which are the common precursors of hydroxyapatite (Figure 2B).

**3.2. Interaction of Biological Macromolecules (Promotion or Inhibition) on the Crystal Growth Process of Hydroxyapatite in Silica Hydrogels.** In the silica hydrogel as well as in the agarose hydrogel system, the formation of the HAP crystals took place in the second layer of the cassette. Interestingly, the crystals in silica hydrogels were bigger than those grown in agarose (Figure 3A). The reason why these crystals of HAP are bigger in silica hydrogels than in agarose is that silica hydrogel has a smaller viscosity. Recently, it has been shown that glasses of the type  $\text{Na}_2\text{O-CaO-SiO}_2$  are materials that favor the formation of HAP crystals. This is because this material interchanges  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  ions with protons in the surrounding fluid, which gives rise to Si-OH groups that induce the nucleation of HAP.<sup>35</sup>  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  also accelerate the nucleation of HAP by increasing the ionic activity of the product.<sup>35</sup> Taking advantage of these features of the silicate matrix, in the diffusive precipitation system used in

this work, we have obtained pure hydroxyapatite by diffusion of  $\text{Ca}^{2+}$  ions through a silica gel tritrated with phosphoric acid at high pH values.

Silica hydrogels show that when HSA was added to the system, no inhibition of the formation of HAP crystals is observed. It is possible to observe the presence of a greater number of crystals in comparison with the control, which suggests that HSA could be acting as a precursor in the formation of HAP crystals (Figure 3B). In the particular case of OPN, the inhibition of the formation of HAP crystals was remarkable since a considerable reduction in the size and number of crystals was observed (Figure 3C). On the contrary, with CSB there was less inhibition in the crystal growth than that observed with OPN (Figure 3D). In the case of CSC, there was no crystal growth inhibition (Figure 3E).

The effect of OPN in both systems, agarose and silica hydrogels, was evident on the inhibition of the HAP crystal



**Figure 3.** Synthesis of HAP crystal in silica hydrogels. The first phase contained 1 M  $\text{CaCl}_2$ ; the second phase silica hydrogel contained phosphate ions. (A) Positive control for HAP crystals with no addition of biological macromolecules. (B) Silica hydrogel added with 10  $\mu\text{M}$  HSA. (C) Silica hydrogel, added with 10  $\mu\text{M}$  OPN. (D) Silica hydrogel added with 10  $\mu\text{M}$  CSB. (E) Silica hydrogel added with 10  $\mu\text{M}$  CSC. Note the remarkable inhibition of HAP crystals formation by OPN added to the system (C). The magnification is the same in all micrographs.

growth. The inhibition of HAP crystal growth by OPN is explained in terms of a phosphorylation process, since OPN phosphate groups are absorbed on the surface of HAP replacing the orthophosphate ions causing a stereochemical effect on the HAP crystal lattice.<sup>36</sup> Recent studies have demonstrated that differences in the phosphorylation of OPN cause inhibition and/or nucleation of HAP crystals.<sup>37</sup> Thus, the importance of these changes in OPN phosphorylation is implied in the regulation of biomineralization processes.

Glycosaminoglycans, CSB and CSC added to the agarose hydrogels showed a considerable inhibition of HAP crystal formation, maybe because their highly charged structure presented a strong chemical union with calcium and phosphate ions. The chemical interaction of HAP with CSB and CSC as well as with the solvent changes the hydrodynamic properties of the solution.<sup>38</sup>

In silica hydrogels CSB did not show the same effect on the inhibition compared to the effect observed with OPN. Surprisingly, CSC produced the opposite effect on the crystal growth of HAP. This promoter effect is probably due to the decrease of gel viscosity and therefore the increase of the diffusion process in the gel matrix.

It has been also reported that chondroitin sulfates act to promote the formation of HAP crystals in collagen gels under physiological conditions.<sup>39</sup> This observation could explain why CSB and CSC promote the HAP crystallization in silica hydrogels but not in agarose hydrogels.

#### 4. Conclusion

By using this experimental setup, the gel method has been demonstrated to be a plausible tool to promote the generation of HAP crystals in well-controlled conditions. According to these results, it can be possible to explain that a better quality of crystals is obtained in silica hydrogels, and the effect of proteins depends on the gel matrix. This study demonstrates that OPN inhibits the formation of HAP crystals in agarose as well as in silica hydrogels. On the other hand, CSB, CSC, and HSA promotes HAP crystallization in silica hydrogels. Our next step will be focused on crystallizing these proteins and glycosaminoglycans and solving their 3D structure via X-ray diffraction. The soaking procedure (diffusion through the structure of protein crystals) of calcium and phosphate ions will permit us to determine the binding sites where these inorganic–protein interactions are taking place.

**Acknowledgment.** One of the authors (A.M.) acknowledges the financial support from CONACYT Project No. 58515. We acknowledge the English and grammar corrections done by Antonia Sanchez-Marin.

#### References

- (1) Lehto, S.; Niskanen, L.; Suhonen, M.; Rönnemaa, T.; Laakso, M. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1996**, *16*, 978–983.
- (2) Mc Gill, H. C.; Infuster, V.; Ross, R.; Topol E. J., Eds. Lippincott Raven: Philadelphia, 1996; Chapter 3, pp 25–41.
- (3) Trion, A.; van der Laarse, A. *Am. Heart J.* **2004**, *147*, 808–814.
- (4) Murata, K.; Motoyama, T. *Artery* **1990**, *17*, 96–106.

- (5) Burleigh, M. C.; Briggs, A. D.; Lendon, C. L.; Davies, M. J.; Born, G. V.; Richardson, P. D. *Atherosclerosis* **1992**, *96*, 71–81.
- (6) Frink, R. J.; Achor, R. W. P., Jr.; Brown, A. L.; Kincaid, O. W.; Brandenburg, R. O. *Am. J. Cardiol.* **1970**, *26*, 241–247.
- (7) Ennever, J.; Vogel, J. J.; Riggan, L. J. *Atherosclerosis* **1980**, *35*, 209–213.
- (8) Hsu, H. H. T.; Camacho, N. C.; Tawfik, O.; Sun, F. *Atherosclerosis* **2002**, *161*, 85–94.
- (9) Hsu, H. H. T.; Tawfik, O.; Sun, F. *Cardiovasc. Pathol.* **2004**, *13*, 3–10.
- (10) Carlström, D.; Engfeldt, B.; Engström, A.; Ringertz, N. *Lab. Invest.* **1953**, *2*, 325–335.
- (11) Boström, K.; Watson, K. E.; Horn, S.; Wortham, C.; Herman, I. M.; Demer, L. L. *J. Clin. Invest.* **1993**, *91*, 1800–1809.
- (12) Robert, M. C.; Lefaucheux, F. *J. Cryst. Growth* **1988**, *90*, 358–367.
- (13) Moradian-Oldak, J. *Matrix Biol.* **2001**, *20*, 293–305.
- (14) Levi-Kalishman, Y.; Falini, G.; Addadi, L.; Weiner, S. *J. Struct. Biol.* **2001**, *135*, 8–17.
- (15) Murayama, E.; Takagi, Y.; Ohira, T.; Davis, J. G.; Greene, M. I.; Nagasawa, H. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 688–696.
- (16) Falini, G.; Fermani, S.; Gazzano, M.; Ripamonti, A. *Chem.-Eur. J.* **1997**, *3*, 1807–1814.
- (17) Fernandez-Diaz, L.; Putnis, A.; Prieto, M.; Putnis, C. V. *J. Sediment. Res. A Sediment. Petrol. Process* **1996**, *66*, 482–491.
- (18) Grassmann, O.; Löbmann, P. *Chem.-Eur. J.* **2003**, *9*, 1310–1316.
- (19) Petrova, R. I.; Swift, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1168–1173.
- (20) Estroff, L. A.; Addadi, L.; Weiner, S.; Hamilton, A. D. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 137–141.
- (21) Orme, C. A.; Noy, A.; Wierzbicki, A.; McBride, M. T.; Grantham, M.; Teng, H. H.; Dove, P. M.; DeYoreo, J. J. *Nature* **2001**, *411*, 775–779.
- (22) Estroff, L. A.; Incarvito, C. D.; Hamilton, A. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2–3.
- (23) Donners, J. J. J. M.; Nolte, R. J. M.; Sommerdijk, N. A. J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9700–9701.
- (24) Cölfen, H.; Qi, L. *Prog. Colloid Polym. Sci.* **2001**, *117*, 200–203.
- (25) Albeck, S.; Aizenberg, J.; Addadi, L.; Weiner, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11691–11697.
- (26) Fu, G.; Valiyaveetil, S.; Wopenka, B.; Morse, D. E. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1289–1298.
- (27) Henisch, H. K. *Crystals in Gels and Liesegang Rings*; Cambridge University Press: New York, 1988; Chapter 5, pp 116–137.
- (28) Fialkowski, M.; Campbell, C. J.; Bensemann, I. T.; Grzybowski, B. A. *Langmuir* **2004**, *20*, 3513–3516.
- (29) Garcia-Ruiz, J. M.; Gavira, J. A.; Otálora, F.; Guasch, A.; Coll, M. *Mater. Res. Bull.* **1998**, *33*, 1593–1598.
- (30) Silverman, L.; Boskey, A. L. *Calcif. Tissue Int.* **2004**, *75*, 494–501.
- (31) Beshensky, A. M.; Wesson, A. J.; Worcester, E. M.; Sorokina, E. J.; Snyder, C. J.; Kleinman, J. G. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2001**, *12*, 2108–2116.
- (32) Hunter, G. K.; Goldberg, H. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 8562–8565.
- (33) Eiden-Assmann, S.; Viertelhaus, M.; Heiss, A.; Hoetzer, K. A.; Felsche, J. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *91*, 481–486.
- (34) Villacampa, A. I.; Garcia-Ruiz, J. M. *J. Cryst. Growth* **2000**, *211*, 111–115.
- (35) Kokubo, T. *Anal. Quím. Int.* **1997**, *93*, S49–55.
- (36) Shimabayashi, S.; Uno, T. *Crystal Growth of Calcium Phosphates in the Presence of Polymeric Inhibitors. Calcium Phosphates in Biological and Industrial Systems*; Kluwer Academic Publishers: Boston, 1998; Chapter 9, pp 193–216.
- (37) Gericke, A.; Qin, C.; Spevak, L.; Fujimoto, Y.; Butler, W. T.; Sorensen, E. S.; Boskey, A. L. *Calcif. Tissue Int.* **2005**, *77*, 45–54.
- (38) Hunter, G. K.; Allen, B. L.; Grynopas, M. D.; Cheng, P. T. *Biochem. J.* **1985**, *228*, 463–469.
- (39) Gafni, G.; Septier, D.; Goldberg, M. *J. Cryst. Growth* **1999**, *205*, 618–623.

CG7011414



## Osteopontin overexpression in atherogenesis and its role in the development of vascular calcification

Journal:	<i>Journal of Cellular Biochemistry</i>
Manuscript ID:	JCB-09-0409
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	05-Aug-2009
Complete List of Authors:	<p>Jiménez-Corona, Azucena; Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Química</p> <p>Damián-Zamacona, Salvador; Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Fisiología Celular</p> <p>Pérez-Torres, Armando; Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina</p> <p>Moreno, Abel; Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Química</p> <p>Mas-Oliva, Jaime; Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Fisiología Celular</p>
Keywords:	OSTEOPONTIN, VASCULAR CALCIFICATION, ATHEROSCLEROSIS, OXIDISED LOW DENSITY LIPOPROTEINS, OXIDATIVE STRESS





**Osteopontin overexpression in atherogenesis and its role in the development of vascular calcification.**

AZUCENA E. JIMÉNEZ-CORONADO, ROSALVADOR DAMIÁN-ZAMORA, ROMÁN ANDRÉS PÉREZ-TORRES

ABEL MORENO, AND JAIME MAS-OLIVA

<sup>A</sup>*Instituto de Química,*

<sup>B</sup>*Instituto de Fisiología Celular,*

<sup>C</sup>*Facultad de Medicina,*

*Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, C.U. 04510 México, D.F., México.*

**KEY WORDS:** OSTEOPONTIN, VASCULAR CALCIFICATION, ATHEROSCLEROSIS, OXIDISED LOW DENSITY LIPOPROTEINS, OXIDATIVE STRESS.

\*CORRESPONDING AUTHOR:

JAIME MAS-OLIVA M.D., PH.D.

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

APDO. POSTAL 70-243,

CIRCUITO EXTERIOR C.U.

04510 MÉXICO, D.F.

PHONE: +52 55-56225584

FAX: +52-55-56225611

E-MAIL: JMAS@IFC.UNAM.MX

**ABSTRACT**

OSTEOPONTIN (OPN) IS A HIGHLY PHOSPHORYLATED SIALOPROTEIN AND A PROMINENT COMPONENT OF MINERALISED EXTRACELLULAR MATRICES OF BONES AND TEETH. OPN IS CHARACTERIZED BY THE PRESENCE OF A POLYASPARTIC ACID SEQUENCE, SEVERAL PHOSPHORYLATION SITES (SER/THR) AND HYDROXYAPATITE BINDING AND A HIGHLY CONSERVED ARGinine-GLYCINE-ASPARTATE MOTIF WHICH MEDIATES CELL ATTACHMENT/SIGNALLING. ALTHOUGH FROM A STRUCTURAL POINT OF VIEW IT IS STARTING TO BE ELUCIDATED, THE ROLE OF OPN OVEREXPRESSION IN TISSUES AWAY FROM BONES AND TEETH IS STILL POORLY UNDERSTOOD. IN THIS STUDY, EMPLOYING AN ANIMAL MODEL OF HYPERCHOLESTEROLEMIC RABBITS, WE ANALYSED THE OVEREXPRESSION OF OPN AT THE SITE OF ATHEROSCLEROTIC PLAQUES AND ITS RELATIONSHIP WITH THE PROCESS OF VASCULAR CALCIFICATION. USING IMMUNOHISTOCHEMICAL AND WESTERN BLOT ANALYSIS, THE OVEREXPRESSION OF OPN WAS DEMONSTRATED IN AORTAS OF RABBITS FEED A HIGH CHOLESTEROL DIET. THE ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF THESE RABBITS THROUGH TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY AND THE DETECTION OF HYDROXYAPATITE PHOSPHATE PRECIPITATES EMPLOYING HISTOCHEMICAL SPECIFIC TECHNIQUES SUGGEST THAT OPN MAY BE FUNCTIONALLY IMPORTANT AS A REGULATOR OF VASCULAR CALCIFICATION. THIS IS PARTICULARLY INTERESTING WHEN OPN IS DRAMATICALLY OVEREXPRESSED BY SMOOTH MUSCLE CELLS IN THE PRESENCE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES AT THE NEOINTIMA OF ATHEROSCLEROTIC LESIONS. ALREADY REPORTED BY *in vivo* EXPERIMENTATION, THIS STUDY PROVIDES EVIDENCE THAT OPN INHIBITS THE NUCLEATION OF HYDROXYAPATITE AND THEREFORE PLAYS AN IMPORTANT ROLE IN REGULATING THE DEVELOPMENT OF VASCULAR CALCIFICATION DURING OXIDATIVE STRESS.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

VASCULAR CALCIFICATION (VC) IS DEFINED AS AN INAPPROPRIATE DEPOSITION OF CALCIUM PHOSPHATE IN CARDIOVASCULAR STRUCTURES, SUCH AS BLOOD VESSELS AND VALVES. VC IS COMMONLY OBSERVED IN ATHEROSCLEROSIS AND DIABETES, AND IT IS CONSIDERED TO BE A MAJOR PROBLEM IN PATIENTS WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE [LONDON ET AL., 2003; WAYHS ET AL., 2003].

THE EXTRACELLULAR MATRIX (ECM) REGULATES MANY PHYSIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL PROCESSES [ADAMS AND WATT, 1993] AND IN THE PHYSIOLOGICAL PROCESS OF BONE DEVELOPMENT, SPECIFIC ECM COMPONENTS ARE PRODUCED TO CREATE A UNIQUE MICROENVIRONMENT. DURING THE PRECIPITATION OF CALCIUM AND PHOSPHATE IONS AS HYDROXYAPATITE MINERAL PHASE [SOLURSH, 1991]. SIMILARLY, IN THE PATHOLOGICAL CONDITION OF ATHEROSCLEROSIS, THE ECM CHANGES ACCOMPANY THE DEVELOPMENT OF ATHEROMA PLAQUES [CANFIELD ET AL., 1999; REKHTER, 1999]. SINCE VC IS WIDESPREAD IN ADVANCED ATHEROSCLEROSIS AND SHARES MANY HISTOLOGICAL FEATURES WITH BONE DEVELOPMENT [WATSON ET AL., 1998], THESE OBSERVATIONS [MOHLER ET AL., 2001] LED US TO HYPOTHESIZE THAT THE DEVELOPMENT OF VASCULAR CALCIFICATION MAY BE REGULATED IN A SIMILAR MANNER TO THAT FOUND DURING BONE DEVELOPMENT. THIS HYPOTHESIS IS SUPPORTED BY FINDINGS OF FITZPATRICK AND CO-WORKERS IN THE RAT HEART, WHERE ENDOCHONDRAL CALCIFICATION CARRIED OUT BY CHONDROCYTES TAKE UP AND EXPRESS TO TYPES II, X, AND PRO-I COLLAGEN, COMMON PROTEINS IN BONE FORMATION [FITZPATRICK ET AL., 2003].

SEVERAL *in vitro* STUDIES HAVE SHOWN THAT SMOOTH MUSCLE CELLS (SMC) DEFICIENT IN OPN PRESENT AN ENHANCED SUSCEPTIBILITY TO CALCIFICATION [GIACHELLI ET AL., 1993; FITZPATRICK ET AL., 2005]. WHEN PRESENT IN AGAROSE AND SILICA HYDROGELS, WE HAVE DEMONSTRATED THAT OPN INHIBITS THE CRYSTAL GROWTH OF HYDROXYAPATITE [FITZPATRICK ET AL., 2005]. IN CONTRAST TO FIBRONECTIN AND TYPE I COLLAGEN THAT PROMOTE CALCIFICATION [FITZPATRICK ET AL., 1998]. BINDING OF OPN TO INTEGRIN RECEPTORS THROUGH THE HIGHLY CONSERVED RGD

1  
2  
3 BEEN SHOWN TO PROMOTE CELL ADHESION, CHEMOTAXIS, AND SIGNAL TRANSDUCTION  
4  
5 CELL TYPES [LIAW ET AL., 1994]. THIS COMBINATION OF ECM EFFECTS AND INTERCELLULAR  
6  
7 SUGGEST THAT OPN MAY ALSO PLAY AN IMPORTANT ROLE IN TISSUE REPAIR. MOREOVER  
8  
9  
10 STUDIES HAVE DEMONSTRATED A CLOSE ASSOCIATION OF LIPIDS WITH THE PHENOMENON OF  
11  
12 CALCIFICATION IN ATHEROSCLEROTIC LESIONS. IN THIS SENSE, TOWLER AND CO-WORKERS  
13  
14 HYPERLIPIDEMIA IN LOW DENSITY LIPOPROTEIN (LDL)-RECEPTOR KNOCKOUT MICE FED A  
15  
16 WAS ASSOCIATED WITH ACTIVE INDUCTION OF VASCULAR CALCIFICATION [TOWLER ET AL., 2000].  
17  
18 THESE EXPERIMENTAL ANIMALS PRESENT A HIGH CONCENTRATION OF MODIFIED LDL IN  
19  
20 CIRCULATION, A RANGE OF RECEPTORS COLLECTIVELY NAMED SCAVENGER RECEPTORS  
21  
22 AND INTERNALIZE EXCESS LIPID ARE UP REGULATED AND ASSOCIATED TO THE INITIATION OF  
23  
24 STRESS PROCESS [AGUILAR-GAYTAN AND MAS-OLIVA, 2003; MANZANO-LEON ET AL., 2006].

25  
26 THESE RECEPTORS ARE ABLE TO BIND CHEMICALLY OXIDISED LDL (OXLDL), METALLOPROTEINASES,  
27  
28 BOVINE SERUM ALBUMIN (BSA), *solium* PARAMYOSIN [GUADERRAMA-DIAZ ET AL., 2005],  
29  
30 LYINOSINIC ACID, POLYGUANOSINIC ACID, POLYSACCHARIDES SUCH AS DEXTRANS, CHONDROITIN  
31  
32 FUCOIDIN, LIPOTEICHOIC ACID (LTA), LIPOPOLYSACCHARIDE (LPS), ADVANCED GLYCOSYLATION  
33  
34 PRODUCTS (AGE) AND AMYLOID  $\beta$ , AS WELL AS A DIVERSE VARIETY OF LIPID AND LIPOPROTEIN-  
35  
36 BASED LIGANDS [DE WINTER ET AL., 2000; MANZANO-LEON ET AL., 2006; PETERSON ET AL., 1996].  
37  
38 MIETUS-SNYDER AND CO-WORKERS REPORTED THAT CHEMICALLY OXIDISED LDL'S UPTAKE BY  
39  
40 INCREASES SMC SR-A ACTIVITY [MIETUS-SNYDER ET AL., 2000] INDUCES UP-REGULATION OF SR-A  
41  
42 MRNA LEVELS AND INCREASES 30-FOLD THE UPTAKE OF MODIFIED LIPOPROTEINS BY SMC. THIS  
43  
44 GENE EXPRESSION MEDIATED BY CELL-MODIFIED LDL RESULTED FROM INCREASED LEVELS OF  
45  
46 SENSITIVE TRANSCRIPTION FACTORS SUCH AS AP-1/C-JUN, C/EBPB AND JNK ACTIVITY [MIETUS-SNYDER  
47  
48 ET AL., 2000]. THESE TRANSCRIPTION FACTORS ARE IMPORTANT FOR SMC SR-A UP-REGULATION.

1  
2  
3 BY PHORBOL ESTERS AND REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) [MIETUS-SNYDER ET AL., 1998  
4  
5 B TYPE RECOGNISES DIVERSE LIGANDS INCLUDING COLLAGEN, FATTY ACIDS, ANIONIC  
6  
7 THROMBOSPONDIN, APOPTOTIC CELLS, NATIVE LDL, OXLDL, HDL AND VERY LOW  
8  
9 LIPOPROTEINS (VLDL) [CALVO ET AL., 1998; RIGOTTI ET AL., 1995]. THE SR-E TYPE HAS CUR  
10  
11 BEEN ASSOCIATED TO A LECTIN-LIKE OXIDISED LDL RECEPTOR (LOX-1). LOX-1 WAS OR  
12  
13 IDENTIFIED AS AN ENDOTHELIAL-SPECIFIC SCAVENGER RECEPTOR; HOWEVER, IT CAN I  
14  
15 MACROPHAGES, SMC AND PLATELETS [CHEN ET AL., 2002]. AOYAMA ~~REPORTED WORKERS~~  
16  
17 LOX-1 MEDIATES THE ACTION OF OXLDL UP-REGULATING THE EXPRESSION OF LOX-1, IN  
18  
19 THE EXISTENCE OF A POSITIVE FEEDBACK LOOP BETWEEN THE UPTAKE OF OXLDL, AND TH  
20  
21 OF LOX-1 IN ENDOTHELIAL CELLS [AOYAMA ET AL., 1999].  
22  
23  
24  
25  
26

27 TOGETHER WITH THE MODULATION OF SEVERAL PROTEINS DIRECTLY RELATED TO  
28  
29 STRESS CONDITION, BASED ON OUR RESULTS WE PROPOSE OPN AS A KEY COMPONENT  
30  
31 SMOOTH MUSCLE AND ENDOTHELIAL CELLS ASSOCIATED TO AN UP REGULATORY PROC  
32  
33 OXIDATIVE STRESS. THROUGH THIS PROCESS, OVEREXPRESSION OF OPN IN THE ATHEROSC  
34  
35 CAN BE STRIKINGLY ASSOCIATED TO THE INHIBITION OF THE FORMATION OF CALCIUM  
36  
37 TISSUE. THESE DATA IMPLICATE OPN AS A POTENTIALLY IMPORTANT UP-REGULATED MED  
38  
39 PROTECT AGAINST THE DYSTROPHIC CALCIFICATION OF THE ARTERIAL NEOINTIMA, I  
40  
41 COLLAGEN AND ELASTIN THAT COULD BE CONSIDERED AS INDUCTORS OF MINERAL NUCL  
42  
43  
44  
45  
46

## 47 MATERIALS AND METHODS

---

### 49 EXPERIMENTAL ANIMALS

50 MALE NEW ZEALAND WHITE RABBITS ( $\pm 1.5$  KG) WERE PLACED IN INDIVIDUALS STAINLESS  
51  
52 IN A ROOM WITH CONTROLLED ENVIRONMENTAL CONDITIONS (TEMPERATURE 18-22  
53  
54 50% AND A 12 TO 12 H ARTIFICIAL LIGHT/DARK CYCLES). ALL ANIMALS WERE HO  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 ACCLIMATIZATION IN THE LABORATORY FOR 10 DAYS BEFORE INITIATION OF THE  
4  
5 EXPERIMENTATION REPORTED WITH ANIMALS FOLLOWED RECOMMENDATION FROM THE  
6  
7 HELSINKI AND THE GUIDING PRINCIPLES IN THE CARE AND USE OF ANIMALS.  
8  
9

10 ANIMAL FEEDING WAS CARRIED-OUT USING A WELL-BALANCED COMMERCIAL FEED (F  
11  
12 COMPOSED OF 14.4% TOTAL PROTEIN, 2.7% LIPID, 21.10% CELLULOSE, 43.20% CARBOHYD  
13  
14 8.40% ASH, 1.14% CALCIUM AND 0.58% PHOSPHORUS. CHOLESTEROL ADDED FEED WAS PR  
15  
16 USING THE KRITCHEVSKY METHOD [KRITCHEVSKY ET AL., 1962] BY MIXING 2% CHOLESTE  
17  
18 C-8503) AND 10% CORN OIL WITH REGULAR FEED. THE ADMINISTRATION OF THIS DIET WAS  
19  
20 FOR A PERIOD OF AT LEAST THREE MONTHS, PROVIDING WATER AND NESTING WAS  
21  
22 PRACTICED WITH AN INTRAVENOUS INJECTION OF SODIUM PENTOBARBITAL (70 MG/KG OF  
23  
24 THROUGH A MEDIAN LONGITUDINAL INCISION, THE THORACIC AND PERITONEAL CA  
25  
26 EXPERIMENTAL ANIMALS WERE EXPOSED AND THE COMPLETE AORTA WAS DISSECTED F  
27  
28 VALVE DOWN TO THE AORTIC BIFURCATION. ADIPOSE AND CONNECTIVE TISSUES WERE  
29  
30 THE EXTERNAL SURFACE OF THE AORTA. IMMEDIATELY, A LONGITUDINAL CUT OF THE A  
31  
32 AND SCRAPING OF THE ENDOTHELIUM CARRIED OUT. THIS TISSUE WAS WEIGHTED AND H  
33  
34 ICE-COLD LYSIS BUFFER (1:20 W/V) CONTAINING 50 MM TRIS-HCL, 0.15 M NA CL, 1% TRITON  
35  
36 100, 0.25% SODIUM DEOXYCHOLATE, 1  $\mu$ G/ML LEUPEPTIN, 10  $\mu$ G/ML APROTININ, 1 MM PMS  
37  
38 0.5 MM SODIUM ORTHOVANADATE, 1 MM BENZAMIDINE AND 1 MM EDTA, AT PH 8.0. AN ALI  
39  
40 OF EACH HOMOGENATE WAS USED TO DETERMINE PROTEIN CONCENTRATION USING THE  
41  
42 ACID METHOD (PIERCE).  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

## 50 51 52 **WESTERN BLOT ANALYSIS**

53  
54 PROTEINS CONTAINED IN THE HOMOGENATES OF THE CONTROL AND TREATED RABBITS W  
55  
56 USING 12% SDS POLYACRYLAMIDE GELS UNDER REDUCING CONDITIONS. AFTER ELECTRO  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 WERE TRANSFERRED INTO PVDF MEMBRANES (BIO-RAD LABORATORIES) AT 20 VOLTS DURING  
4  
5  
6 PVDF MEMBRANES WERE BLOCKED WITH 4% BOVINE SERUM ALBUMIN (BSA) IN A BUFFER  
7  
8 CONTAINING 0.1 M TRIS-HCL, 0.15 M NAACL, 0.1% TWEEN-20, PH 7.5 (TBST) AT ROOM  
9  
10 TEMPERATURE (RT) FOR 1 H. AFTERWARDS, MEMBRANES WERE WASHED TWICE WITH  
11  
12 INCUBATED OVERNIGHT WITH THE PRIMARY MOUSE ANTIBODY ANTI-OPN DEVELOPED IN  
13  
14 (07635) USING A 1:500 DILUTION. MEMBRANES WERE WASHED FOUR TIMES (15 MIN) USING  
15  
16 TBST AND INCUBATED WITH A HORSERADISH PEROXIDASE (HRP)-CONJUGATED ANTI-  
17  
18 SECONDARY ANTIBODY (1:10000; SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC) AT RT FOR 1 H. AFTER  
19  
20 EIGHT TIMES (15 MIN) WITH TBST, MEMBRANES WERE DEVELOPED BY ENHANCED  
21  
22 CHEMILUMINESCENCE USING A SUPER SIGNAL KIT ACCORDING TO MANUFACTURER'S  
23  
24 (PIERCE). RECOMBINANT MOUSE OPN (SIGMA-02260) WAS USED IN ALL EXPERIMENTS AS A  
25  
26 POSITIVE CONTROL.  
27  
28  
29  
30  
31

### 32 **IMMUNOHISTOCHEMICAL PROCEDURES**

33  
34  
35 AORTA OF CONTROL AND EXPERIMENTAL RABBITS WERE COLLECTED AT NECROPSY EMPLOYING  
36  
37 FRAGMENTS AND FIXED WITH 10% BUFFERED NEUTRAL FORMALIN DURING 24 H BEFORE BLEEDING  
38  
39 FOR PARAFFIN EMBEDDING AND SECTIONING. TISSUE SECTIONS OF AORTAS OF 6-8  $\mu$ M THICKNESS  
40  
41 OBTAINED, MOUNTED ON POLY-L-LYSINE-COATED SLIDES AND STAINED WITH HEMATOXYLIN AND  
42  
43 THE VON KOSSA METHOD (FOR BONE AND MINERAL SALTS OF CALCIUM AS PHOSPHATES AND  
44  
45 AND OXALATES) AND THE ALIZARIN RED S PROCEDURE (FOR CALCIUM SALTS) WERE ADOPTED  
46  
47 ACCORDING TO PROTOCOLS FROM THE ARMED FORCES INSTITUTE OF PATHOLOGY [JOHNSON,  
48  
49 JOHNSON, 1992].  
50  
51  
52

53  
54 AORTA SECTIONS PREPARED FOR IMMUNOHISTOCHEMISTRY WERE MOUNTED ON POSITIVE  
55  
56 SLIDES (SHANDON INC.), DEWAXED WITH XYLENE, REHYDRATED WITH PBS AND THEN TRIPLENED  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 PLASTIC COPLIN JARS CONTAINING 0.1 M CITRATE BUFFER (PH 6.0) FOR ANTIGEN RETRIEVAL  
4  
5 BY SHI ET AL [SHI ET AL., 1993]. IN BRIEF, SLIDES WERE HEATED WITHIN THE COPLIN JAR IN  
6  
7 COOKER FOR 20 MIN AT THE HIGHEST TEMPERATURE OF APPROXIMATE (200) AND 10  
8  
9 MORE MINUTES AT AN INTERMEDIATE TEMPERATURE (100). AFTERWARDS, SLIDES  
10  
11 REMAINED IN THE COPLIN JAR FOR 15 MIN AT RT AND TRANSFERRED TO 0.15 M PBS (PH 7.4)  
12  
13 REQUIRED.

14  
15  
16  
17 AFTER ANTIGEN RETRIEVAL, ENDOGENOUS PEROXIDASE WAS INHIBITED BY INCUBATION WITH  
18  
19 PEROXIDE HYDROGEN DILUTED IN METHANOL DURING 30 MIN AT RT. SLIDES WERE THEN  
20  
21 DURING 1 H AT RT IN PBS-2% BSA-0.01% TRITON X-100 SOLUTION TO REDUCE NON-SPECIFIC  
22  
23 BACKGROUND STAINING. THIS PROCEDURE WAS FOLLOWED BY OVERNIGHT INCUBATION WITH  
24  
25 SPECIFIC ANTI-OPN (MOUSE MONOCLONAL ANTIBODY IGG) DILUTED 1:100 IN PBS-0.1% BSA-0.01%  
26  
27 AFTER THREE WASHES IN PBS, SLIDES WERE INCUBATED IN BIOTINYLATED-ANTI-MOUSE  
28  
29 ANTIBODY FOR 1 H AT RT. THE AVIDIN-BIOTIN-HRP COMPLEX WAS USED AND THE STAINING  
30  
31 DEVELOPED WITH 3'3'DIAMINOBENZIDINE ACCORDING TO SUPPLIER'S INSTRUCTIONS (DAKO)  
32  
33 FROM SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC). NEGATIVE CONTROLS CONSISTED OF TISSUE  
34  
35 PROCESSED AS MENTIONED ABOVE BUT INCUBATED WITH NORMAL MOUSE SERUM.

### 42 TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY

43  
44 TWO-MM THICKNESS TISSUE FRAGMENTS OF AORTA SPECIMENS, INCLUDING THE THREE  
45  
46 OBTAINED DURING NECROPSY AND IMMEDIATELY FIXED BY IMMERSION IN 2.5% GLUTARALDEHYDE  
47  
48 DILUTED IN A 0.2 M CACODYLATE BUFFER (PH 7.4) FOR 3 H AT 4°C. AFTER THREE WASHES  
49  
50 EACH, AORTA FRAGMENTS CONTAINED IN 0.15 M CACODYLATE BUFFER (PH 7.4) AT 4°C WERE  
51  
52 WITH 1% OSMIUM TETROXIDE IN 0.2 M CACODYLATE BUFFER (PH 7.4) FOR 2 H AT 4°C, DEHYDRATED  
53  
54 IN GRADUALLY INCREASING CONCENTRATIONS OF ETHANOL AND TRANSFERRED TO ABSOLUTE  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 CHANGES 10 MIN EACH). INFILTRATION WAS DONE WITH ARALDITE 6005-TOLUENE SOL  
4  
5 DURING 24 H AT RT AND THEN IN PURE ARALDITE 6005 (TWO CHANGES AT 60°C) FOR 2 H. SP  
6  
7 WERE EMBEDDED IN PURE ARALDITE 6005 AT 60°C FOR 36 H. ULTRATHIN SECTIONS OBTAIN  
8  
9 DIAMOND KNIFE AND CONTRASTED WITH URANYL ACETATE AND LEAD CITRATE WERE  
10  
11 ZEISS EM-109 ELECTRON MICROSCOPE.  
12  
13  
14

### 16 PREPARATION OF LIPOPROTEINS

17  
18 THE LDL FRACTION (DENSITY: 1.019-1.063G/ML) WAS ISOLATED BY SEQUENT  
19  
20 ULTRACENTRIFUGATION FROM HUMAN PLASMA. LDL WAS OXIDATIVELY MODIFIED BY EX  
21  
22  $\mu$ M CUSQ IN PHOSPHATE-BUFFERED SALINE (PBS) WITHOUT CALCIUM AND MAGNESIUM F  
23  
24 20 H AT 37°C AS PREVIOUSLY DESCRIBED [SAWAMURA ET AL., 1997]. LABELLING OF LDL W  
25  
26 DIOCTADECYL-3,3,3'-TETRAMETHYLINDOCARBOCYANINE PERCHLORATE (DII) (MOLEC  
27  
28 EUGENE, OR) WAS PERFORMED AS PREVIOUSLY DESCRIBED, AND FURTHER ACETYLA  
29  
30 OXIDISED AS DESCRIBED [DEJAGER ET AL., 1993; PITAS ET AL., 1981]. LDL WERE ALSO OXI  
31  
32 *vitro* WITH 10 $\mu$ M CUSQ FOR 6 H AT 37°C AND OXIDATION STOPPED BY ADDING EDTA. OXLDI  
33  
34 WERE DIALYSED AGAINST 150 MM NA CL CONTAINING AND STORED AT 4°C.  
35  
36  
37  
38  
39  
40

### 42 CELL CULTURE

43  
44 THE T/G HA-VSMC HUMAN CELL LINE OBTAINED THROUGH ATCC (CRL-1999) WAS DEVELO  
45  
46 FROM THE AORTA OF A HEALTHY FEMALE. VSMC WERE MAINTAINED IN F12K MEDIA CONT  
47  
48 MG/ML ASCORBIC ACID; 0.01 MG/ML INSULIN; 0.01 MG/ML TRANSFERRIN; 10 NG/ML SOD  
49  
50 SELENITE; 0.03 MG/ML ENDOTHELIAL CELL GROWTH SUPPLEMENT (ECGS); FETAL BOVINE S  
51  
52 FINAL CONCENTRATION OF 10%, HEPES TO A FINAL CONCENTRATION OF 10 MM, TES TO  
53  
54 CONCENTRATION OF 10 MM, 100 U/ML PENICILLIN, 100 U/ML STREPTOMYCIN AND 0.0  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 AMPHOTERICIN B. CELLS WERE INCUBATED IN A HUMIDIFIED ENVIRONMENT AT 37  
4  
5  
6 ATMOSPHERE OF 95% AIR AND 5% CO

### 9 10 **INTERNALIZATION ASSAYS AND OXIDATIVE STRESS MEASUREMENTS**

11 T/G HA-VSMC WAS GROWN FOR 2–3 WEEKS PRIOR TO THE EXPERIMENT CONTROLLING DEN  
12  
13 10,000 CELLS/CM<sup>2</sup> PROTEIN INTERNALIZATION AND OXIDATIVE STRESS ASSAYS WERE PER  
14  
15 ADDING 2.5 μG/ML OX/ACLDL AND 6-CARBOXY-DIEFA FOR 5 H AT 37°C AND 5% NO  
16  
17 SERUM AND SUPPLEMENTS-FREE MEDIUM [AGUILAR-GAYTAN AND MAS-OLIVA, 2003; INN  
18  
19 AL., 1986]. CELLS WERE STUDIED EMPLOYING A CONFOCAL MICROSCOPE (OLYMPUS FLUOV  
20  
21 λ EXCITATION FOR 6-CARBOXY-DIEFA (488NM) AND DII (543NM). EMISSION 519NM AND  
22  
23 569NM RESPECTIVELY.  
24  
25  
26  
27  
28  
29

### 30 **IMMUNOBLOTS**

31  
32 CELLS WERE TREATED DURING 5 H WITH 2.5 μG/ML OF OXLDL AND ACLDL IN SERUM-FRE  
33  
34 AFTER INTERNALIZATION ASSAYS, CELLS WERE WASHED TWICE WITH PBS AND LYSED FOR  
35  
36 IN LYSIS BUFFER (150 MM NA CL, 10 MM TRIS, PH 7.4, 1% TRITON X-100, 0.5% NP40, 1 MM  
37  
38 EDTA, 1 MM EGTA, 0.2 MM SODIUM ORTHOVANADATE, 10 MM BENZYLAMMONIUM CHLORIDE,  
39  
40 LEUPEPTIN, 10 μG/ML APROTININ, AND 50 mM DTT). LYSED CELLS WERE CENTRIFUGED AT 1500G  
41  
42 FOR 10 MIN AT 4°C AND THE SUPERNATANT RECOVERED. PROTEIN CONCENTRATION WA  
43  
44 USING THE MICRO-BCA PROTEIN ASSAY (PIERCE, ROCKFORD, IL) AND A 5 μM PROBI (30  
45  
46 THE TOTAL PROTEIN FRACTION WERE ANALYZED BY SDS-PAGE ON 10% GELS AND FURTHER  
47  
48 TO PVDF MEMBRANE (BIO-RAD, HERCULES, CA). MEMBRANES WERE BLOCKED 1 HR AT 37°C  
49  
50 A BLOCKING BUFFER CONTAINING 0.1 M TRIS-HCL, 0.15 M NA CL AND 0.5% TWEEN-20, PH  
51  
52 (TBST) WITH 5% BSA. AFTERWARDS, MEMBRANES WERE INCUBATED OVERNIGHT WITH TH  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 MOUSE ANTIBODY ANTI-OPN DEVELOPED IN THE GOAT (SIGMA-07635) USING A 1:2500 DILU  
4  
5 4°C. MEMBRANES WERE WASHED FOUR TIMES (15 MIN) USING BLOCKING BUFFER AND I  
6  
7  
8 WITH HRP-CONJUGATED ANTI-GOAT IGG SECONDARY ANTIBODY (1:10000; SANTA  
9  
10 BIOTECHNOLOGY, INC) AT RT FOR 1 H. AFTER WASHING EIGHT TIMES (15 MIN) WITH  
11  
12 MEMBRANES WERE SUBJECTED TO TREATMENT WITH AN ECL PLUS KIT ACCORDING TO T  
13  
14 INSTRUCTIONS IN ORDER TO DEVELOP CHEMILUMINESCENCE. RECOMBINANT MOUSE O  
15  
16 O2260) WAS USED IN ALL EXPERIMENTS AS POSITIVE CONTROL. THE SAME MEMBRANES W  
17  
18 AND BLOCKED OVERNIGHT AT RT WITH A SOLUTION CONTAINING 5% FAT-FREE MILK AND  
19  
20 IN TRIS-BUFFERED SALINE (TBS), PH 7.6. THE FOLLOWING ANTIBODIES EACH DILUTED 1:5  
21  
22 USED: MONOCLONAL ~~ALACIN~~ AND SECONDARY ANTIBODY CONSISTED OF A HRP-CONJUGAT  
23  
24 ANTI-MOUSE IGG. SECONDARY ANTIBODY WAS USE EMPLOYING 1:5000 DILUTION AND WAS  
25  
26 FOR 1 H AT 37 IN BLOCKING BUFFER. MEMBRANES WERE WASHED WITH 1% TBS-TWEEN,  
27  
28 HRP ACTIVITY DETECTED USING THE ECL PLUS KIT ACCORDING TO SUPPLIER'S INSTRUCTIO  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35

## 36 RESULTS

---

### 37 38 DETECTION OF OPN IN THE ATHEROSCLEROTIC PLAQUE

39  
40 OPN IS THE MAJOR PHOSPHOPROTEIN SECRETED BY OSTEOBLASTS [GIACHELLI ET AL.  
41  
42 SYNTHESIZED AT HIGH LEVELS IN A NUMBER OF TRANSFORMED CELLS [SENGER ET AL., 19  
43  
44 POSTTRANSDUCTIONAL MODIFICATIONS AS WELL AS ITS GENERAL ACIDIC NATURE,  
45  
46 ANOMALOUS MIGRATION PATTERNS ON SDS-PAGE GELS. MOREOVER, THE APPARENT  
47  
48 WEIGHT OF OPN VARIES FROM 31 TO 65 KDA DEPENDING ON THE TISSUE FROM WHICH TH  
49  
50 HAS BEEN EXTRACTED, AND ALSO BY THE CONDITIONS EMPLOYED FOR ITS DETECTION  
51  
52 FENG, 1998]. IN THE CASE OF RECOMBINANT OPN (SIGMA-O2260), THE PROTEIN MIGRATE  
53  
54  
55 DOUBLE BAND AT 65 KDA AND 31 KDA IN SDS-PAGE UNDER REDUCING CONDITIONS [MIYA  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 AL., 1990]. UNDER THE EXPERIMENTAL CONDITIONS USED IN THIS STUDY, THE ENDOTHELIUM  
4  
5 RECOVERED FROM NORMAL AORTAS OBTAINED FROM CONTROL ANIMALS DO NOT SHOW  
6  
7  
8 OPN, WHEREAS TISSUES OBTAINED FROM ANIMALS SUBJECTED TO THE HYPERCHOLESTEROLEMIA  
9  
10 TREATMENT SHOW AN IMPORTANT REACTION FOR THIS PROTEIN (65 KDA) (FIG. 1).

### 11 12 13 14 **HISTOPATHOLOGY**

15  
16 AFTER THREE MONTHS OF TREATMENT, ALL ANIMALS ON THE CHOLESTEROL-SUPPLEMENTED  
17  
18 DEVELOPED ATHEROSCLEROSIS WITH ITS CHARACTERISTIC PATTERN AND HISTOPATHOLOGY.  
19  
20 THORACIC AND ABDOMINAL AORTAS SHOWED A THICKENING OF THE INTIMA UP TO 50% OF THE  
21  
22 PERIMETER OF THE LUMEN. THE SUBENDOTHELIAL LAYER OF THE NEOINTIMA WAS COMPOSED OF  
23  
24 SPINDLE-SHAPED CELLS, PROBABLY CORRESPONDING TO SMC AND/OR FIBROBLASTS, AND  
25  
26 FOAM CELLS, ALL EMBEDDED IN CONNECTIVE TISSUE (FIG. 2A). THESE FEATURES WERE ABSENT  
27  
28 IN SLENDER ATHEROMATOUS LESIONS INSIDE THE SUBENDOTHELIAL LAYER OF THE AORTA.  
29  
30 A NORMAL STRUCTURE FOR THE TUNICA INTIMA. DISRUPTION OF THE INNERMOST ELASTIC LAMINA  
31  
32 OBSERVED AT SITES WHERE ATHEROSCLEROTIC LESIONS HAD A WELL-DEVELOPED INTIMA.  
33  
34 CONSERVED AT MODERATE ATHEROMATOUS LESIONS.

35  
36 CLUSTERS OF BASOPHILIC GRANULES WERE IDENTIFIED IN CLOSE PROXIMITY TO THE  
37  
38 MEDIA, NEAR TO THE DISRUPTED INNERMOST ELASTIC LAMINA. SIMILAR SINGLE GRANULES  
39  
40 OBSERVED DISPERSED IN THE NEOINTIMA (FIG. 2A), SURROUNDED BY FOAM CELLS AND SMC  
41  
42 SHOWING A VACUOLATED CYTOPLASM. MANY BASOPHILIC GRANULES SHOWED A TARGET-LIKE  
43  
44 WITH A RATHER LIGHT AND EOSINOPHYLIC CENTER (FIG. 2D).

### 45 46 47 48 49 50 51 52 53 **CALCIUM STAINING**

54  
55 TISSUE SECTIONS FROM ATHEROSCLEROTIC THORACIC AND ABDOMINAL AORTAS STAINED WITH THE  
56  
57 KOSSA METHOD SHOWED BLACK GRANULES VISUALIZED AS ISOLATED DOTS OR FORMING  
58  
59  
60

1  
2  
3 AND NEAR THE INTERNAL ELASTIC LAMINA, BUT ALSO OBSERVED AT THE NEOINTIMA  
4  
5 DIAMETER OF SMALLER GRANULES OF METALLIC SILVER, WHICH CORRESPOND TO DEPO  
6  
7 SALTS, CORRESPONDED FROM 1 TO 2  $\mu\text{M}$ , WHEREAS THE BIGGER GRANULES CORRESPON  
8  
9 APPROXIMATELY. VERY FEW HAD A LARGER SIZE CLOSE TO 30  $\mu\text{M}$  AND MOST OF VON KO  
10  
11 GRANULES SHOWED A TARGET-LIKE STRUCTURE APPEARANCE CLOSE TO THE BASOPHILIC  
12  
13 WITH H&E STAINING (FIG. 2E) BOTH LOCATED IN SIMILAR PLACES AT THE NEOINTIMA.  
14  
15

16  
17 SPECIMENS STAINED WITH ALIZARIN RED S WERE SHOWN TO BE SIMILAR TO T  
18  
19 DESCRIBED ABOVE WITH THE DIFFERENCE THAT THE ALIZARIN RED S-CALCIUM COMPLE  
20  
21 CHELATION PROCESS GIVES RISE TO ORANGE-COLORED GRANULES (FIG. 2C,F).  
22  
23

#### 24 25 26 **OPN IMMUNOHISTOCHEMISTRY**

27  
28 IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF OPN EXPRESSION IN THE AORTA FROM RABBITS  
29  
30 CHOLESTEROL-SUPPLEMENTED DIETS SHOWED THAT THE NEOINTIMA OF ATHEROSCLER  
31  
32 STRONGLY STAINED. IMMUNOREACTION SHOWN AT THE TUNICA MEDIA AND IN SCATTE  
33  
34 TUNICA ADVENTITIA IS LESS APPARENT (FIG. 3). NEOINTIMA OPN STAINING WAS LOCALIZE  
35  
36 THE CYTOPLASM OF THREE CELL TYPES: ENDOTHELIAL CELLS, MACROPHAGES-DERIVED  
37  
38 CELLS, AND FUSIFORM CELLS SIMILAR TO SMC AND FIBROBLASTS. THE MOST EXTENSIVE  
39  
40 STAINING, IN ADDITION TO OPN-POSITIVE CELLS, WAS OBSERVED SURROUNDING SPHERIC  
41  
42 MORPHOLOGICALLY COMPATIBLE TO BASOPHILIC GRANULES THAT WERE ALSO SHOWN T  
43  
44 THE VON KOSSA AND ALIZARIN RED STAINS (FIG. 2G). AORTAS FROM CONTROL ANIMALS SH  
45  
46 LEVEL OF OPN EXPRESSION MOSTLY LOCATED IN ENDOTHELIAL CELLS AND SMC OF THE T  
47  
48  
49  
50  
51

#### 52 53 54 **ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF ATHEROSCLEROTIC AORTAS**

1  
2  
3 IN COMPARISON TO NORMAL AORTAS, WHEN ATHEROSCLEROTIC AORTAS WERE ANALY  
4  
5 MICROSCOPY, WE FOUND THE PRESENCE OF TARGET-LIKE EXTRACELLULAR STRUCTURE  
6  
7 ELECTRONDENSE AND ELECTRONLUCENT RINGS LOCATED AT THE BOUNDARY BETWEEN  
8  
9 THE TUNICA MEDIA (FIG. 4A-C). THIS FINDING IS CONSISTENT WITH EXPERIMENTS REPORTE  
10  
11 WHERE THESE STRUCTURES ARE ASSOCIATED TO VASCULAR CALCIFICATION [SENGER ET  
12  
13 THESE STRUCTURES WERE OBSERVED IN CLOSE APPPOSITION TO COLLAGEN FIBRILS AND I  
14  
15 AMORPHOUS MATERIAL SURROUNDED BY MICROFIBRILS THAT CORRESPOND TO THE IM  
16  
17 MANY ELASTIC LAYERS PRESENT IN THE TUNICA MEDIA OF THE AORTIC WALL.  
18  
19  
20  
21

### 22 23 **OXIDATIVE STRESS INDUCTION**

24  
25 TO VERIFY THAT EXPOSURE OF VSMC TO OXLDL CAUSES OXIDATIVE STRESS, WE COND  
26  
27 INTERNALIZATION TESTS OF OXLDL LABELLED WITH DII (DII-OXLDL) AND DII-AC  
28  
29 SIMULTANEOUSLY INCUBATED WITH 6 CARBOXY-H<sub>2</sub>DCFA, LABEL THAT GIVES AWAY FLU  
30  
31 REACTING WITH FREE RADICALS INCLUDING ROS. AS SHOWN IN FIGURE 5, INTERNALIZATI  
32  
33 IS CARRIED OUT AT THE SAME TIME THE FORMATION OF ROS IS BEING DETECTED SHOW  
34  
35 LOCALIZATION OF BOTH, ROS-RELATED FLUORESCENCE AND INTERNALIZED OXLDLS.  
36  
37  
38  
39

### 40 41 **DETECTION OF OPN IN T/G HA-VSMC**

42  
43 IN ORDER TO DEMONSTRATE IF THE OBSERVED STATE OF OXIDATIVE STRESS PRODUCED B  
44  
45 OX/ACLDL CAUSES A MODIFICATION OF OPN SYNTHESIS IN VSMC, WE PERFORMED INTERN  
46  
47 EXPERIMENTS TAKING ADVANTAGE OF THE UBIQUITOUS EXPRESSION OF SCAVENGER R  
48  
49 AND SR-B IN THIS CELLULAR LINEAGE. USING WESTERN BLOT ANALYSIS, WE DEMONSTR  
50  
51 TREATED WITH BOTH OXLDL AND ACLDL EXPRESS OPN IN CONTRAST TO CELLS GROV  
52  
53 EXPOSURE TO CHEMICALLY TREATED LIPOPROTEINS (FIG. 6). INTERESTINGLY, THE ANT  
54  
55 DIFFERENCES OBSERVED BETWEEN COMMERCIAL OPN USED AS A CONTROL AND OPN EX  
56  
57  
58  
59  
60

OUR CELLS IN CULTURE AS ALSO SHOWN IN FIGURE 1 FOR PROTEIN PREPARATION FROM CHOLESTEROL TREATED AORTAS, MOST PROBABLY ARE RELATED TO THE DEGREE OF PROLIFERATION ASSOCIATED TO THE PROCESS OF APOPTOSIS. AS PREVIOUSLY REPORTED BY US, APOPTOSIS IS TRIGGERED THROUGH THE INTERNALIZATION OF MODIFIED LIPOPROTEINS IN PARALLEL WITH THE ONSET OF OXIDATIVE STRESS (MANZANO-LEON ET AL., 2006). IT REMAINS TO BE STUDIED THE EFFECTS OF PROTEOLYTIC ENZYMES ACTIVATED IN THE PROCESS.

## DISCUSSION

---

VC IS A COMMON CONSEQUENCE OF AGING, DIABETES, HYPERCHOLESTEROLEMIA, AND OTHER VASCULAR DISEASES. SUPPORTING OUR PREVIOUS RESULTS, THIS STUDY SHOWS OPN TO BE AN IMPORTANT AND INDUCIBLE INHIBITOR OF VC IN AN ADAPTATIVE RESPONSE TO HYPERCHOLESTEROLEMIA. VC WAS EXPRESSED IN PROLIFERATING AND MIGRATORY VASCULAR CELLS ASSOCIATED WITH AORTIC WALL THICKENING, AORTIC STIFFENING, AND AORTIC CALCIFICATION, AND DIRECTLY ASSOCIATED TO ATHEROSCLEROTIC LESIONS, FINDING THAT VC PROMOTES AN INCREASED SMC PROLIFERATION AND PRODUCTION OF MATRIX-METALLOPROTEASES (MMP-2) [AL., 2008; ISODA ET AL., 2002].

CALCIFIED NODULES APPEAR TO FORM FIRST IN REGIONS OF LIPID DEPOSITION, FOLLOWED BY THOSE INVOLVED WITH OXIDISED LIPIDS [OLSSON ET AL., 1999]. IN RESPONSE TO CHOLESTEROL, TRANSFORMING GROWTH FACTOR- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-2 (BMP-2) [MOHLER ET AL., 1999], AND RANKL [KADEN ET AL., 2004], INCREASE THE RATE OF CALCIFICATION, NODULE FORMATION AND THE DEVELOPMENT OF OSTEOBLAST MARKERS. SINCE CALCIFICATION OF CONNECTIVE TISSUE IS KNOWN TO INITIATE IN SMALL VESICULAR STRUCTURES KNOWN AS "MATRIX VESICLES", WHEN HAP CRYSTALS ARE DETECTED, IT IS INTERESTING TO NOTE THAT THE SAME "MATRIX VESICLES" ARE FOUND IN ATHEROSCLEROTIC LESIONS [HSU ET AL., 2002]. THESE OBSERVATIONS ARE SUPPORTED BY

1  
2  
3 PRESENT FINDINGS SHOWING THAT OPN IS IMMUNODETECTED IN SMC AND FOAM C  
4  
5  
6 Atherosclerotic lesions associated to calcium deposits.  
7

8 *In vitro* and *in vivo* human VSMC present a phenotypic change often associa  
9  
10 with their ability to acquire characteristics of a diverse range of mesenc  
11  
12 including osteoblastic, chondrocytic and adipocytic cell lines [Tyson et al.  
13  
14 modified lipoproteins stimulate VSMC calcification and changed the time co  
15  
16 associated protein gene expression resulting in enhanced osteogenic D  
17  
18 [Parhami et al., 2002; Proudfoot et al., 2002].  
19  
20  
21

22 Recently, it has been reported that VC may occur through the ind  
23  
24 osteogenesis and the establishment of an osteochondrogenic phenotype reg  
25  
26 BMP-2 has been shown to promote phosphate uptake and calcification of hu  
27  
28 [Li et al., 2008]. Once the osteogenic phenotype is induced, cells gain a dis  
29  
30 molecular fingerprint marked by specific transcription factors, including M  
31  
32 co-workers established that MSX2 promotes osteogenesis and suppresses  
33  
34 differentiation of multipotent mesenchymal progenitors on a hyperlipidem  
35  
36 mice model for VC, and provided evidence that myofibroblasts can be div  
37  
38 osteogenic lineage through BMP2-MSX2 signalling that can contribute to VC  
39  
40 [2003]. OPN has been shown to be over-expressed after cardiac damage carr  
41  
42 mechanical traumas or oxidation agents and proposed to be important in t  
43  
44 inflammation and tissue remodelling [Kossmehl et al., 2005; Okamoto, 2007]. T  
45  
46 OPN has been suggested to regulate the process of tissue inflammation and  
47  
48 and in particular responses associated to the presence of T cells, macr  
49  
50 fibroblasts. This is supported by the fact that OPN expression during the  
51  
52 dystrophic calcification correlates well with tissue infiltration of T cells  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 [GIACHELLI ET AL., 1998]. THUS, DEPENDING ON PARTICULAR CELLULAR CONDITIONS,  
4  
5 INFLUENCE PRO OR ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS DURING IN VITRO EXPERIMENTATIO  
6  
7  
8 INCREASING OR LOWERING THE LEVELS OF IL-12 OR IL-10 RESPECTIVELY [ASHKAR ET AL., 2  
9

10 SINCE INFLAMMATION HAS BEEN DIRECTLY CORRELATED TO A STATE OF OXIDAT  
11  
12 EXPERIMENTS SUGGEST THAT AN INCREASED LEVEL OF ROS INSIDE THE CELL MIGHT B  
13  
14 OPN GENE EXPRESSION. SEVERAL STUDIES HAVE SUGGESTED THAT ROS CAN BE CONS  
15  
16 SECONDARY MESSENGERS IN THE TRANSDUCTION OF SIGNALS DEPENDENT ON LIGAN  
17  
18 THROUGH PHOSPHORYLATION OF TYROSINES, CALCIUM SIGNALLING AS WELL AS GEN  
19  
20 SPECIFIC PROTEINS [DOAN ET AL., 1994; FINKEL, 1998; MIETUS-SNYDER ET AL., 2000; SUZU  
21  
22 FORD, 1992]. IN THE CASE OF OXLDL, IT HAS BEEN SHOWN THAT A CALCIUM SIGNALLING  
23  
24 STIMULATED AND THEREFORE THE CONCENTRATION OF FREE CALCIUM RAISED IN THE C  
25  
26 SINCE SPECIFIC BLOCKAGE OF CALCIUM CHANNELS IN THE PLASMA MEMBRANE OF CELLS  
27  
28 USE OF CALCIUM IONOPHORE SUCH A23187, INHIBITS AND POTENTATES THE EXPRESSIO  
29  
30 RESPECTIVELY, IT HAS BEEN PROPOSED THAT THE EXPRESSION IS DEPENDENT ON CYTOPL  
31  
32 CONCENTRATION [MIETUS-SNYDER ET AL., 2000].  
33  
34  
35  
36  
37

38 AN INCREASED EXPRESSION OF SR-A IN VSMC UNDER CONDITIONS THAT PREDISPO  
39  
40 STATE OF OXIDATIVE STRESS, CORRELATE WELL WITH ACTIVATION OF THE TRANSCRIPTIO  
41  
42 [MIETUS-SNYDER ET AL., 1998; MIETUS-SNYDER ET AL., 2000]. PHOSPHORYLATED AP-1 BI  
43  
44 SPECIFIC SITES IN THE PROMOTER OF TGF- $\beta$ , LAMININ, COLLAGEN 1, ANGIOTENSIN II AND  
45  
46 RELATED TO PROLIFERATION, CELLULAR DIFFERENTIATION AND RESPONSE TO ROS [WAN  
47  
48 2008]. OXLDL NOT ONLY ACT IN THE TRANSFORMATION OF MACROPHAGES INTO FOAM C  
49  
50 INDUCE THE ABERRANT PRODUCTION OF CYTOKINES IMPORTANT IN THE DEVE  
51  
52 ATHEROSCLEROSIS. AMONG THE PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES EXPRESSED, INVES  
53  
54 FOUND INTERLEUKIN 1  $\beta$  (IL-1) AND TUMOR NECROSIS FACTOR  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) BY SEVERAL  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 LIGANDS OF SR-A [HSU ET AL., 2001]. MOREOVER, ACTIVITY OF SR-A IN VSMC CAN BE MODU  
4  
5 BY PHORBOL ESTERS AND THE COMBINATION OF OPN AND DATE [MIETUS-SNYDER ET AL., 1997].  
6  
7  
8 IN THIS RESPECT IN OUR LABORATORY STUDYING CHO (CHINESE HAMSTER OVARY) AND R  
9  
10 LEUKEMIC MONOCYTE MACROPHAGES) CELLS, WE HAVE FOUND THAT AN INDUCED STA  
11  
12 STRESS DIRECTLY AFFECTS POSTTRANSLATIONAL EVENTS OF SR-A WITHOUT ANY AL  
13  
14 TRANSCRIPTIONAL PROCESSING OF THE RECEPTOR. RECENTLY, PARTRIDGE AND CO-WOR  
15  
16 AN EXTENSIVE COMPUTATIONAL APPROACH IDENTIFIED SETS OF GENES WHOSE TRANSC  
17  
18 WERE PREDICTIVE OF OPN GENE EXPRESSION [PARTRIDGE ET AL., 2008]. FROM THESE GEN  
19  
20 WERE FOUND TO BE ASSOCIATED TO REDOX REGULATED TRANSCRIPTION [MIETUS-SNYD  
21  
22 PARTRIDGE ET AL., 2008].  
23  
24  
25  
26

27 OUR FINDINGS SHOW OPN OVEREXPRESSION TO BE ASSOCIATED TO THE PRESENCE  
28  
29 AND ACLDL IN THE EXTRACELLULAR SPACE, WHICH IN TURN TRIGGER A STATE OF OXID  
30  
31 POSSIBLY THE INITIATION OF AN APOPTOTIC EVENT. THEREFORE, WE PROPOSE OPN AS A K  
32  
33 ASSOCIATED TO OXIDATIVE STRESS AND SUGGEST THAT ROS PROMOTE OVEREXPRESSION  
34  
35 ATHEROSCLEROTIC PLAQUE STRIKINGLY ASSOCIATED WITH THE ACTIVATION OF SCAVEN  
36  
37 INHIBITION OF CALCIFIED DEPOSITS. THESE DATA IMPLICATE OPN AS A POTENTIALLY IM  
38  
39 REGULATED MEDIATOR DESIGN TO PROTECT AGAINST THE DYSTROPHIC CALCIFICATIO  
40  
41 NEOINTIMA, IN CONTRAST WITH COLLAGEN AND ELASTIN THAT COULD BE CONSIDERED  
42  
43 MINERAL NUCLEATION.  
44  
45  
46  
47  
48

#### 49 **ACKNOWLEDGEMENTS**

50 RESEARCH HAS BEEN SUPPORTED BY GRANTS FROM CONACYT (47333/A-1) AND DGAP  
51  
52 UNAM (IN228607/18) ADJUDGED TO J, M-O AND CONACYT (82888 AND 91999) TO A, M.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

WE THANK BLANCA DELGADO, MARTHA USTARROZ, EDITH FERNÁNDEZ AND HÉCTOR M  
TECHNICAL ASSISTANCE.

For Peer Review

**REFERENCES**

ADAMS JC, WATT FM. 1993. REGULATION OF DEVELOPMENT AND DIFFERENTIATION EXTRACELLULAR MATRIX. DEVELOPMENT 117:1183-98.

AGUILAR-GAYTAN R, MAS-OLIVA J. 2003. OXIDATIVE STRESS IMPAIRS ENDOCYTOSIS SCAVENGER RECEPTOR CLASS A. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 305:510-7.

ALLEN TC. 1992. HEMATOXYLIN AND EOSIN. IN PROPHET EB, MILLIS B, ARRINGTON JB, SOBI EDS. "LABORATORY METHODS IN HISTOTECHNOLOGY." WASHINGTON D.C. USA: ARMED INSTITUTE OF PATHOLOGY, PP 53.

AOYAMA T, FUJIWARA H, MASAKI T, SAWAMURA T. 1999. INDUCTION OF LECTIN-LIKE OXIDIZED LDL RECEPTOR BY OXIDIZED LDL AND LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINE IN CULTURED ENDOTHELIAL CELLS. MOL CELL CARDIOL 31:2101-14.

ASHKAR S, WEBER GF, PANOUTSAKOPOULOU V, SANCHIRICO ME, JANSSON M, ZAWADZKI R, RITTLING SR, DENHARDT DT, GLIMCHER MJ, CANTOR H. 2000. ETA-1. OSTEOCALCIN RECEPTOR-LIKE COMPONENT OF TYPE-1. CELL-MEDIATED) IMMUNITY. SCIENCE 287:860-4.

CALVO D, GOMEZ-CORONADO D, SUAREZ Y, LASUNCION MA, VEGA MA. 1998. HUMAN CD36 IS A HIGH AFFINITY RECEPTOR FOR THE NATIVE LIPOPROTEINS HDL, LDL, AND VLDL. J LIPID RES 39:777-88.

CANFIELD AE, FARRINGTON C, DZIOBON MD, BOOT-HANFORD RP, HEAGERTY AM, KUMAR S, ROBERTS IS. 2002. THE INVOLVEMENT OF MATRIX GLYCOPROTEINS IN VASCULAR CALCIFICATION AND FIBROSIS: AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY. J PATHOL 196:228-34.

CASTELLANO G, MALAPONTE G, MAZZARINO MC, FIGINI M, MARCHESI F, GANGEMI P, TRAMERZI STIVALA F, CANEVARI S, LIBRA M 2008. ACTIVATION OF THE OSTEOCALCIN RECEPTOR-LIKE METALLOPROTEINASE-9 PATHWAY CORRELATES WITH PROSTATE CANCER PROGRESSION. J CELL PHYSIOL 14:7470-80.

CHEN M, MASAKI T, SAWAMURA T. 2002. LOX-1, THE RECEPTOR FOR OXIDIZED LOW-DENSITY LIPOPROTEIN IDENTIFIED FROM ENDOTHELIAL CELLS: IMPLICATIONS IN ENDOTHELIAL DYSFUNCTION AND ATHEROSCLEROSIS. PHARMACOL THER 95:89-100.

CHENG SL, SHAO JS, CHARLTON-KACHIGIAN N, LOEWY AP, TOWLER DA. 2003. MSX2 PROMOTES OSTEOGENESIS AND SUPPRESSES ADIPOGENIC DIFFERENTIATION OF MULTIPOTENT MATURE PROGENITORS. J BIOL CHEM 278:45969-77.

DANIELS K, SOLURSH M. 1991. MODULATION OF CHONDROGENESIS BY THE CYTOSKELETON AND EXTRACELLULAR MATRIX. J CELL SCI 100. PT 2. 249-54.

DE WINTER MP, VAN DIJK KW, HAVEKES LM, HOFKER MH. 2000. MACROPHAGE SCAVENGER RECEPTOR CLASS A: A MULTIFUNCTIONAL RECEPTOR IN ATHEROSCLEROSIS. ARTERIOSCLEROSIS THROMBOSIS VASC BIOL 20:290-7.

1  
2  
3  
4 DEJAGER S, MIETUS-SNYDER M, FRIERA A, PITAS RE. 1993. DOMINANT NEGATIVE MUTATION  
5 SCAVENGER RECEPTOR. NATIVE RECEPTOR INACTIVATION BY EXPRESSION OF TRUNCATE  
6 INVEST 92:894-902.  
7

8  
9 DOAN TN, GENTRY DL, TAYLOR AA, ELLIOTT SJ. 1994. HYDROGEN PEROXIDE ACTIVATES A  
10 SENSITIVE CA(2+)-FLUX PATHWAYS IN CANINE VENOUS ENDOTHELIAL CELLS. BIOCHEM  
11 209-15.  
12

13  
14 FINKEL T. 1998. OXYGEN RADICALS AND SIGNALING. CURR OPIN CELL BIOL 10:248-53.  
15 FITZPATRICK LA, TURNER RT, RITMAN ER. 2003. ENDOCHONDRAL BONE FORMATION IN THE  
16 POSSIBLE MECHANISM OF CORONARY CALCIFICATION. ENDOCRINOLOGY 144:2214-9.  
17

18  
19 GIACHELLI CM, BAE N, ALMEIDA M, DENHARDT DT, ALPERS CE, SCHWARTZ SM. 1999  
20 OSTEOPONTIN IS ELEVATED DURING NEOINTIMA FORMATION IN RAT ARTERIES AND IS A  
21 OF HUMAN ATHEROSCLEROTIC PLAQUES. J CLIN INVEST 92:1686-96.  
22

23  
24 GIACHELLI CM, LOMBARDI D, JOHNSON RJ, MURRY CE, ALMEIDA M. 1998. EVIDENCE FOR A  
25 OF OSTEOPONTIN IN MACROPHAGE INFILTRATION IN RESPONSE TO PATHOLOGICAL STIMULI  
26 PATHOL 152:353-8.  
27

28  
29 GUADERRAMA-DIAZ M, SOLIS CF, VELASCO-LOYDEN G, LACLETTE JP, MAS-OLIVA J. 2005. CO  
30 OF SCAVENGER RECEPTOR-MEDIATED ENDOCYTOSIS BY NOVEL LIGANDS OF DIFFERENT I  
31 BIOCHEM 271:123-32.  
32

33  
34 HSU HH, CAMACHO NC, TAWFIK O, SUN F. 2002. INDUCTION OF CALCIFICATION IN RABBIT  
35 BY HIGH CHOLESTEROL DIETS: ROLES OF CALCIFIABLE VESICLES IN DYSTROPHIC  
36 ATHEROSCLEROSIS 161:85-94.  
37

38  
39 HSU HY, CHIU SL, WEN MH, CHEN KY, HUA KF. 2001. LIGANDS OF MACROPHAGE SCAVENGER  
40 RECEPTOR INDUCE CYTOKINE EXPRESSION VIA DIFFERENTIAL MODULATION OF PROTEIN  
41 PATHWAYS. J BIOL CHEM 276:28719-30.  
42

43  
44 INNERARITY TL, PITAS RE, MAHLEY RW. 1986. LIPOPROTEIN-RECEPTOR INTERACTIONS. I  
45 ENZYMOL 129:542-65.  
46

47  
48 ISODA K, NISHIKAWA K, KAMEZAWA Y, YOSHIDA M, KUSUHARA M, MOROI M, TADA N, OHS  
49 F. 2002. OSTEOPONTIN PLAYS AN IMPORTANT ROLE IN THE DEVELOPMENT OF MEDIAL THICKENING  
50 NEOINTIMAL FORMATION. CIRC RES 91:77-82.  
51

52  
53 JIMENEZ-CORONA AE, PEREZ-TORRES A, MAS-OLIVA J, MORENO A. 2008. EFFECT OF OSTEOPO  
54 CHONDROITIN SULFATES. B, C), AND HUMAN SERUM ALBUMIN ON THE CRYSTALLIZATION  
55 HYDROXYAPATITE IN AGAROSE AND SILICA HYDROGELS. CRYSTAL GROWTH & DESIGN 8:1  
56

57  
58 JOHNSON FB. 1992. PIGMENTS AND MINERALS. IN PROPHET EB, MILLIS B, ARRINGTON JB,  
59 LH. EDS. "LABORATORY METHODS IN HISTOTECHNOLOGY." WASHINGTON D.C. USA: ARME  
60 INSTITUTE OF PATHOLOGY, PP 197-198.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

KADEN JJ, BICKELHAUPT S, GROBHOLZ R, HAASE KK, SARIKOC A, KILIC R, BRUECKMAN LANG S, ZAHN I, VAHL C, HAGL S, DEMPFLER CE, BORGGREFE M. 2004. RECEPTOR ACTIVATED NUCLEAR FACTOR KAPPA B LIGAND AND OSTEOPROTEGERIN REGULATE AORTIC VALVE CELL CARDIOL 36:57-66.

KOSSMEHL P, SCHONBERGER J, SHAKIBAEI M, FARAMARZI S, KURTH E, HABIGHORST B, VOIGT R, WEHLAND M, KREUTZ R, INFANGER M, SCHULZE-TANZIL G, PAUL M, GRIMM D. 2005. INCREASED EXPRESSION OF FIBRONECTIN AND OSTEOPONTIN IN PORCINE HEARTS FOLLOWING ISCHEMIA AND REPERFUSION. AM J PHYSIOL 289:H2626-37.

KRITCHEVSKY D, TEPPER SA, LANGAN J. 1962. CHOLESTEROL VEHICLE IN EXPERIMENTAL ATHEROSCLEROSIS. IV. INFLUENCE OF HEATED FAT AND FATTY ACIDS. J ATHEROSCLER REPERFUSION 1:1-10.

LI X, YANG HY, GIACHELLI CM. 2008. BMP-2 PROMOTES PHOSPHATE UPTAKE, PHENOTYPIC MODULATION, AND CALCIFICATION OF HUMAN VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS. AM J PHYSIOL 295:H199:271-7.

LIAW L, ALMEIDA M, HART CE, SCHWARTZ SM, GIACHELLI CM. 1994. OSTEOPONTIN PROMOTES VASCULAR CELL ADHESION AND SPREADING AND IS CHEMOTACTIC FOR SMOOTH MUSCLE CELLS. CIRC RES 74:214-24.

LONDON GM, GUERIN AP, MARCHAIS SJ, METIVIER F, PANNIER B, ADDA H. 2003. ARTERIAL MEDIA CALCIFICATION IN END-STAGE RENAL DISEASE: IMPACT ON ALL-CAUSE AND CARDIOVASCULAR MORTALITY. NEPHROL DIAL TRANSPLANT 18:1731-40.

MANZANO-LEON N, DELGADO-COELLO B, GUADERRAMA-DIAZ M, MAS-OLIVA J. 2006. BDNF ADAPTIN: KEY MOLECULE FOR MICROGLIAL SCAVENGER RECEPTOR FUNCTION UNDER STRESS. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 351:588-94.

MIETUS-SNYDER M, FRIERA A, GLASS CK, PITAS RE. 1997. REGULATION OF SCAVENGER RECEPTOR EXPRESSION IN SMOOTH MUSCLE CELLS BY PROTEIN KINASE C: A ROLE FOR OXIDIZED LDL. ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL 17:969-78.

MIETUS-SNYDER M, GLASS CK, PITAS RE. 1998. TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION OF SCAVENGER RECEPTOR EXPRESSION IN HUMAN SMOOTH MUSCLE CELLS REQUIRES AP-1/C-JUN AND CREB. BOTH AP-1 BINDING AND JNK ACTIVATION ARE INDUCED BY PHORBOL ESTERS AND OXIDIZED LDL. ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL 18:1440-9.

MIETUS-SNYDER M, GOWRI MS, PITAS RE. 2000. CLASS A SCAVENGER RECEPTOR UP-REGULATION IN SMOOTH MUSCLE CELLS BY OXIDIZED LOW DENSITY LIPOPROTEIN. ENHANCEMENT BY CALCIUM AND CONCURRENT CYCLOOXYGENASE-2 UP-REGULATION. J BIOL CHEM 275:17661-70.

MIYAZAKI Y, SETOGUCHI M, YOSHIDA S, HIGUCHI Y, AKIZUKI S, YAMAMOTO S. 1990. THE MOUSE OSTEOPONTIN GENE. EXPRESSION IN MONOCYTIC LINEAGES AND COMPLETE NUCLEOTIDE SEQUENCE. J BIOL CHEM 265:14432-8.

1  
2  
3 MOHLER ER, 3RD, CHAWLA MK, CHANG AW, VYAVAHARE N, LEVY RJ, GRAHAM L, GANNON  
4 1999. IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CALCIFYING VALVE CELLS FROM HUMAN  
5 AORTIC VALVES. J HEART VALVE DIS 8:254-60.  
6

7  
8 MOHLER ER, 3RD, GANNON F, REYNOLDS C, ZIMMERMAN R, KEANE MG, KAPLAN FS. 2000  
9 BONE FORMATION AND INFLAMMATION IN CARDIAC VALVES. CIRCULATION 103:1522-8.  
10

11 OKAMOTO H. 2007. OSTEOPONTIN AND CARDIOVASCULAR SYSTEM. MOL CELL BIOCHEM 300  
12 OLSSON M, THYBERG J, NILSSON J. 1999. PRESENCE OF OXIDIZED LOW DENSITY LIPOPROTEIN  
13 NONRHEUMATIC STENOTIC AORTIC VALVES. ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL 19:1218-22  
14

15  
16 PARESCE DM, GHOSH RN, MAXFIELD FR. 1996. MICROGLIAL CELLS INTERNALIZE AGGREGATED  
17 ALZHEIMER'S DISEASE AMYLOID BETA-PROTEIN VIA A SCAVENGER RECEPTOR. NEURON 17:  
18

19  
20 PARHAMI F, BASSERI B, HWANG J, TINTUT Y, DEMER LL. 2002. HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN  
21 REGULATES CALCIFICATION OF VASCULAR CELLS. CIRC RES 91:570-6.  
22

23  
24 PARTRIDGE CR, HE Q, BRUN M, RAMOS KS. 2008. GENETIC NETWORKS OF COOPERATIVE  
25 REGULATION OF OSTEOPONTIN. MATRIX BIOL 27:462-74.  
26

27  
28 PITAS RE, INNERARITY TL, WEINSTEIN JN, MAHLEY RW. 1981. ACETOACETYLATED LIPOPROTEIN  
29 USED TO DISTINGUISH FIBROBLASTS FROM MACROPHAGES IN VITRO BY FLUORESCENCE  
30 ARTERIOSCLEROSIS 1:177-85.  
31

32  
33 PROUDFOOT D, DAVIES JD, SKEPPER JN, WEISSBERG PL, SHANAHAN CM. 2002. ACETYLATED  
34 DENSITY LIPOPROTEIN STIMULATES HUMAN VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELL CALCIUM  
35 PROMOTING OSTEOBLASTIC DIFFERENTIATION AND INHIBITING PHAGOCYTOSIS. CIRCULATION  
36 50.  
37

38  
39 REKHTER MD. 1999. COLLAGEN SYNTHESIS IN ATHEROSCLEROSIS: TOO MUCH AND NOT  
40 CARDIOVASC RES 41:376-84.  
41

42  
43 RIGOTTI A, ACTON SL, KRIEGER M. 1995. THE CLASS B SCAVENGER RECEPTORS SR-BI AND  
44 ARE RECEPTORS FOR ANIONIC PHOSPHOLIPIDS. J BIOL CHEM 270:16221-4.  
45

46  
47 RITTLING SR, FENG F. 1998. DETECTION OF MOUSE OSTEOPONTIN BY WESTERN BLOTTING  
48 BIOPHYS RES COMMUN 250:287-92.  
49

50  
51 SAWAMURA T, KUME N, AOYAMA T, MORIWAKI H, HOSHIKAWA H, AIBA Y, TANAKA T, MIWA  
52 KATSURA Y, KITA T, MASAKI T. 1997. AN ENDOTHELIAL RECEPTOR FOR OXIDIZED LOW  
53 LIPOPROTEIN. NATURE 386:73-7.  
54

55  
56 SENGER DR, ASCH BB, SMITH BD, PERRUZZI CA, DVORAK HF. 1983. A SECRETED  
57 PHOSPHOPROTEIN MARKER FOR NEOPLASTIC TRANSFORMATION OF BOTH EPITHELIAL  
58 CELLS. NATURE 302:714-5.  
59  
60

1  
2  
3 SHI SR, CHAIWUN B, YOUNG L, COTE RJ, TAYLOR CR. 1993. ANTIGEN RETRIEVAL TECHNIQUE  
4 UTILIZING CITRATE BUFFER OR UREA SOLUTION FOR IMMUNOHISTOCHEMICAL DEMONSTRATION OF  
5 ANDROGEN RECEPTOR IN FORMALIN-FIXED PARAFFIN SECTIONS. J HISTOCHEM CYTOCHEM  
6

7  
8 SPEER MY, CHIEN YC, QUAN M, YANG HY, VALI H, MCKEE MD, GIACHELLI CM. 2005.  
9 SMOOTH MUSCLE CELLS DEFICIENT IN OSTEOPONTIN HAVE ENHANCED SUSCEPTIBILITY TO  
10 IN VITRO. CARDIOVASC RES 66:324-33.  
11

12  
13 SUZUKI YJ, FORD GD. 1992. SUPEROXIDE STIMULATES IP3-INDUCED CA<sup>2+</sup> RELEASE FROM VASCULAR  
14 SMOOTH MUSCLE SARCOPLASMIC RETICULUM. AM J PHYSIOL 262:H114-6.  
15

16  
17 TOWLER DA, BIDDER M, LATIFI T, COLEMAN T, SEMENKOVICH CF. 1998. DIET-INDUCED DIABETES  
18 ACTIVATES AN OSTEOGENIC GENE REGULATORY PROGRAM IN THE AORTAS OF LOW DENSITY  
19 RECEPTOR-DEFICIENT MICE. J BIOL CHEM 273:30427-34.  
20

21  
22 TYSON KL, REYNOLDS JL, MCNAIR R, ZHANG Q, WEISSBERG PL, SHANAHAAN CM. 2003.  
23 OSTEO/CHONDROCYTIC TRANSCRIPTION FACTORS AND THEIR TARGET GENES EXHIBIT DIFFERENTIAL  
24 EXPRESSION IN HUMAN ARTERIAL CALCIFICATION. ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL 23:1964-71.  
25

26  
27 WANG KX, DENHARDT DT. 2008. OSTEOPONTIN: ROLE IN IMMUNE REGULATION AND  
28 RESPONSES. CYTOKINE GROWTH FACTOR REV 19:333-45.  
29

30  
31 WATSON KE, PARHAMI F, SHIN V, DEMER LL. 1998. FIBRONECTIN AND COLLAGEN I MATRICES  
32 PROMOTE CALCIFICATION OF VASCULAR CELLS IN VITRO, WHEREAS COLLAGEN IV MATRICES  
33 INHIBIT CALCIFICATION. ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL 18:1964-71.  
34

35  
36 WAYHS R, ZELINGER A, RAGGI P. 2002. HIGH CORONARY ARTERY CALCIUM SCORES PREDICT AN  
37 EXTREMELY ELEVATED RISK FOR HARD EVENTS. J AM COLL CARDIOL 39:225-30.  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

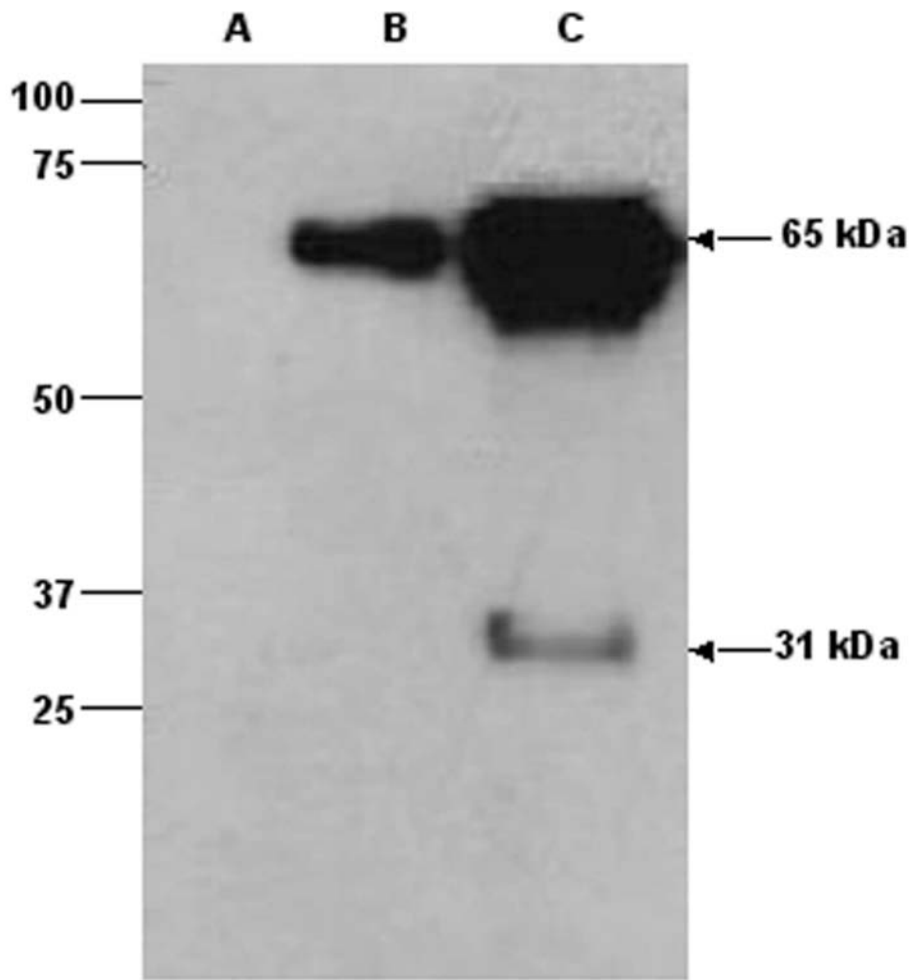


Fig. 1. OPN identification by Western blot analysis. Protein preparation from a control aorta (A); control recombinant OPN (B); aorta obtained from animals feed with a high cholesterol diet (C).  
84x84mm (600 x 600 DPI)

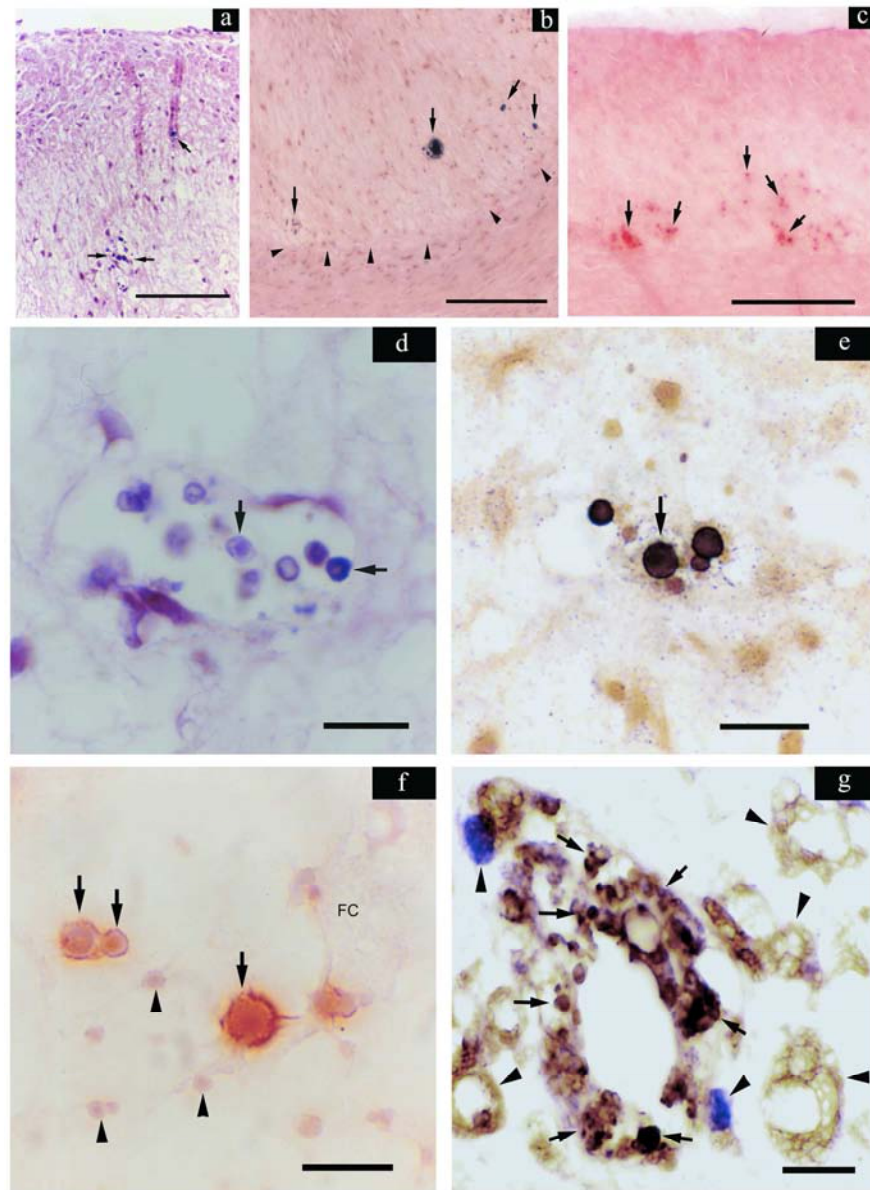


Fig. 2. Atherosclerotic lesions of aortas from rabbits treated with hypercholesterolemic diets. The neointima showed the characteristic features of an atheroma plaque with the presence of basophilic granules (a, d; arrows), also which were stained by the Von Kossa method (b, e) at the boundary between the neointima and the tunica media (b, arrowheads). Alternative calcium staining with Alizarin red S confirmed that these target-like structures (c, f) surrounded by foam cells (f, FC) could be associated to calcium mineralization. Immunohistochemical staining demonstrated a close association between extracellular (g, arrows) and cellular (g, foam cells marked with arrowheads) OPN and the presence of calcium deposits. Bars: a-c 250  $\mu$ m; d-g 50  $\mu$ m.

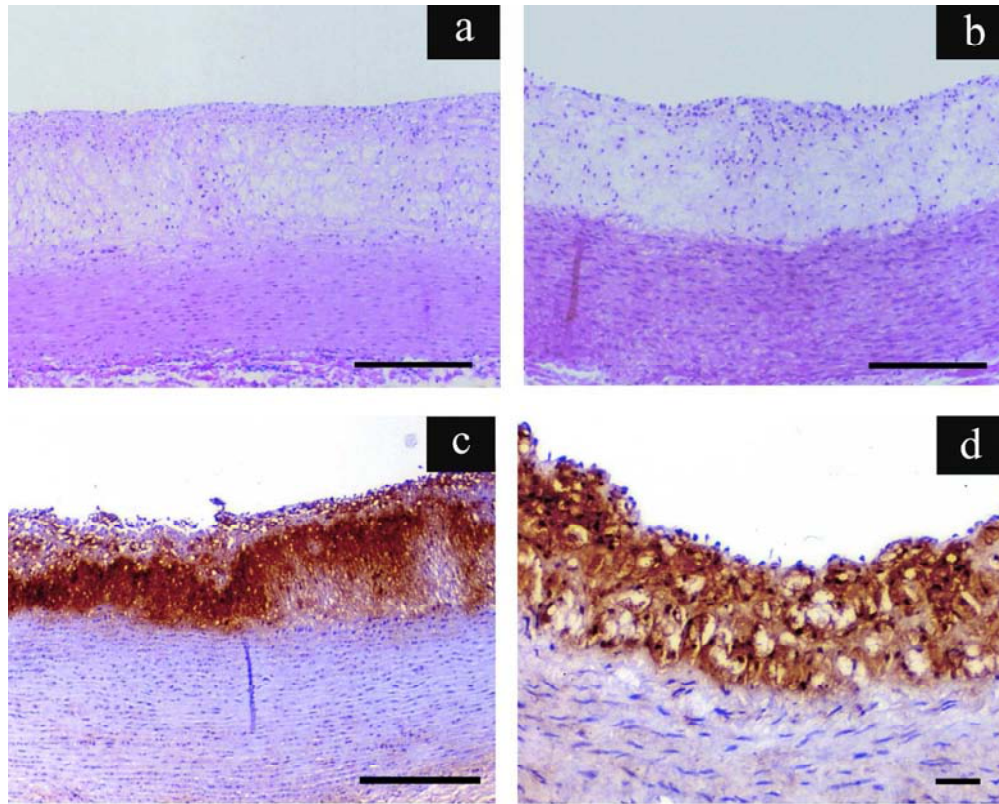


Fig. 3. Immunohistochemistry to osteopontin in the thoracic (a, c) and abdominal (b, d) aorta from experimental atherosclerotic rabbits. Aortas show atheroma plaques in both thoracic and abdominal regions and the overexpression of OPN located at the neointima (c, d). Note that SMC of the tunica media also express OPN weakly (d). Bars: a-c 250  $\mu$ m; d 100 $\mu$ m.

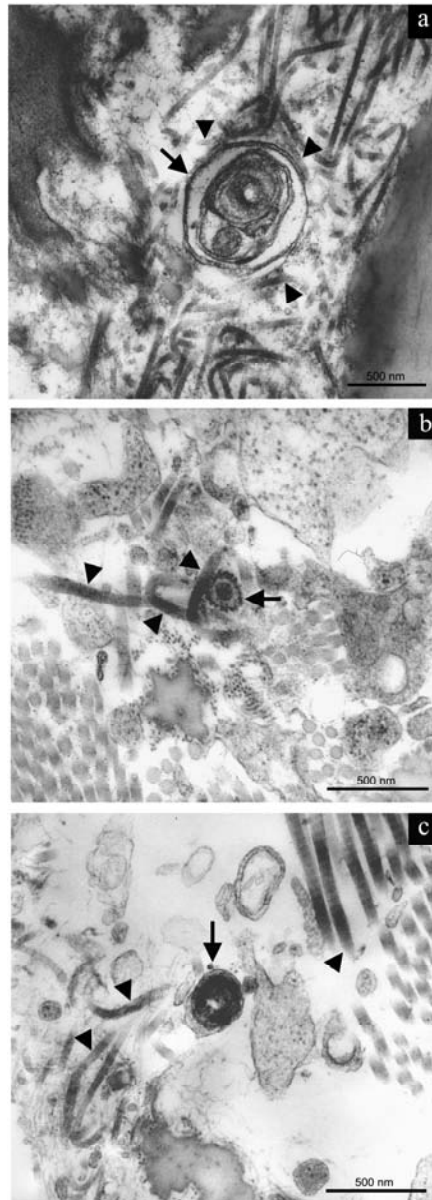


Fig. 4. Transmission electron micrographs of neointima at the boundary with the tunica media of atherosclerotic rabbit aortas. Note the presence of target-like extracellular structures (arrows) in apposition with collagen fibrils (arrowheads), near to amorphous material surrounded by microfibrils associated to elastic lamellas. Samples taken from thoracic (a, b) and abdominal aorta (c).

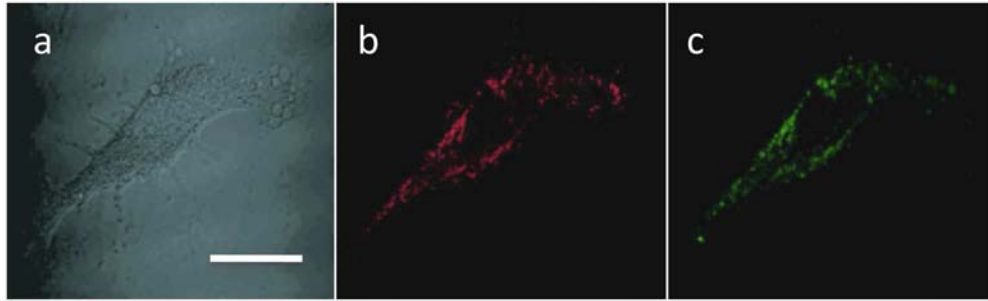


Fig. 5. Internalization of oxLDL and generation of ROS in vascular smooth muscle cells. T/G HA-VSMC incubated during culture with DiI-oxLDL (to follow lipoprotein internalization), and 6-carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA (oxidative stress marker). Phase contrast image showing T/G HA-VSMC (a). OxLDL internalization (b). Oxidative stress marker associated to ROS generation (c).  $\lambda$  excitation for 6-carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA (448nm) and DiI (543nm).  $\lambda$  emission 519nm and 569nm respectively. Bar 30  $\mu$ m.  
169x51mm (600 x 600 DPI)

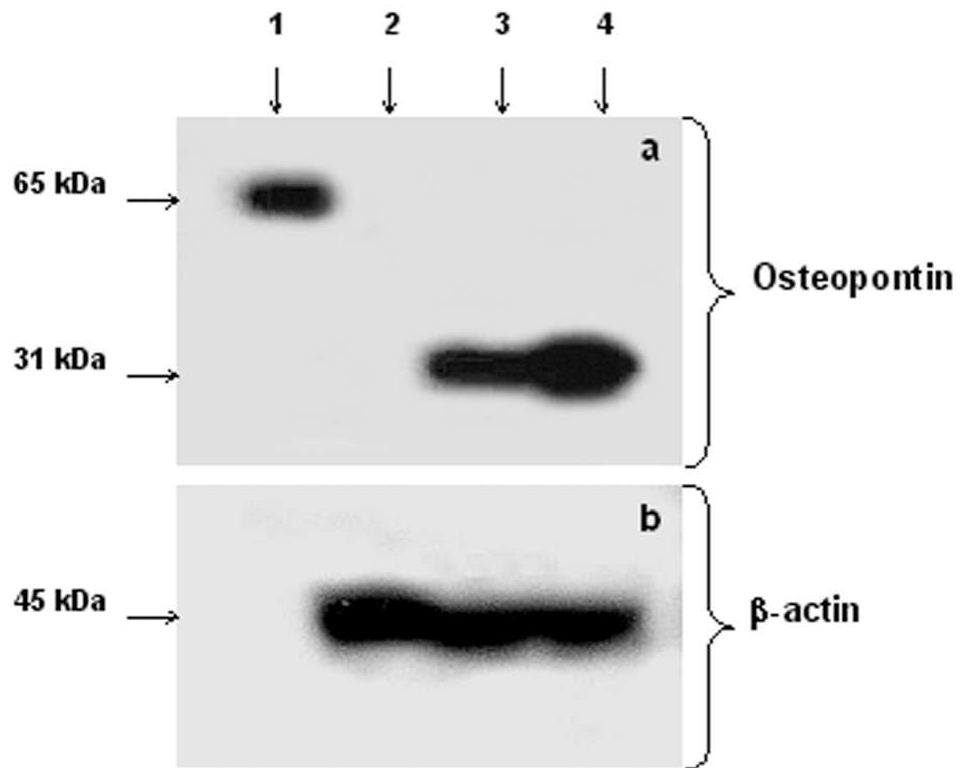


Fig. 6. OPN identification by Western blot analysis; control recombinant OPN (lane 1); VSMC cultured in the absence of chemically modified lipoproteins (control) (lane 2); after internalization of ox-LDL and acLDL (lanes 3-4 respectively). Immunoblots developed for osteopontin (a) and  $\beta$ -actin as loading control (b).  
84x65mm (300 x 300 DPI)