



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

POTENCIAL REGULACIÓN POR ALDOSTERONA DEL
COTRANSPORTADOR SODIO-FOSFATO NaPi-III,
IMPLICADO EN LA ARTERIOESCLEROSIS

KATHIA YAEL BERCELER NAJUM

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

PROFESOR GUÍA: LUIS MICHEA ACEVEDO

SANTIAGO, CHILE
2007



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

POTENCIAL REGULACIÓN POR ALDOSTERONA DEL
COTRANSPORTADOR SODIO-FOSFATO NaPi-III,
IMPLICADO EN LA ARTERIOESCLEROSIS

KATHIA Yael BERCELLE NAJUM

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : LUIS MICHEA ACEVEDO
PROFESOR CONSEJERO: GUSTAVO FARÍAS ROLDÁN
PROFESOR CONSEJERO: MARCO GALLEGUILLOS CAAMAÑO

SANTIAGO, CHILE
2007

DEDICATORIAS.

Había una vez una niña amante de los animales. Nunca le faltó una mascota a quien cuidar, ya fueran perros, gatos, caballos, conejos, loros, pollitos, tortugas, hámsters, catitas, peces o incluso los chanchitos de tierra del jardín. No podía pasar al lado de un perro sin acercarse a acariciarlo. No importaba si este era agresivo, grande, callejero o sarnoso, a pesar del temor de su familia, ella los conquistaba a todos.

Cada vez que le preguntaban qué quería ser cuando grande, ella respondía sin dudarle: Veterinaria.

Y cuando fue lo “suficientemente grande” para tomar la decisión, entró orgullosamente a estudiar Medicina Veterinaria en la Universidad de Chile. Hay que reconocer que el proceso no fue fácil, pero tampoco fue taaan complicado, los cinco años de carrera pasaron volando, sólo la tesis se hizo un poquito más larga de lo esperado.

Y aquí estoy, al final del camino y a las puertas de un futuro que recién comienza. A pasos de cumplir ese sueño de niña, convertirme en Médico Veterinario...

Quiero dedicar mi Memoria de Título, y aprovechar de entregar estas sinceras palabras de agradecimiento a todos quienes me han acompañado en mi proceso de formación tanto personal como profesional, quienes influyeron en que sea como soy, en que tenga esta vocación y que haya llegado a este momento. A mi familia, pololo y amigos:

Mamá, por inculcarme la responsabilidad y el esfuerzo para estar entre los mejores. Gracias por creer en mí y en mis capacidades, a veces incluso más que yo misma.

Papá, por acompañarme, a veces de cerca y a veces de lejos, a lo largo de mi vida y por ser “mi mejor papá”.

Dany, porque sé que siempre puedo contar con mi loco hermano mayor, para lo que sea.

Michel, porque para mí eres un ejemplo de inteligencia y capacidad. Gracias por ser mi aval y apoyarme en lo económico para que pudiera estudiar tranquila.

Maca, porque entremedio de las peleas nos queremos, además que tener una hermana menor te hace la vida más entretenida.

Titi, la representante de los abuelos, porque me encanta tener la posibilidad de que me acompañes en estos momentos.

Gordito, por tu apoyo y amor incondicional. Aunque en estos años yo he aprendido más de arquitectura que tú de veterinaria, te has esforzado por escucharme, entenderme y estar siempre a mi lado. Esta tesis también es tuya. Gracias por compartir tu vida con la mía...

Amigos, por ser cada uno(a) una persona especial en mi vida, por los proyectos que hemos realizado juntos y las satisfacciones que hemos compartido.

Los quiero mucho a todos.

Kathy.

AGRADECIMIENTOS.

A todos quienes colaboraron en mi “desarrollo científico” para llevar a cabo este trabajo. Me enseñaron, ayudaron, guiaron y aconsejaron:

- Laboratorio de Fisiología Integrativa, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.
- Laboratorio de Fisiología Integrativa y Molecular, Facultad de Medicina de la Universidad de los Andes.

Dr. Luis Michea, Dra. Elisa Marusic, Dr. Ramón Martínez, Mane, Karlita, Faby, Ignacio, Francisco “Tiger”, Lore, Andrés, Cristian, Sergio, Rodrigo, Andrea, Don Jorge, Don René...

Nuevamente, gracias Gordo, Juampa, Mauri, Michel y Dany.

... Y a la ciencia, a veces celebrada, más veces vilipendiada, me trajo varias frustraciones, pero también muchas satisfacciones.

ÍNDICE.

RESUMEN	7
SUMMARY	9
INTRODUCCIÓN	11
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	13
Arterioesclerosis e Insuficiencia Renal Crónica.....	13
Transportadores de fosfato implicados en arterioesclerosis.....	14
Regulación de Pit-1; Papel del fosfato.....	15
Diferenciación osteocondrogénica en la arterioesclerosis.....	16
Papel potencial de aldosterona en la calcificación vascular.....	17
HIPÓTESIS, OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
MATERIAL Y MÉTODOS	20
Animales experimentales.....	20
Modelo experimental de IRC en ratas.....	20
Explantos de arterias aortas.....	21
Estimulación de los explantes aórticos.....	21
Medición de la actividad de NaPi-III en aorta.....	21
Extracción de proteínas.....	22
<i>Western Blot</i>	22
Extracción de RNA.....	24
Electroforesis de RNA.....	25
Transcripción reversa.....	26
Partidores.....	26
PCR en tiempo real.....	26
RT-PCR para Cbfa-1.....	27
Análisis Estadístico.....	28
RESULTADOS	29
Efecto de la nefrectomía 5/6, con o sin tratamiento con espironolactona, sobre la actividad de NaPi-III en aorta.....	29
Efecto de la nefrectomía 5/6, con o sin tratamiento con espironolactona, sobre la expresión proteica de Pit-1 en aorta.....	30
Efecto del estímulo con aldosterona sobre la actividad de NaPi-III en explantes aórticos.....	31

Efecto del estímulo con aldosterona sobre la expresión proteica de Pit-1 en explantes aórticos.....	32
Efecto del estímulo con aldosterona y la inhibición del MR con espironolactona sobre la expresión proteica de Pit-1 en explantes aórticos.....	34
Efecto del estímulo con aldosterona y la inhibición del MR con espironolactona sobre la expresión génica de Cbfa-1 en explantes aórticos.....	35
DISCUSIÓN.....	37
CONCLUSIONES.....	41
BIBLIOGRAFÍA.....	42
ANEXO: GLOSARIO.....	46

RESUMEN.

La calcificación arterial es un importante factor de riesgo asociado a morbilidad y mortalidad cardiovascular. La arterioesclerosis o esclerosis de Mönckeberg es un tipo de calcificación que involucra específicamente a la túnica media arterial, aumentando la rigidez de vasos de distinto calibre. Una situación clínica en que se observa un desarrollo rápido y agresivo de complicaciones cardiovasculares es la insuficiencia renal crónica, donde existe una alteración del metabolismo fosfo-cálcico y la presencia de hiperaldosteronismo, lo que contribuiría a la calcificación arterial y daño cardiovascular. Estudios recientes indican que la arterioesclerosis ocurre mediante la captación activa de fosfato por el tejido vascular, mediada por un cotransportador de fosfato dependiente de sodio (NaPi), que utiliza el fosfato como sustrato para la formación de cristales de hidroxiapatita. NaPi-III es el mediador de la captación de fosfato en los tejidos cardiovasculares, en los que se expresan dos isoformas: Pit-1 y Pit-2. Al aumentar la captación de fosfato, las células de músculo liso de la pared arterial sufren un cambio fenotípico, activando un programa de diferenciación de tipo osteocondrogénica. En el presente trabajo se estudió el efecto de aldosterona sobre la actividad y expresión del cotransportador sodio-fosfato NaPi-III y la diferenciación osteocondrogénica en el tejido arterial. Ratas macho fueron sometidas a nefrectomía 5/6 y divididas en 3 grupos: SHAM (control), NPX (nefrectomía 5/6) y NPXspi (NPX más tratamiento con espironolactona, un antagonista del receptor de aldosterona, 15 mg/Kg/día). Se extrajeron aortas de ratas sanas, las que fueron incubadas durante 18 a 24 horas con aldosterona y/o espironolactona, obteniendo los siguientes grupos experimentales: CONTROL (vehículo), ALDO (aldosterona 10^{-9} a 10^{-7} M), SPI (espironolactona $5 \cdot 10^{-6}$ M) y ALDO+SPI (aldosterona 10^{-7} M más espironolactona $5 \cdot 10^{-6}$ M). La actividad de NaPi-III en anillos aórticos fue evaluada mediante captación de ^{32}P sensible a arseniato de sodio (10 mM) o ácido fosfonofórmico (1 mM). Las ratas urémicas presentaron un significativo aumento en la actividad NaPi (SHAM: 196 ± 8 ; NPX: 437 ± 128 cpm/mg tejido húmedo/10 min; $P < 0,05$ vs SHAM). Espironolactona previno el aumento de la actividad NaPi (NPXspi: 173 ± 38 cpm/mg tejido húmedo/10 min). Se realizaron *western blot* con un anticuerpo específico para Pit-1 en los grupos de ratas, observándose un aumento significativo en la expresión de esta proteína en el grupo NPX, comparado con SHAM y NPXspi (SHAM: $1,334 \pm 0,139$; NPX: $2,205 \pm 0,337$; NPXspi: $1,027 \pm 0,328$ unidades arbitrarias (u.a.); $P < 0,05$ NPX vs SHAM y NPXspi). La actividad NaPi también aumentó significativamente en los explantes

del grupo ALDO (10^{-7} M) respecto al CONTROL (CONTROL: 242 ± 30 ; ALDO: 868 ± 67 cpm/mg tejido húmedo/10 min; $P < 0,01$). Mediante *western blot* se demostró que los explantes arteriales presentaron un aumento dosis dependiente de Pit-1 frente a concentraciones crecientes de aldosterona (CONTROL: 1; ALDO 10^{-9} M: $1,228 \pm 0,197$; ALDO 10^{-8} M: $1,653 \pm 0,299$; ALDO 10^{-7} M: $2,051 \pm 0,440$ u.a.; obteniéndose una diferencia significativa en los dos últimos grupos con respecto al CONTROL, $P < 0,05$) como también se observó la inhibición del efecto positivo de aldosterona sobre Pit-1, a través de espironolactona, sin diferencias importantes entre los grupos CONTROL, SPIRO y ALDO+SPIRO y un aumento significativo de Pit-1 en el grupo ALDO (10^{-7} M) (CONTROL: 1; SPI: $1,032 \pm 0,072$; ALDO: $1,599 \pm 0,281$; ALDO+SPI: $1,045 \pm 0,120$ u.a.; $P < 0,05$). Se evaluó mediante RT-PCR la abundancia relativa de mRNA del gen Cbfa-1, factor de transcripción típico de la diferenciación osteocondrogénica, observándose un aumento importante en la expresión de este gen en los explantes estimulados con aldosterona 10^{-7} M (ALDO), mientras que no existe una diferencia significativa entre los grupos CONTROL, SPI y ALDO+SPI (CONTROL: $0,92 \pm 0,15$; SPI: $0,76 \pm 0,27$; ALDO: $2,20 \pm 0,71$; ALDO+SPI: $1,04 \pm 0,25$ ng; $P < 0,05$). **Estos resultados demuestran una regulación de la actividad y expresión de Pit-1 en el tejido arterial por aldosterona y su relación en la activación del programa de diferenciación osteocondrogénica que ocurre en la calcificación arterial.**

SUMMARY.

Arterial calcification is an important risk factor associated to cardiovascular morbidity and mortality. Arteriosclerosis or Mönckeberg's sclerosis is a type of calcification that involves specifically the arterial medial tunic, increasing the stiffness of different size vessels. A clinical situation where a quick and aggressive development of cardiovascular complications is observed is end-stage renal disease, where phosphorus-calcium metabolism alterations and hyperaldosteronism exist, which would contribute to arterial calcification and cardiovascular damage. Recent studies indicate that arteriosclerosis occurs through active phosphate uptake by vascular tissue, mediated by a sodium-dependent phosphate cotransporter (NaPi), which uses phosphate as a substrate for hydroxyapatite crystals formation. NaPi-III is the phosphate uptake mediator in cardiovascular tissues, where two isoforms are expressed: Pit-1 and Pit-2. As phosphate uptake increases, vascular smooth muscle cells undergo a phenotypic transformation, activating an osteochondrogenic differentiation program. In the present work the effect of aldosterone on the activity and expression of NaPi-III sodium-phosphate cotransporter and osteochondrogenic differentiation in arterial tissue was studied. Male rats were submitted to 5/6 nephrectomy and divided into three groups: SHAM (control), NPX (5/6 nephrectomy) and NPXspi (NPX plus treatment with spironolactone, an aldosterone receptor antagonist, 15 mg/Kg/day). Aortas from healthy rats were extracted, and incubated for 18 to 24 hours with aldosterone and/or spironolactone, obtaining the following experimental groups: CONTROL (vehicle), ALDO (aldosterone 10^{-9} M to 10^{-7} M), SPI (spironolactone 5×10^{-6} M) and ALDO+SPI (aldosterone 10^{-7} M plus spironolactone 5×10^{-6} M). The NaPi-III activity in aortic rings was measured by ^{32}P uptake, sensitive to sodium arsenate (10 mM) or phosphonophormic acid (1 mM). Uremic rats showed a significant increase in NaPi activity (SHAM: 196 ± 8 ; NPX: 437 ± 128 cpm/mg wet tissue/10 min; $P < 0.05$ vs SHAM). Spironolactone prevented the NaPi activity increase (NPXspi: 173 ± 38 cpm/mg wet tissue/10 min). Western Blot were performed with an specific antibody for Pit-1, in the rat groups, showing a significant increase in the expression of this protein in the NPX group, compared to SHAM and NPXspi (SHAM: 1.334 ± 0.139 ; NPX: 2.205 ± 0.337 ; NPXspi: 1.027 ± 0.328 arbitrary units (a.u.); $P < 0.05$ NPX vs SHAM and NPXspi). NaPi activity also augmented significantly in the ALDO (10^{-7} M) group explants respect to CONTROL (CONTROL: 242 ± 30 ; ALDO: 868 ± 67 cpm/mg wet tissue/10 min; $P < 0.01$). Through western blot, it was demonstrated that arterial explants had a dose dependent increase of

Pit-1 in front of crescent aldosterone concentrations (CONTROL: 1; ALDO 10^{-9} M: 1.228 ± 0.197 ; ALDO 10^{-8} M: 1.653 ± 0.299 ; ALDO 10^{-7} M: 2.051 ± 0.440 a.u.; obtaining a significant difference in the two last groups respect to CONTROL; $P < 0.05$) and it was also observed the inhibition of the positive effect of aldosterone over Pit-1, through spironolactone, without important differences between CONTROL, SPI y ALDO+SPI groups and a significant increase of Pit-1 in ALDO (10^{-7} M) group (CONTROL: 1; SPI: 1.032 ± 0.072 ; ALDO: 1.599 ± 0.281 ; ALDO+SPI: 1.045 ± 0.120 a.u.; $P < 0.05$). Through RT-PCR, we evaluated the relative abundance of mRNA of Cbfa-1 gene, a transcriptional factor typical of osteochondrogenic differentiation, showing an important increase in the expression of this gene in the explants stimulated with aldosterone 10^{-7} M (ALDO), while there is no significant difference between CONTROL, SPI and ALDO+SPI groups (CONTROL: 0.92 ± 0.15 ; SPI: 0.76 ± 0.27 ; ALDO: 2.20 ± 0.71 ; ALDO+SPI: 1.04 ± 0.25 ng; $P < 0.05$). **These results demonstrate a regulation by aldosterone on the activity and expression of Pit-1 in arterial tissue and its relationship with the activation of the osteochondrogenic differentiation program which occurs in arterial calcification.**

INTRODUCCIÓN.

Dentro de las primeras causas de muerte en el mundo se encuentran las enfermedades cardiovasculares. La calcificación arterial es un importante factor de riesgo cardiovascular tanto en el hombre como en otras especies. La arterioesclerosis o esclerosis de Mönckeberg es un tipo de calcificación que involucra específicamente a la túnica media arterial, afectando vasos de distinto calibre, aumentando su rigidez. Estos cambios mecánicos se asocian con un aumento de velocidad de la onda de pulso arterial, presión de pulso y aumento de la poscarga ventricular izquierda, favoreciendo el desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda y comprometiendo la perfusión coronaria.

Una situación clínica en que se observa un desarrollo rápido y agresivo de complicaciones cardiovasculares es la insuficiencia renal crónica (IRC). Se estima que en Chile existen alrededor de 10.000 pacientes insuficientes renales, población que va rápidamente en aumento. Una característica importante y común en los insuficientes renales es la alteración del metabolismo fosfo-cálcico, lo que se refleja en hipercalcemia e hiperfosfatemia. También, la IRC se caracteriza por presentar hiperaldosteronismo, con niveles de aldosterona muy sobre lo normal. Estudios recientes han demostrado que el hiperaldosteronismo tendría un efecto deletéreo en el sistema cardiovascular. Esta acción nociva de aldosterona se ejercería en forma directa sobre las células de la pared arterial, por mecanismos que están siendo investigados.

Hasta hace algunos años, se creía que la arterioesclerosis se debía a un proceso físico-químico. Sin embargo, ahora se conoce que la calcificación de la túnica media arterial ocurre mediante un mecanismo general, consistente en la captación activa de fosfato por el tejido vascular, mediada por un cotransportador sodio-fosfato (NaPi), utilizando el fosfato como sustrato para la formación de cristales de hidroxapatita. Además, las células de músculo liso vascular sufrirían un cambio fenotípico, consistente en la pérdida de marcadores de fenotipo contráctil y la activación de un programa de diferenciación osteocondrogénica.

Se han descrito tres familias del cotransportador de fosfato dependiente de sodio, denominadas NaPi-I, NaPi-II y NaPi-III. NaPi-III es el mediador de la captación de fosfato en los tejidos cardiovasculares, en los que se expresan dos isoformas: Pit-1 y Pit-2.

En el presente estudio se propone que niveles excesivos de aldosterona inducen arterioesclerosis. Este efecto sería secundario a la modulación de la actividad del cotransportador sodio-fosfato NaPi-III del tejido arterial.

El objetivo de este trabajo es determinar la potencial acción directa de la hormona aldosterona, como reguladora de la expresión y actividad de las isoformas NaPi-III en el tejido arterial, como también de la activación del programa de diferenciación osteocondrogénica de las células de músculo liso vascular.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

Arterioesclerosis e Insuficiencia Renal Crónica.

La calcificación arterial es un importante factor de riesgo asociado a morbilidad y mortalidad cardiovascular (Li *et al.*, 2006). Existen al menos cuatro variantes histoanatómicas de calcificación vascular: la calcifilaxis en arteriolas, calcificación valvular cardíaca, aterosclerosis o calcificación de la capa íntima arterial y arterioesclerosis o esclerosis de Mönckeberg, que ocurre en la túnica media o muscular (London *et al.*, 2003; Vattikuti y Towler, 2004) Los distintos tipos de calcificación cardiovascular ocurren como consecuencia de variadas condiciones, como envejecimiento, diabetes, hipercolesterolemia, función valvular mecánicamente anormal, hiperfosfatemia e insuficiencia renal crónica (IRC) (London *et al.*, 2003; Vattikuti y Towler, 2004; Mazzini y Schulze, 2005). La calcificación de la íntima puede ocurrir independientemente de la calcificación de la túnica media y viceversa, como también pueden coexistir ambas (Giachelli, 2004).

La arterioesclerosis o calcificación de la capa muscular arterial, desde un punto de vista fisiopatológico, además de representar una condición inflamatoria y protrombótica, contribuye al aumento de velocidad de la onda de pulso arterial y presión de pulso, aumento de rigidez de la pared arterial, con el consecuente aumento de la postcarga ventricular izquierda, favoreciendo el desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda y disminución de la perfusión coronaria (Giachelli *et al.*, 2001; London *et al.*, 2003).

Una situación clínica en que se observa un desarrollo rápido y agresivo de complicaciones cardiovasculares es la IRC, siendo la más característica la arterioesclerosis. En estos casos se presentan importantes alteraciones del metabolismo fosfo-cálcico, secundarias a la pérdida de parénquima renal. La disminución prolongada de la 1, 25-dihidroxi-vitamina D3 ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), la baja calcemia y/o aumentos en los niveles séricos de fosfato llevan al desarrollo de hiperparatiroidismo secundario e hiperplasia glandular. Esto lleva al desarrollo de osteodistrofia renal, lo que deriva en defectos en la remodelación del esqueleto, ya que la resorción ósea excede la formación de hueso, liberando el exceso de fósforo a la sangre, lo que lleva a una hiperfosfatemia (Hruska *et al.*, 2005) Estudios clínicos correlacionan el producto fosfo-cálcico con el

desarrollo de calcificaciones cardiovasculares, mientras que está ampliamente demostrado que alteraciones en el balance de calcio y fósforo típicas en pacientes con IRC promueve la calcificación vascular a través de múltiples mecanismos y podría explicar las altas tasas de muerte por enfermedades cardiovasculares, ya que la hiperfosfatemia y el aumento del producto fosfo-cálcico son predictores de morbi-mortalidad cardiovascular en estos pacientes (Ganesh *et al.*, 2001; Giachelli *et al.*, 2001).

Hasta hace algunos años, se suponía que la calcificación vascular representaba un proceso degenerativo de la pared vascular, un depósito “metastásico” de cristales de hidroxiapatita formado por un mecanismo físico-químico (Hruska *et al.*, 2005) y que por su frecuente asociación con la aterosclerosis era característica de las etapas terminales de la ateromatosis (Mazzini y Schulze, 2005). Sin embargo, en el último tiempo, se ha establecido que la mineralización vascular es un proceso activo y regulado. La arterioesclerosis implica la captación activa de fosfato, mediada por un cotransportador de fosfato dependiente de sodio presente en las células vasculares (Hruska *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006).

La calcificación de la túnica media arterial requiere que el tejido vascular capte fosfato en forma activa para formar cristales de hidroxiapatita. La acumulación de fosfato en el medio intracelular es el paso necesario para la formación de vesículas de matriz extracelular, que son liberadas y que calcifican (Reynolds *et al.*, 2004; Vattikuti y Towler, 2004; Hruska *et al.*, 2005). La captación de fosfato es dependiente del gradiente de la concentración de sodio intra-extracelular, ya que las proteínas transportadoras utilizan el gradiente de sodio para transportar activamente fosfato hacia el medio intracelular (Giachelli *et al.*, 2001; Giachelli, 2004).

Transportadores de fosfato implicados en arterioesclerosis.

Durante los años noventa se describieron tres isoformas del cotransportador sodio-fosfato, que son las proteínas que median la captación de fosfato mediante un mecanismo electroneutro (Werner *et al.*, 1998; Werner y Kinne, 2001; Collins *et al.*, 2004; Giachelli *et al.*, 2005). Estos transportadores han sido agrupados en tres familias, en base a su estructura, expresión tisular y mecanismos de regulación, denominadas NaPi-I, NaPi-II y NaPi-III. NaPi-I ha sido implicado en el transporte de fosfato en hígado, cerebro y riñón,

aunque su papel en la homeostasis de fosfato es discutido. NaPi-II tiene un papel dominante en la reabsorción de fosfato en el túbulo renal y se expresa en la membrana apical de las células del túbulo proximal (Werner *et al.*, 1998; Werner y Kinne, 2001). NaPi-III es el mediador de la captación de fosfato en los tejidos cardiovasculares, en los que se expresan dos isoformas: Pit-1 (también llamada Glvr-1 o SLC20A) y Pit-2 (también llamada Ram-1 o SLC20A2). Éstos tienen expresión ubicua en los tejidos, encontrándose en riñón, cerebro, pulmón, hígado, hueso, corazón y vasos sanguíneos (Zoidis *et al.*, 2004). En células de músculo liso vascular humanas se encuentran ambas isoformas de NaPi-III. Pit-1 es la isoforma predominante, con una abundancia que sería 8 veces mayor que Pit-2 (Li *et al.*, 2006). Se ha identificado también la presencia de Pit-1 y Pit-2 en el tejido arterial de la rata (Giachelli *et al.*, 2005; Pino, 2006).

Regulación de Pit-1; Papel del fosfato.

Los mecanismos reguladores del transporte de fosfato en el tejido arterial son prácticamente desconocidos. El papel fisiológico de los NaPi-III no ha sido aclarado y aunque su participación en la calcificación vascular es clara, probablemente tienen una función más general, como permitir la captación de fosfato para la fosforilación oxidativa (Giachelli *et al.*, 2005).

La elevación en la concentración plasmática de fosfato, hiperfosfatemia, es una condición de alta prevalencia en los pacientes insuficientes renales crónicos. En estudios clínicos transversales, la hiperfosfatemia muestra una fuerte asociación con la mortalidad cardiovascular y el riesgo de desarrollar arterioesclerosis (Ganesh *et al.*, 2001; Giachelli *et al.*, 2001). Ello llevó a investigar, si las concentraciones altas de fosfato eran capaces de inducir la calcificación de las células de músculo liso arteriales. Los estudios *in vitro* han demostrado que la incubación de las células con medios ricos en fosfato, en concentraciones similares a las que se observan en la IRC, son suficientes para desencadenar calcificación (Giachelli *et al.*, 2001). La actividad de Pit-1 es necesaria para que ocurra la calcificación, ya que su inhibición farmacológica con ácido fosfonofórmico (inhibidor competitivo), bloquea completamente la calcificación inducida por el medio rico en fosfato (Jono *et al.*, 2000; Giachelli *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2006). Además, el bloqueo de la expresión de Pit-1 en células de músculo liso vascular con RNA de interferencia, disminuye significativamente la calcificación inducida por medios ricos en fosfato, mientras

que la posterior sobreexpresión de Pit-1 en las células deficientes en este gen, restaura la captación de fosfato y la calcificación inducida por éste (Li *et al.*, 2006). Estos resultados demuestran que Pit-1, vía captación de fosfato, juega un rol crítico en la calcificación de células de músculo liso vascular en respuesta a elevado fosfato (Jono *et al.*, 2000; Giachelli *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2006).

Diferenciación osteocondrogénica en la arterioesclerosis.

Además de la captación de fosfato, la arterioesclerosis se asocia a la activación de un programa de diferenciación osteocondrogénica de la célula muscular lisa de la pared arterial (Giachelli *et al.*, 2005; Hruska *et al.*, 2005). En respuesta al fosfato extracelular elevado, las células musculares lisas de la pared arterial se des-diferencian y pierden la expresión de proteínas características de su linaje, como actina de músculo liso y SM22 (Steitz *et al.*, 2001). Junto con esto, se activa un programa de expresión de genes similar al que expresan los osteocondroblastos, llamado el programa de diferenciación osteocondrogénica, que culmina con calcificación. En estos casos se desarrolla una osificación intramembranosa, la que no requiere un precursor cartilaginoso para calcificar (Hruska *et al.*, 2005).

Arterias humanas y de animales de experimentación calcificadas expresan los factores de transcripción *Core binding factor • 1* (Cbfa-1, también llamado RunX2-Osx2), Osterix y MSX2 típicos de osteocondrogénesis y osificación intramembranosa (Steitz *et al.*, 2001; Tyson *et al.*, 2003; Hruska *et al.*, 2005), cuya expresión es inducida por proteínas morfogénicas de hueso o BMP (Vattikuti y Towler, 2004; Hruska *et al.*, 2005). Cbfa-1 se expresa abundantemente en la íntima y capa media de arterias calcificadas; por el contrario, su expresión es mínima en las arterias sanas de los mismos pacientes, o en arterias de pacientes que no evidencian arterioesclerosis (Steitz *et al.*, 2001).

El factor de transcripción Cbfa-1 se ha considerado la molécula que controla la diferenciación osteoblástica en el tejido vascular. Estudios del mecanismo de calcificación han demostrado que *in vitro* su expresión es modulada por el aporte de fosfato al medio de cultivo, aumentando por la incubación en medios ricos en fosfato o por la adición de moléculas orgánicas donadoras de fosfato (Hruska *et al.*, 2005). Es importante destacar que el bloqueo de la actividad NaPi-III con ácido fosfonofórmico en células de músculo

liso vascular, además de detener la calcificación, es suficiente para bloquear la expresión de Cbfa-1, aún en un medio rico en fosfato (Jono *et al.*, 2000; Giachelli *et al.*, 2001). Estudios recientes demostraron que el bloqueo de la expresión de Pit-1 en células de músculo liso vascular sometidas a medios ricos en fosfato, se acompaña también del bloqueo en el aumento de expresión de Cbfa-1 y osteopontina, esta última considerada un marcador de calcificación (Li *et al.*, 2006).

Papel potencial de aldosterona en la calcificación vascular.

La aldosterona, actuando como mineralocorticoide, es la señal endocrina final en el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) que apunta al epitelio de riñón y colon para regular la secreción de potasio y la reabsorción de sodio, con su equivalente osmótico de agua, estableciendo el volumen sanguíneo y por ende la presión sanguínea (Booth *et al.*, 2002).

El SRAA desempeña un importante papel en la regulación de la homeostasis hidroelectrolítica y de la presión arterial. Su activación está implicada en la génesis de la hipertensión arterial, la cardiopatía isquémica y la insuficiencia cardiaca y renal (Núñez *et al.*, 2006) Hasta ahora, las acciones de aldosterona han sido analizadas principalmente en los epitelios de transporte, donde estimula la reabsorción de sodio y excreción de potasio modulando la actividad de transportadores iónicos. Sin embargo, se sabe que aldosterona ejerce también importantes acciones extrarrenales, mediadas por la activación de receptores de mineralocorticoides (MR) presentes en corazón, cerebro y vasos sanguíneos y se ha demostrado que puede actuar directamente, ejerciendo efectos deletéreos sobre el sistema cardiovascular (Stowasser, 1995; Rocha y Stier, 2001; Stier *et al.*, 2002; Núñez *et al.*, 2006).

A nivel celular, aldosterona se une al receptor citosólico de mineralocorticoides. Este receptor se expresa en cardiomiocitos, músculo liso vascular, fibroblastos cardíacos y células endoteliales (Takeda *et al.*, 1995; Silvestre *et al.*, 1998). En la modulación génica, el MR actúa como un factor de transcripción activado por ligando, que se une a un elemento con capacidad de respuesta para los mineralocorticoides. La unión de aldosterona a sus receptores forma un complejo hormona-receptor que se transloca al núcleo, donde interactúa con regiones específicas del DNA localizadas en la región

promotora. Esto da lugar a la activación de la transcripción de diversos genes, que conlleva la estimulación o supresión de la síntesis de mRNA, que codifica las proteínas causantes de las acciones fisiológicas de la aldosterona (Booth *et al.*, 2002; Núñez *et al.*, 2006).

Estudios clínicos y experimentales demuestran que los niveles excesivos de aldosterona provocan hipertensión arterial, fibrosis vascular y miocárdica, hipertrofia e insuficiencia cardíaca (Stowasser, 1995; Rocha y Stier, 2001; Stier *et al.*, 2002). Esto se ha traducido en que los antagonistas de los MR hayan pasado de ser diuréticos ahorradores de potasio a convertirse en una alternativa terapéutica en el tratamiento de diversas enfermedades cardiovasculares (Núñez *et al.*, 2006). En pacientes insuficientes cardíacos, tanto humanos como caninos, el uso de antagonistas del MR, espironolactona o eplerenona, en dosis bajas (no-diuréticas), mejoran dramáticamente la morbilidad y sobrevida ¹ (Pitt *et al.*, 1999; Pitt, 2004).

Estudios recientes han demostrado que la eplerenona bloquea la aterosclerosis tanto en roedores (Pitt, 2004) como en primates no humanos (Takai *et al.*, 2005) y la espironolactona bloquea la arterioesclerosis en roedores (Pino, 2006). Estos datos sugieren que aldosterona podría modular los mecanismos pro-arterioescleróticos, como la actividad y/o expresión de las isoformas NaPi-III.

Estudios preliminares de nuestro laboratorio, muestran que espironolactona es efectiva en la prevención de la hipertrofia cardíaca y dilatación de la raíz aórtica de la uremia experimental en la rata. Esto sugiere que el hiperaldosteronismo y/o el MR vascular podrían tener un importante papel deletéreo en la IRC, mediando remodelación y daño arterial. Además, la uremia experimental junto con una dieta rica en fosfato, inducen hiperfosfatemia y aumentos de los depósitos de calcio aórtico. También se demostró que el mRNA de Pit-1 medido con RT-PCR presenta un dramático aumento (3 veces) en ratas urémicas respecto a animales controles, mientras que ratas urémicas y con tratamiento con espironolactona presentaron valores similares al grupo control. Sin embargo, la uremia no produjo variación significativa en el transcrito de Pit-2, mientras que al tratarlas con espironolactona los valores de mRNA de Pit-2 fueron menores, aunque sin alcanzar significancia estadística (Pino, 2006).

¹ MARTINEZ, R. 2006. [Comunicación personal]. U. de Chile, Fac. de Cs. Veterinarias y Pecuarias.

HIPÓTESIS.

Aldosterona estimula directamente la actividad y/o la expresión de las isoformas NaPi-III en el tejido vascular. La acción de esta hormona se asocia a la activación del programa de diferenciación osteocondrogénica de las células musculares lisas de la pared arterial.

OBJETIVO GENERAL.

Identificar la potencial participación de aldosterona como regulador positivo de la actividad y/o la expresión de las isoformas NaPi-III y del programa de diferenciación osteocondrogénica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Estudiar el efecto de la participación de aldosterona en la actividad de NaPi-III, midiendo la captación de ^{32}P en tejido arterial sometido a altas concentraciones de esta hormona.
2. Estudiar el efecto de aldosterona en la expresión proteica de la isoforma Pit-1 mediante *western blot*.
3. Estudiar el efecto de aldosterona en la expresión génica de Cbfa-1, marcador de diferenciación osteocondrogénica, mediante PCR en tiempo real.
4. Estudiar el efecto de espironolactona, inhibidor del MR, como antagonista de las acciones de aldosterona.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Animales experimentales.

Durante el período en que se llevó a cabo este estudio, se utilizaron alrededor de 100 ratas macho de la cepa Sprague Dawley de 150 a 180 g de peso, que fueron mantenidas según las recomendaciones para manejo y cuidado de animales de experimentación "Guide for the use of Laboratory Animals" del *National Institute of Health*, en un bioterio de tipo convencional, con ciclos luz/oscuridad de 12/12 horas, a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura y humedad controlada de 30-60%.

Modelo experimental de IRC en ratas.

Con el fin de inducir insuficiencia renal crónica se realizó nefrectomía 5/6. En una primera etapa se realizó nefrectomía completa del riñón derecho. Una semana después se realizó nefrectomía parcial del izquierdo (dos tercios). Para efectuar las cirugías las ratas fueron anestesiadas con Ketamina (Drag Pharma Invetec) 115,5 mg/Kg de peso corporal más Xilazina (Agroland-Alfasan) 2,9 mg/Kg de peso mediante inyección intraperitoneal. Se aisló el riñón derecho, que fue decapsulado procurando no dañar la glándula adrenal y se ligó la arteria, vena renal y uréter para luego extirpar el riñón. En el caso del riñón izquierdo, se hicieron dos ligaduras hasta estrangular los polos cefálico y caudal, lo que a continuación fueron cortados y cauterizados con un electro bisturí (B1600 MP, Deltronix). Luego de cada cirugía se suturó la capa muscular y la piel por planos y la rata fue mantenida a temperatura constante hasta su recuperación.

Se estudiaron tres grupos de ratas: control (SHAM) con cirugía ficticia, urémicas con nefrectomía 5/6 (NPX) y urémicas con nefrectomía 5/6 que recibieron 15 mg/Kg/día de espironolactona (NPXspi), incluida en una preparación especial del alimento diario. Todos los grupos recibieron dieta rica en fosfato (1,2% de fósforo). Las ratas fueron sacrificadas seis semanas después de la segunda cirugía para la obtención de muestras.

Explantos de arterias aortas.

Para la obtención del tejido aórtico, se utilizaron ratas sanas, las cuales recibieron 250 μL de Heparina Sódica (por vía intraperitoneal) (Laboratorios Sanderson 5.000 UI/mL) y al cabo de al menos 30 min fueron decapitadas. Se extrajo la arteria aorta en condiciones estériles, la cual se mantuvo en Krebs-Ringer-Bicarbonato-Glucosa (KRB): 4,2 mM KCl, 1,19 mM KH_2PO_4 , 120 mM NaCl, 24 mM NaHCO_3 , 1,2 mM MgSO_4 , 1,3 mM CaCl_2 y 5 mM d-glucosa, pH 7,4. Las porciones torácica y abdominal de la aorta fueron limpiadas bajo lupa, preparándose cuatro a seis trozos de 3 a 5 mm de longitud. Los explantes se pusieron en placas de cultivo con D-MEM alto en glucosa (Gibco) suplementado con 1% Glutamina (US Biological), 1% Aminoácidos no esenciales (HyClone), 10% Suero fetal bovino FBS (HyClone) y 1% Penicilina–Estreptomina (10.000 U/mL Penicilina, 10 mg/mL Estreptomina, Gibco). Las placas se incubaron en atmósfera humidificada, 5% CO_2 , 37°C (WaterJacket CO_2 Incubator, Shel Lab).

Estimulación de los explantes aórticos.

Los segmentos arteriales fueron incubados por 18 a 24 h en presencia de aldosterona (10^{-9} , 10^{-8} y 10^{-7} M). Para probar el papel del receptor de mineralocorticoides se utilizó espironolactona ($5 \cdot 10^{-6}$ M). Aldosterona y espironolactona fueron preparadas como soluciones *stock* (10^{-4} M y $5 \cdot 10^{-3}$ M respectivamente) y la concentración final de etanol en el cultivo fue $< 0,01\%$.

En todos los casos, se realizaron experimentos paralelos con explantes aórticos en condiciones de control, a cuyo medio de cultivo sólo se le agregó el vehículo.

De esta manera, se obtuvieron los siguientes grupos experimentales de explantes: CONTROL (vehículo), ALDO (concentraciones de 10^{-9} a 10^{-7} M), SPI (espironolactona $5 \cdot 10^{-6}$ M) y ALDO+SPI (aldosterona 10^{-7} M más espironolactona $5 \cdot 10^{-6}$ M).

Medición de la actividad de NaPi-III en aorta.

La actividad del cotransportador sodio-fosfato NaPi-III se midió mediante captación de ácido ortofosfórico marcado con ^{32}P (^{32}P), sensible a arseniato de sodio o ácido

fosfonofórmico (PFA), inhibidores farmacológicos de NaPi-III, en explantes aórticos torácicos de los distintos grupos experimentales. Los explantes o anillos aórticos se montaron en ganchos de plata y se arrastraron suavemente sobre un papel secante para remover su endotelio. Luego los anillos se montaron en viales que contenían KRB. Los tejidos se preincubaron por 25 min a 37°C en baño termorregulado (Dubnoff), gasificado con 95% O₂/5% CO₂, con agitación constante. Después de este tiempo, los explantes correspondientes, fueron cambiados a viales con KRB + arseniato de sodio 10 mM o PFA 1 mM, donde se mantuvieron por 10 min. La medición de la actividad de NaPi se inició al traspasar los explantes a nuevos viales que contenían KRB + ³²P (1800 cpm/mL) o bien KRB + ³²P + arseniato de sodio o PFA durante 10 min. Finalmente, los anillos aórticos fueron lavados con KRB frío y se pusieron en viales con 2 mL de Tween 20 (Sigma) al 0,1%, los cuales fueron llevados a un Contador de Centelleo Líquido (1600 TR, Packard), donde se determinó su radioactividad medida en cuentas por minuto (cpm). La diferencia entre la captación total de ³²P en ausencia y presencia de arsenato de sodio o PFA corresponde a la actividad de NaPi-III, la que se expresó en cpm/mg tejido-húmedo/10 min.

Extracción de proteínas.

Para la obtención de muestras de proteína se utilizó la arteria aorta torácica y abdominal. Luego del estímulo correspondiente, cada arteria fue triturada manualmente durante 10 min en un homogeneizador vidrio-vidrio a 4°C, el cual contenía 200 µL de tampón de carga (0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 40% Glicerol, 8% SDS, 2% •-Mercaptoetanol y 0,5% Azul de Bromofenol). Luego el homogeneizado se traspasó a un tubo de 1,5 mL para ser centrifugado a 10.000 xg durante 10 min a 4°C (Centrifuge 5415 R, Eppendorf). El sobrenadante obtenido se traspasó a un nuevo tubo de 0,6 mL y se almacenó a -20°C.

Western Blot.

En una cámara de electroforesis (Hoefer miniVE, Amersham Bioscience) se preparó un gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) con 2 fases, resolutorio al 10% y concentrador al 4%, con espesor de 1,5 mm. Se cargaron primeramente 10 µL de Marcador de Peso Molecular (Prestained Protein Marker, BioLabs: 175, 83, 62, 47.5, 32.5, 25, 16.5, 6.5), para estimar la posterior

ubicación de Pit-1, cuyo peso molecular es de 93 kDa, y luego 65 µg de proteína de cada muestra a estudiar. Se utilizó tampón de corrida (Tris 1,5%, Glicina 7,2%, SDS 0,5%) y se realizó la electroforesis para separar las proteínas utilizando una fuente de poder PS 3002 (Gibco BRL-Life Technologies) a 200 Volt durante 5 min y luego a 150 Volt hasta el final de la corrida del frente de migración, lo que tomó alrededor de 2 h.

Para la transferencia semiseca se utilizaron papeles filtro (Paper Sheets Chromatography, Sartorius) y membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Millipore). Se usaron 3 soluciones tampones: cátodo (25 mM Tris, 40 mM Glicina, Metanol 10% v/v, pH 9,4), ánodo I (0,3 M Tris, Metanol 10% v/v, pH 10,4) y ánodo II (25 mM Tris, Metanol 10% v/v, pH 10,4). Se utilizó una cámara de transferencia (Transblot-SD, BioRad), en la que se montaron los componentes desde el polo ánodo de la siguiente manera: 2 filtros ánodo I, 1 filtro ánodo II, membrana, gel y finalmente 3 filtros cátodo. La transferencia se llevó a cabo a miliamperaje constante, el que se calculó multiplicando el área del gel por 5,5 y se mantuvo por 1 h y 15 min. Finalizada la transferencia el gel se tiñó con Azul de Coomassie (Merck) y luego se aplicó solución de destinción (40% Metanol, 10% Ácido acético) para observar proteínas que no hubieran sido transferidas. La membrana fue teñida con solución de Rojo Ponceau (Ponceau 0,2%, Ácido tricloro acético 0,3%, Ácido sulfosalicílico 3%, Ácido acético 1%) y luego se lavó con suficiente agua hasta poder observar claramente las bandas de proteína transferida teñida. La membrana se llevó a un scanner (HP Deskjet F380 All-in-One, Hewlett-Packard) para analizar posteriormente la imagen con el programa Photoshop 7.0. Luego, se removió completamente la tinción con NaOH 0,1 N y se lavó 3 veces con TTBS (20 mM Tris-Cl, 136 mM NaCl, 0,001% Tween 20, pH 8).

Para evitar la unión de proteínas inespecíficas al anticuerpo, se bloqueó la membrana en leche descremada al 5% en solución TTBS con agitación constante durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo primario anti Pit-1 (Monoclonal Anti-Mouse PIT-1, Alpha Diagnostic) diluido en TTBS más leche al 5% (dilución 1:100) con agitación constante durante toda la noche a 4°C. Luego se lavó 3 veces durante 5 min con TTBS y se incubó con el anticuerpo secundario (Anti-mouse IgG, H & L Chain specific (Goat) Peroxidase Conjugate, Calbiochem) diluido en TTBS más leche al 5% (dilución 1:5.000) con agitación constante durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavó 5 veces durante 5 min con TTBS.

Para el revelado, la membrana se incubó durante 2 min con reactivo quimioluminiscente (Western Lightning: Enhanced Luminol Reagent y Oxidizing Reagent, Perkin Elmer) preparado en proporción 1:1, luego se puso en un cassette con pantallas intensificadoras, en contacto con una película fotográfica (Biomax, Kodak) que luego fue revelada y fijada (Revelador y reforzador; Fijador y reforzador, GBX Kodak). Posteriormente la imagen obtenida fue escaneada y la intensidad de las bandas fue cuantificada con el programa Adobe Photoshop 7.0.

Previo a la utilización de los homogeneizados, se determinó la concentración de proteínas presente en cada muestra. Se preparó un gel de poliacrilamida, en el que se cargaron concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA, Rockland) en forma creciente para construir una curva estándar y luego con 4 μ L de cada muestra a cuantificar, en duplicado. Luego de la electroforesis el gel se tiñó con azul de Coomassie para visualizar las proteínas. Con el programa Adobe Photoshop 7.0 se midió la intensidad de las bandas, para luego comparar los valores de la curva de BSA con los de la carga proteica de cada muestra.

El control de carga de proteínas de las distintas muestras transferidas a la membrana se verificó mediante determinación de la cantidad de α -actina presente en cada una, con un anticuerpo específico (Monoclonal Anti α -Actin, Sigma), o también cuantificando las bandas teñidas con Rojo Ponceau en la membrana mediante el programa Adobe Photoshop 7.0. Ambos métodos demostraron ser eficientes, con resultados similares entre sí. Con estos valores se normalizó la abundancia de Pit-1 obtenida en cada western blot.

Extracción de RNA.

Se extrajo RNA de los explantes aórticos de los distintos grupos experimentales. Trozos de aorta de 3 a 5 mm de largo fueron homogeneizados en 1 mL de Trizol (Invitrogen) 8 veces durante 10 seg cada uno a 4°C en homogeneizador Pro 200 (PRO Scientific inc) y luego se dejaron durante 10 min a temperatura ambiente. El lisado obtenido fue traspasado a un tubo de 1,5 mL, donde se agregaron 0,2 mL de cloroformo, se mezcló 10 veces por inversión y luego 20 seg en vortex, se incubó a temperatura ambiente por 3 min y posteriormente se centrifugó a 7.000 xg durante 15 min a 4°C en

microcentrífuga (Centriguge 5415 R, Eppendorf). Luego de centrifugar se formaron dos fases, la superior acuosa se traspasó a un nuevo tubo de 1,5 mL agregándole 500 μ L de isopropanol 75% frío y 2 μ L de glycoblu (Ambiom) y luego se agitó en vortex durante 20 seg. La muestra fue almacenada a -20°C por media hora y luego centrifugada a 7.000 xg durante 10 min a 4°C , con lo cual el RNA precipitó formando una pella. Se removió el isopropanol y se lavó la pella con 1 mL de etanol 75% frío, agitando en vortex y centrifugando a 4.500 xg durante 5 min a 4°C , luego de lo cual se removió el sobrenadante y resuspendió la pella en 40 μ L de agua libre de nucleasas (Promega). Para eliminar la contaminación con DNA genómico, se traspasaron las muestras a un nuevo tubo de 0,6 mL, al que se le agregaron 4 μ L de 10X DNase I Buffer y 1 μ L de DNase I (2U/ μ L, Ambion) incubando por 30 min a 37°C en termociclador (Termal Cycler, ATC 401, Nyx Technik). Se detuvo la reacción con 5 μ L de DNase I Inactivation Reagent y se incubó por 2 min a temperatura ambiente con agitación ocasional. Posteriormente se centrifugó a 10.000 xg durante 2 min a temperatura ambiente y se removió el sobrenadante, el que fue mantenido en alícuotas a -80°C .

Electroforesis de RNA.

Para verificar que las muestras de RNA no presentaran degradación, se utilizó el método de electroforesis horizontal denaturante en gel de agarosa 1,2% (p/v) – Formaldehído 6% (v/v) en tampón MOPS (ácido 3-(N-morpholino) propanosulfónico 20 mM, Acetato de sodio 8 mM, EDTA 1 mM, pH 7,2). Las muestras fueron cargadas en el gel con la solución tampón de carga (Formamida 50% (v/v), Glicerol 25% (v/v), Azul de bromofenol 0,12% (p/v), Bromuro de etidio 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Formaldehído 20%) y la electroforesis se realizó a 90 Volt utilizando la fuente de poder PS 3002 (Gibco BRL-Life Technologies). Para la visualización de las bandas, el gel se expuso a luz ultravioleta obteniendo la imagen digital con el sistema de captura de imágenes Kodak DS 120, la cual fue analizada con el programa Adobe Photoshop 7.0 para determinar la abundancia relativa de las bandas de 28S y 18S con el fin de determinar la calidad del RNA, siendo un valor aceptable aquellas muestras que presentaron una razón 28S/18S superior a 2.

Transcripción Reversa.

La reacción de transcripción reversa, se llevó a cabo con el sistema de síntesis para RT-PCR Improm-II™ Reverse Transcription System (Promega). Se utilizaron 0,2 µg de RNA total junto a 1 µL de Random primers 100 µg/mL, mezcla que se llevó a un volumen de 5 µL con agua libre de nucleasas (Promega). La muestra se incubó en termociclador a 70°C por 5 min y luego a 4°C por otros 5 min. Simultáneamente se preparó una mezcla de reacción que incluyó: 4 µL de 5X RT Buffer Improm-II (tampón de reacción), 3µL de MgCl₂ 25 mM, 0,75 µL de dNTPs 10 mM, 0,5 µL de RNAout y 1 µL de Improm-II RVT, completando con agua libre de nucleasas un volumen final de 15 µL. Posteriormente esta segunda mezcla se agregó a la inicial y se incubó por 5 min a 25°C, luego 60 min a 42°C y por último 15 min a 70°C. El cDNA obtenido fue alicuotado y almacenado a -20°C hasta su uso posterior en reacciones de PCR.

Partidores.

Se utilizaron partidores específicos para Cbfa-1, los cuales fueron diseñados a partir de las secuencias de mRNA presentes en el GeneBank y el uso de un software disponible en Internet (Primer 3, MIT, USA) (Rozen y Skaletsky, 2000) con el cual se puede seleccionar parámetros como el tamaño deseado de producto a amplificar, las temperaturas de alineamiento, entre otros. Una vez diseñados, se probó la especificidad de éstos realizando un *Blast* de las secuencias de cada partidor.

rCbfa-1.

Sentido: GAG CTA CGA AAT GCC TCT GC

Antisentido: GGA CCG TCC ACT GTC ACT TT

Tamaño del producto a amplificar: 173 pb.

PCR en tiempo real.

El uso de esta metodología permite estimar la abundancia de producto de PCR, basado en la medición de fluorescencia emitida por una molécula llamada SYBR Green I, que se intercala en el DNA de doble hebra al final de cada ciclo de amplificación. De este

modo la fluorescencia emitida es directamente proporcional a la cantidad de DNA de doble hebra existente al final de cada ciclo, por lo que si se toma un punto en la curva de amplificación donde la reacción aún no está saturada, es posible cuantificar la abundancia del cDNA. De este modo, las curvas de amplificación de las distintas reacciones, mantienen una fluorescencia basal hasta un ciclo determinado, luego del cual el producto de la reacción aumenta en forma exponencial, lo que se ve reflejado en la fluorescencia. Al final de la fase exponencial la reacción se satura y las curvas de amplificación se aplanan, alcanzando una meseta.

La abundancia de mRNA se midió por técnica de RT-PCR en un termociclador de tiempo real (Mx 3000P, QPCR System, Stratagene) y el análisis de datos se realizó con el software propio del equipo. Se estandarizó la cuantificación de mRNA corrigiéndola en abundancia por un gen control, 18S ribosomal, que fue medido en todas las muestras bajo las mismas condiciones, lo que incluyó: Agua libre de nucleasas; Tampón de PCR; $MgCl_2$ 1,5 mM; dNTPs 0,2 mM, Taq 2U (Kit Taq Polimerasa, Fermentas), Partidor Sentido 0,5 μM , Partidor Antisentido 0,5 μM , SYBR Green 1/20.000 (Molecular Probes) con 2 μL de templado para la curva estándar y 2 μL de templado para las muestras.

El programa seleccionado para las curvas 18S consistió en un ciclo de denaturación inicial a 95°C por 1 min, luego 21 ciclos de amplificación que consisten en: denaturación a 93°C por 30 seg, apareamiento a 60°C por 18 seg y extensión a 72°C por 20 seg. La fluorescencia es entonces adquirida al final de la fase de extensión y la lectura se realiza a 85°C por 20 seg al final de cada ciclo. Posteriormente se realizó una curva de *melting* que va desde 78°C hasta 95°C donde se lleva a cabo la lectura de la fluorescencia, dejando las muestras a una temperatura final de 25°C.

RT-PCR para Cbfa-1.

Antes de realizar las mediciones de mRNA, fue necesario establecer las condiciones óptimas a utilizar. Se realizó una curva de magnesio, obteniendo una concentración óptima de 2,5 mM. También se determinó la temperatura óptima de apareamiento la cual resultó ser de 62°C. Una vez establecidas las condiciones ideales, se construyó una curva estándar para Cbfa-1 a partir de un amplificado de aorta de una rata control, previamente cuantificada por densitometría. Esto permite realizar una

regresión logarítmica de la intensidad de fluorescencia versus el ciclo de aparición del producto de PCR (Ct) cuya correlación permitió interpolar los Ct para cada una de las muestras analizadas.

Se preparó un medio de reacción final, el cual contenía: Agua libre de nucleasas, Tampón de PCR, $MgCl_2$ 2,5 mM, dNTPs 0,2 mM, GoTaq Flexi DNA Polimerasa 2U (Promega), Partidor Sentido 0,5 μ M, Partidor Antisentido 0,5 μ M, SYBR Green 1/20.000, usándose 18 μ L de medio más 2 μ L de estándar o 2 μ L de muestra.

El programa consistió en un ciclo de denaturación inicial a 95°C por 2 min, luego 34 ciclos de amplificación con: denaturación a 94°C por 20 seg, apareamiento a 62°C por 20 seg y extensión a 72°C por 20 seg. La fluorescencia fue adquirida al final de la fase de extensión y la lectura se realizó a 81°C por 7 seg al final de cada ciclo. Posteriormente se realizó una curva de *melting* desde 75°C hasta 93°C donde se llevó a cabo la lectura de fluorescencia, dejando las muestras a una temperatura final de 25°C.

A continuación se realizó electroforesis de DNA en gel de agarosa al 2% con Nucleic Acid Gel Star (Cambrex Bioscience, USA; 100 μ L por cada 50 mL de agarosa), para verificar que los productos obtenidos en la reacción de amplificación tuvieran el peso molecular esperado. Una vez comprobada la identidad de los productos de PCR, se utilizó el punto de denaturación como método de identificación del producto de PCR.

Análisis Estadístico.

Los resultados obtenidos se presentaron como promedio \pm error estándar. Las comparaciones estadísticas entre grupos experimentales se realizaron mediante la Prueba de t Student o Análisis de Varianza (ANDEVA) para muestras pareadas. Los promedios se consideraron con una diferencia estadísticamente significativa al tener un valor de $P < 0,05$.

RESULTADOS.

Efecto de la nefrectomía 5/6, con o sin tratamiento con espironolactona, sobre la actividad de NaPi-III en aorta.

Ratas Sprague Dawley fueron sometidas a nefrectomía 5/6 (NPX) u operación ficticia (SHAM, control). Un grupo de animales NPX recibió espironolactona (15 mg/Kg/día; NPXspi). Después de seis semanas los animales fueron sacrificados, obteniéndose segmentos aórticos, en los que se midió la actividad del cotransportador sodio-fosfato, sensible a arseniato de sodio, inhibidor de NaPi. La captación de fosfato en el músculo liso vascular de la aorta fue realizada en presencia de ^{32}P .

La Figura 1 incluye los resultados obtenidos en los 3 grupos de animales. Las ratas urémicas presentaron un significativo aumento en la actividad de NaPi respecto al grupo control (SHAM: 196 ± 8 ; NPX: 437 ± 128 cpm/mg tejido húmedo/10 min; $P < 0,05$). El tratamiento con espironolactona previno el efecto de la nefrectomía sobre la actividad de NaPi (NPXspi: 173 ± 38 cpm/mg tejido húmedo/10 min).

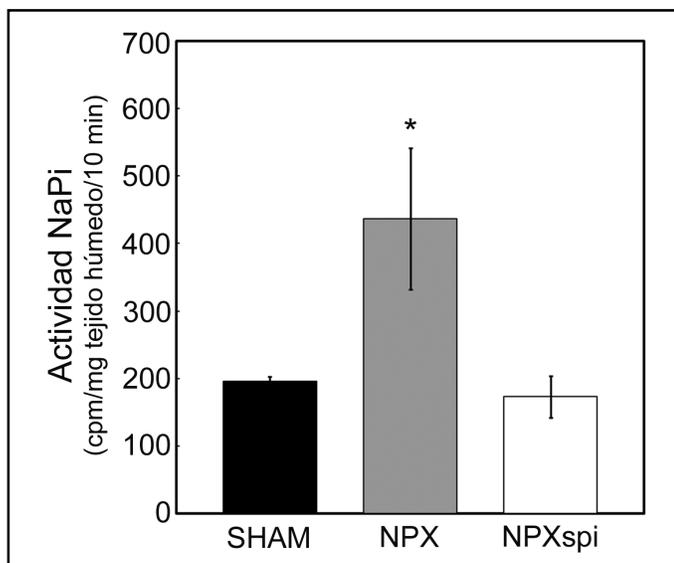


FIGURA 1: Efecto de la nefrectomía 5/6, con o sin tratamiento con espironolactona, sobre la actividad de NaPi-III en aorta. Se determinó la actividad NaPi como la captación de ^{32}P sensible a arseniato de sodio (10 mM) en los segmentos aórticos de las ratas de cada grupo experimental, SHAM (operación ficticia), NPX (nefrectomía 5/6), NPXspi (nefrectomía 5/6 más tratamiento con espironolactona, 15 mg/Kg/día). Se realizaron 4 experimentos en cada grupo, cada uno en triplicado. El asterisco indica $P < 0,05$ para grupo NPX vs SHAM y NPXspi.

Efecto de la nefrectomía 5/6, con o sin tratamiento con espironolactona, sobre la expresión proteica de Pit-1 en aorta.

Las ratas NPX (nefrectomía 5/6), NPXspi (nefrectomía y tratamiento con espironolactona, 15 mg/Kg peso) y SHAM (operación ficticia) fueron sacrificadas luego de seis semanas y se extrajo la arteria aorta torácica y abdominal. La abundancia relativa de Pit-1 se determinó mediante *western blot*, utilizando un anticuerpo específico para Pit-1.

La Figura 2 muestra el aumento en la abundancia de Pit-1 en las ratas urémicas del grupo NPX respecto de las ratas controles y las tratadas con espironolactona (SHAM: $1,334 \pm 0,139$; NPX: $2,205 \pm 0,337$; NPXspi: $1,027 \pm 0,328$ u.a.; $P < 0,05$ NPX vs SHAM y NPXspi).

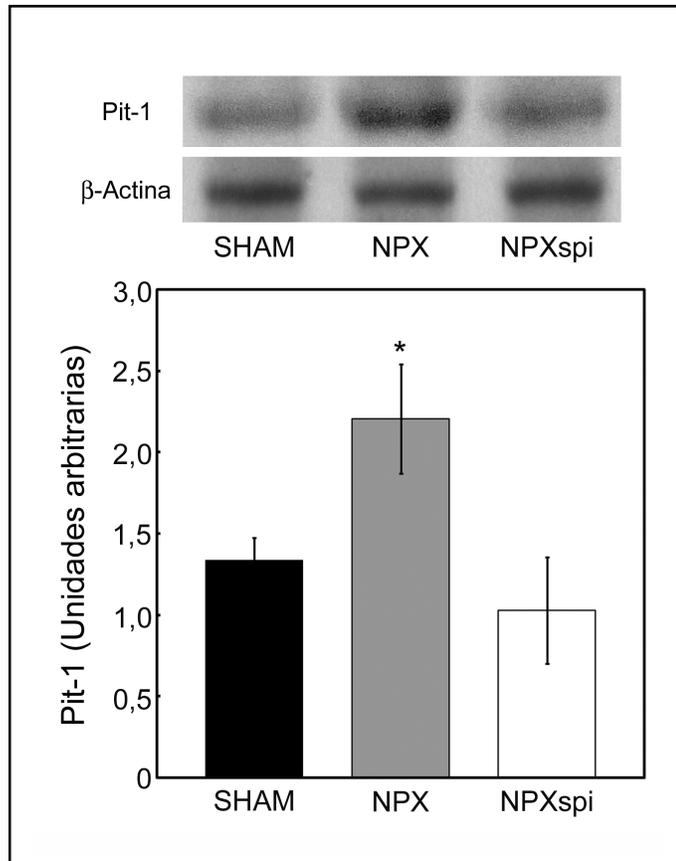


FIGURA 2: Efecto de la nefrectomía 5/6, con o sin tratamiento con espironolactona, sobre la expresión proteica de Pit-1. Se realizaron *western blot* para evaluar la abundancia proteica de Pit-1 en los grupos experimentales de ratas SHAM (operación ficticia), NPX (nefrectomía 5/6), NPXspi (nefrectomía 5/6 más tratamiento con espironolactona, 15 mg/Kg/día). El asterisco indica $P < 0,05$ para NPX vs SHAM y NPXspi. Se realizaron 4 experimentos de cada grupo.

Efecto del estímulo con aldosterona sobre la actividad de NaPi-III en explantes aórticos.

Para evaluar el efecto directo de aldosterona sobre la actividad de NaPi-III del tejido arterial, se midió la captación de fosfato en presencia de ^{32}P , sensible a inhibición farmacológica de PFA.

La Figura 3 incluye los resultados obtenidos en los grupos CONTROL y ALDO (10^{-7} M). Los explantes estimulados con aldosterona presentaron un significativo aumento en la actividad de NaPi (CONTROL: 242 ± 30 ; ALDO: 868 ± 67 cpm/mg tejido húmedo/10 min; $P < 0,01$ vs CONTROL).

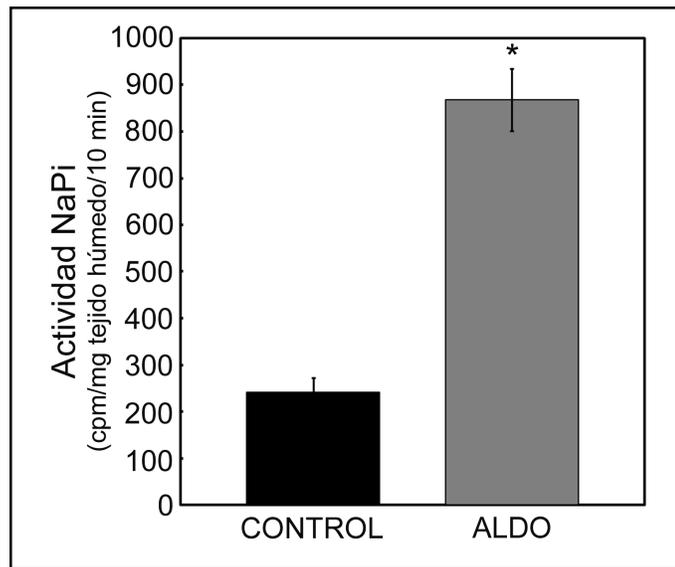


FIGURA 3: Efecto del estímulo con aldosterona sobre la actividad de NaPi-III en explantes aórticos. Los explantes fueron estimulados con aldosterona (10^{-7} M) o vehículo (CONTROL) durante 18 h. Posteriormente se determinó la actividad NaPi como la captación de ^{32}P sensible a PFA (1 mM) en los explantes aórticos. Se realizaron 6 experimentos control y 3 experimentos con estímulo de aldosterona, cada uno en triplicado. El asterisco indica $P < 0,01$ para grupo ALDO vs CONTROL.

Efecto del estímulo con aldosterona sobre la expresión proteica de Pit-1 en explantes aórticos.

Se obtuvieron homogeneizados proteicos a partir de arterias aortas estimuladas durante 24 h con distintas concentraciones de aldosterona (10^{-9} a 10^{-7} M) o vehículo (CONTROL). Luego se realizaron los *western blot* con anticuerpo específico para Pit-1.

En la Figura 4 se observa un aumento dosis dependiente de Pit-1 frente al estímulo con aldosterona en concentraciones crecientes (CONTROL: 1; ALDO 10^{-9} M: $1,228 \pm 0,197$; ALDO 10^{-8} M: $1,653 \pm 0,299$; ALDO 10^{-7} M: $2,051 \pm 0,440$ u.a.; obteniéndose una diferencia significativa en las dos últimas condiciones con respecto al grupo CONTROL; $P < 0,05$).

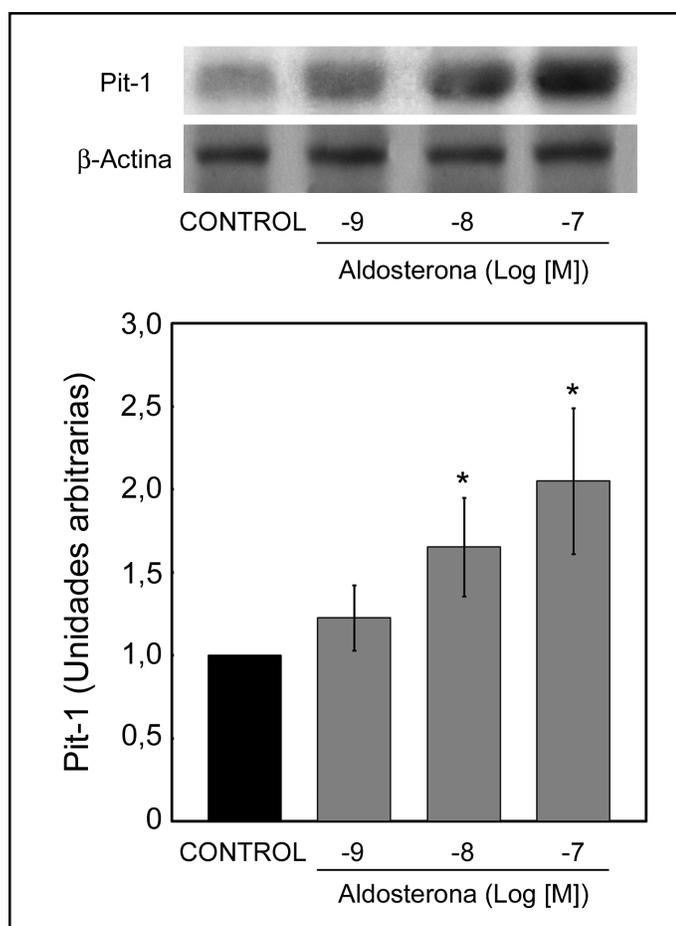


FIGURA 4: Efecto del estímulo con aldosterona sobre la expresión proteica de Pit-1 en explantes aórticos. La expresión proteica de Pit-1 se caracterizó mediante *western blot* en los explantes aórticos estimulados con distintas concentraciones de aldosterona (ALDO 10^{-9} a 10^{-7} M) y CONTROL (vehículo) El asterisco indica $P < 0,05$ para grupo CONTROL vs ALDO 10^{-8} M y ALDO 10^{-7} M. Se realizaron 6 experimentos para cada grupo.

Efecto del estímulo con aldosterona y la inhibición del MR con espironolactona sobre la expresión proteica de Pit-1 en explantes aórticos.

Para evaluar el efecto inhibitorio de espironolactona sobre la acción de aldosterona, se realizó un nuevo set de experimentos de expresión proteica.

Se obtuvieron homogeneizados a partir de arterias aortas estimuladas durante 24 h con espironolactona $5 \cdot 10^{-6}$ M (SPI), aldosterona 10^{-7} M (ALDO), aldosterona 10^{-7} M más espironolactona $5 \cdot 10^{-6}$ M (ALDO+SPI) y vehículo (CONTROL). Luego se realizaron los *western blot* con anticuerpo específico para Pit-1.

En la Figura 5 se observa la inhibición del efecto regulador positivo de aldosterona sobre Pit-1, a través de espironolactona, obteniendo resultados similares entre los grupos CONTROL, SPI y ALDO+SPI y un aumento significativo de Pit-1 en el grupo ALDO (CONTROL: 1; SPI: $1,032 \pm 0,072$; ALDO: $1,599 \pm 0,281$; ALDO+SPI: $1,045 \pm 0,120$ u.a.; $P < 0,05$).

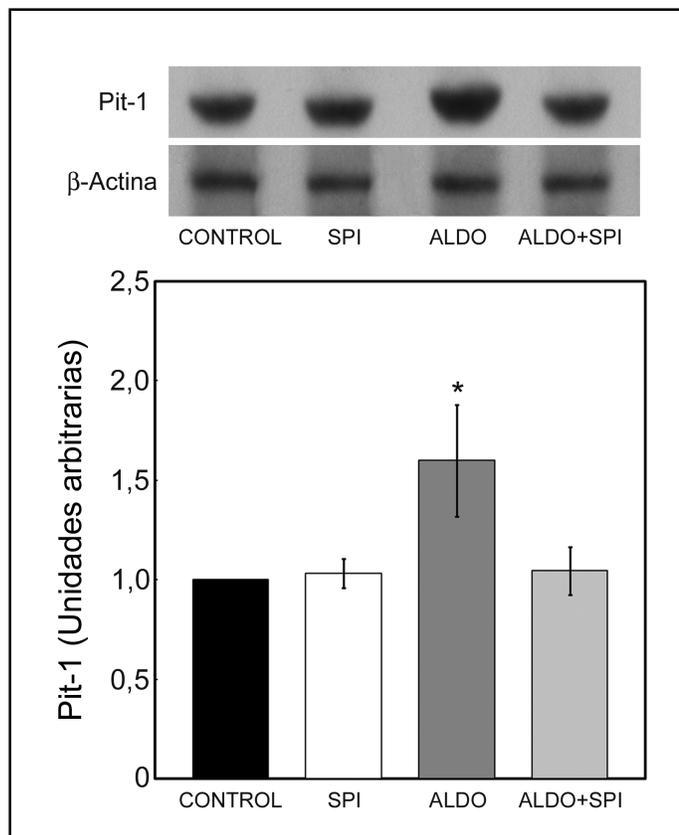


FIGURA 5: Efecto del estímulo con aldosterona y la inhibición del MR con espironolactona sobre la expresión proteica de Pit-1 en explantes aórticos. Se caracterizó la abundancia proteica de Pit-1 mediante *western blot* en los grupos experimentales de explantes aórticos CONTROL (vehículo), SPI (espironolactona $5 \cdot 10^{-6}$ M), ALDO (aldosterona 10^{-7} M) y ALDO+SPI (aldosterona 10^{-7} M más espironolactona $5 \cdot 10^{-6}$ M). El asterisco indica $P < 0,05$ para grupo ALDO vs CONTROL, SPI y ALDO+SPI. Se realizaron 5 experimentos para cada grupo.

Efecto del estímulo con aldosterona y la inhibición del MR con espironolactona sobre la expresión génica de Cbfa-1 en explantes aórticos.

Para evaluar el efecto de aldosterona y la inhibición por espironolactona, en la activación y desarrollo del proceso de diferenciación osteocondrogénica que ocurre en la arterioesclerosis, se evaluó mediante RT-PCR la abundancia relativa de mRNA del gen Cbfa-1 en los explantes de los distintos grupos experimentales. Los valores obtenidos se

normalizaron por un gen control, el 18S ribosomal, expresando la abundancia de Cbfa-1 como la razón Cbfa-1/18S.

En la Figura 6 se observa un aumento significativo en la abundancia del transcrito de Cbfa-1 en los explantes estimulados con aldosterona 10^{-7} M (ALDO), mientras que no existe una diferencia significativa entre los grupos CONTROL, SPI y ALDO+SPI, lo que demuestra el efecto inhibitorio de espironolactona sobre la acción de aldosterona (CONTROL: $0,92\pm 0,15$; SPI: $0,76\pm 0,27$; ALDO: $2,20\pm 0,71$; ALDO+SPI: $1,04\pm 0,25$ ng; $P < 0,05$).

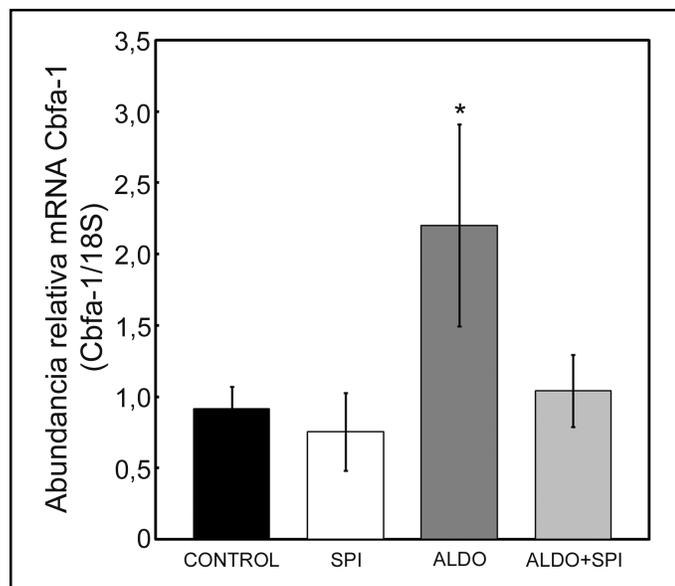


FIGURA 6: Efecto del estímulo con aldosterona y la inhibición del MR con espironolactona sobre la expresión génica de Cbfa-1 en explantes aórticos. Se extrajo RNA de los explantes aórticos estimulados durante 24 h con espironolactona 5×10^{-6} M (SPI), aldosterona 10^{-7} M (ALDO), aldosterona 10^{-7} M más espironolactona 5×10^{-6} M (ALDO+SPI) y vehículo (CONTROL). Luego se realizó la transcripción reversa y se obtuvo cDNA para cuantificación de mRNA de Cbfa-1 mediante PCR en tiempo real. El asterisco indica $P < 0,05$ para grupo ALDO vs CONTROL, SPI y ALDO+SPI. Se realizaron 6 experimentos por grupo.

DISCUSIÓN.

Una de las primeras causas de muerte en el mundo se atribuye a las enfermedades cardiovasculares. La IRC es una situación clínica en la que se observa un desarrollo rápido y agresivo de complicaciones cardiovasculares, siendo la calcificación arterial un importante factor de riesgo cardiovascular presente en los pacientes urémicos. Mientras la hiperfosfatemia y el aumento del producto fosfo-cálcico son predictores de morbi-mortalidad cardiovascular en estos pacientes (Ganesh *et al.*, 2001; Giachelli *et al.*, 2001), el hiperaldosteronismo que ellos presentan, también podría tener una implicancia directa sobre el daño cardiovascular, ya que diversos estudios demuestran que los niveles excesivos de aldosterona provocan hipertensión arterial, fibrosis vascular y miocárdica, hipertrofia e insuficiencia cardíaca (Stowasser, 1995; Rocha y Stier, 2001; Stier *et al.*, 2002).

Hasta hace algunos años, se pensaba que la calcificación vascular representaba un proceso degenerativo de la pared vascular, un depósito de cristales de hidroxapatita debido a un mecanismo físico-químico (Hruska *et al.*, 2005). Sin embargo, en el último tiempo, se ha demostrado que la arterioesclerosis es un proceso activo y regulado que depende de la captación activa de fosfato, mediada por un cotransportador de fosfato dependiente de sodio, NaPi-III (Giachelli *et al.*, 2005; Hruska *et al.*, 2005).

En el presente trabajo, se postuló relacionar algunos factores altamente asociados a alteraciones cardiovasculares, como son la insuficiencia renal crónica y el hiperaldosteronismo asociado a ésta, como también el aumento en la actividad y expresión de los transportadores de fosfato dependientes de sodio NaPi-III observada en la arterioesclerosis. El objetivo fue determinar si los niveles excesivos de aldosterona (*in vivo* e *in vitro*) tendrían un efecto regulador positivo sobre estos transportadores presentes en el tejido arterial.

Para inducir una IRC, los animales experimentales fueron sometidos a nefrectomía 5/6. En estudios previos de nuestro laboratorio se caracterizaron los parámetros plasmáticos de las ratas nefrectomizadas, observándose en los animales correspondientes al grupo NPX elevadas concentraciones de aldosterona, hiperfosfatemia, clearance de creatinina disminuido y aumento de potasio plasmático.

Además, estos animales presentaron proteinuria e hipertensión arterial, medida por el método de manguito en la cola (Pino, 2006).

Debido a que en los insuficientes renales existen numerosas alteraciones, tanto hormonales como minerales, un grupo de ratas nefrectomizadas recibió un inhibidor del receptor de aldosterona, espironolactona 15 mg/Kg/día, para antagonizar los efectos deletéreos del exceso de esta hormona en los animales urémicos.

La participación del MR también fue evaluada mediante la estimulación directa del tejido arterial con aldosterona, en presencia o ausencia de su antagonista, obteniendo explantes aórticos estimulados con distintas concentraciones de aldosterona (10^{-9} a 10^{-7} M) y/o espironolactona ($5 \cdot 10^{-6}$ M).

Al medir la actividad del cotransportador NaPi-III mediante la captación de ^{32}P , sensible a arseniato de sodio, en segmentos aórticos de los grupos experimentales SHAM, NPX y NPXspi, se observó un significativo aumento en la actividad NaPi en el grupo NPX, efecto que fue revertido por espironolactona en el grupo NPXspi (Figura 1). En el caso de los explantes aórticos, se utilizó un estímulo de aldosterona 10^{-7} M y como inhibidor farmacológico de NaPi se usó el ácido fosfonofórmico. En la Figura 3 se puede observar que la actividad NaPi en los explantes aórticos estimulados con aldosterona fue significativamente mayor que en los explantes controles, demostrando el efecto regulador positivo de aldosterona sobre la actividad de estos transportadores. Lamentablemente no se pudieron realizar más experimentos de este tipo debido a fallas consecutivas en la producción del isótopo por parte de la Comisión Chilena de Energía Nuclear, quienes tuvieron problemas en la preparación del ^{32}P , con lo que éste no pasó los requerimientos del control de calidad.

Mediante *western blot* se evaluó la expresión proteica de la isoforma Pit-1 y ésta se comparó entre los grupos. Nuevamente se observó un aumento en las ratas NPX respecto a SHAM y NPXspi (Figura 2), mientras que en los explantes estimulados se observó un aumento creciente en la abundancia proteica de Pit-1 frente al estímulo con concentraciones mayores de aldosterona (Figura 4), demostrando un efecto directo y dosis dependiente de la hormona sobre la abundancia del cotransportador.

Espironolactona inhibió el efecto de aldosterona sobre la abundancia de Pit-1 en los explantes aórticos (Figura 5).

La arterioesclerosis se asocia a la activación de un programa de diferenciación osteocondrogénica de la célula muscular lisa de la pared arterial (Giachelli *et al.*, 2005; Hruska *et al.*, 2005). Cbfa-1 es un factor de transcripción típico de osteocondrogénesis que se expresa abundantemente en arterias calcificadas (Steitz *et al.*, 2001; Tyson *et al.*, 2003; Hruska *et al.*, 2005) Estudios del mecanismo de calcificación han demostrado que su expresión aumenta en medios ricos en fosfato (Hruska *et al.*, 2005). El bloqueo de la actividad NaPi-III con ácido fosfonofórmico en células de músculo liso vascular, además de detener la calcificación, es suficiente para bloquear la expresión de Cbfa-1, aún en un medio rico en fosfato (Jono *et al.*, 2000; Giachelli *et al.*, 2001). Además, el bloqueo de la expresión de Pit-1 en células de músculo liso vascular sometidas a medios ricos en fosfato se acompaña también del bloqueo en el aumento de expresión de Cbfa-1 (Li *et al.*, 2006).

Luego de demostrar que aldosterona actúa modulando positivamente la actividad y expresión de los transportadores NaPi-III, se procedió a estudiar si este efecto podría repercutir en la activación del programa de diferenciación osteocondrogénica de las células de músculo liso de la pared arterial. Para lograr este objetivo, se extrajo RNA de los explantes arteriales estimulados con aldosterona y/o espironolactona, para luego realizar transcripción reversa y obtener cDNA, el cual fue utilizado para cuantificar la abundancia relativa de Cbfa-1 en los distintos grupos. La expresión del transcrito de este gen resultó ser significativamente mayor en los explantes estimulados con aldosterona respecto a los grupos control y los expuestos a espironolactona, como muestra la Figura 6, reafirmando el papel que ejerce aldosterona en la inducción de arterioesclerosis.

Los resultados obtenidos demuestran un efecto regulador positivo de aldosterona sobre el contranportador sodio-fosfato NaPi-III, quien participa activamente en el proceso de calcificación arterial, aumentando su actividad y abundancia. A través de esta acción, aldosterona también actúa como estímulo para la diferenciación osteocondrogénica que se desarrolla en las células de músculo liso vascular. Ambos efectos pueden ser revertidos por el inhibidor del MR espironolactona.

Es importante destacar la rapidez del efecto que tuvo aldosterona y la inhibición con espironolactona *in vitro*, ya que sólo se requirieron 24 h de estímulo del tejido arterial para desencadenar los procesos pro-arterioescleróticos mencionados en este trabajo.

Este estudio muestra la participación de aldosterona en la regulación de Pit-1 en el tejido arterial. Ya que Pit-1 sería un importante efector en la iniciación del proceso de diferenciación osteocondrogénica que desarrollan las células de músculo liso vascular y aldosterona representaría uno de los factores promotores del aumento de la actividad y expresión de estos transportadores, se podría apuntar a Pit-1 y/o aldosterona como blancos para terapias que ayuden a disminuir la arterioesclerosis en la IRC, lo cual disminuiría en forma considerable la morbi-mortalidad asociada a calcificación arterial, tan prevalente en los pacientes con deterioro de la función renal.

CONCLUSIONES.

- En la IRC inducida a las ratas del grupo NPX, se observa un aumento en la actividad de NaPi-III, medida como captación de ^{32}P sensible a arseniato de sodio, lo cual es revertible a través del tratamiento con espironolactona, inhibidor del MR.
- La abundancia proteica de Pit-1, caracterizada mediante *western blot*, fue mayor en las ratas urémicas (NPX) que en el grupo control y este aumento fue inhibido con el tratamiento con espironolactona en el grupo NPXspi.
- Se observó un aumento en la actividad NaPi, medida como captación de ^{32}P sensible a PFA, en el grupo de explantes aórticos estimulados con aldosterona respecto del grupo control.
- En los explantes aórticos, la abundancia proteica de Pit-1 aumentó linealmente frente al estímulo con concentraciones crecientes de aldosterona y este efecto regulador positivo de aldosterona sobre la expresión de Pit-1, fue inhibido por espironolactona.
- La abundancia relativa del gen Cbfa-1, marcador de osteocondrogénesis, fue significativamente mayor en los explantes arteriales estimulados con aldosterona, efecto que fue inhibido en los explantes expuestos a espironolactona.
- Se demostró, tanto *in vivo* como *in vitro*, que aldosterona participa directamente en el aumento de la actividad y expresión de NaPi-III, probablemente la isoforma Pit-1, como también en el desarrollo de diferenciación osteocondrogénica que ocurre en las células de músculo liso vascular. Estos efectos fueron revertidos por el antagonista del MR, espironolactona, confirmando la participación de aldosterona en estos procesos.

BIBLIOGRAFÍA.

1. **BOOTH, R.E.; JOHNSON, J.P.; STOCKAND, J.D.** 2002. Aldosterone. *Adv. Physiol. Educ.* 26: 8-20.
2. **COLLINS, J.F.; BAI, L.; GHISHAN, F.K.** 2004. The SLC20 family of proteins: dual functions as sodium-phosphate cotransporters and viral receptors. *Pflugers. Arch.* 447: 647-652.
3. **GANESH, S.K.; STACK, A.G.; LEVIN, N.W.; HULBERT-SHEARON, T.; PORT, F.K.** 2001. Association of elevated serum PO(4), Ca x PO(4) product, and parathyroid hormone with cardiac mortality risk in chronic hemodialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: 2131-2138.
4. **GIACHELLI, C.M.; JONO, S.; SHIOI, A.; NISHIZAWA, Y.; MORI, K.; MORII, H.** 2001. Vascular calcification and inorganic phosphate. *Am. J. Kidney. Dis.* 38(4 Suppl 1): S34-37.
5. **GIACHELLI, C.M.** 2004. Vascular calcification mechanisms. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15: 2959-2964.
6. **GIACHELLI, C.M.; SPEER, M.Y.; LI, X.; RAJACHAR, R.M.; YANG, H.** 2005. Regulation of vascular calcification. Roles of phosphate and osteopontin. *Circ. Res.* 96: 717-722.
7. **HRUSKA, K.A.; MATHEW, S.; SAAB, G.** 2005. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circ. Res.* 97: 105-114.
8. **JONO, S.; McKEE, M.D.; MURRY, C.E.; SHIOI, A.; NISHIZAWA, Y.; MORI, K.; MORII, H.; GIACHELLI, C.M.** 2000. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ. Res.* 87: E10-17.

9. **LI, X.; YANG, H.Y.; GIACHELLI, C.M.** 2006. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circ. Res.* 98(7): 905-912.
10. **LONDON, G.M.; GUERIN, A.P.; MARCHAIS, S.J.; 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: 1731–1740.
11. **MAZZINI, M.J.; SCHULZE, P.C.** 2005. Proatherogenic pathways leading to vascular calcification. *Eur. J. Radiol.* 57: 384-389.
12. **NUÑEZ, L.; CABALLERO, R.; GÓMEZ, R.; VAQUERO, M.; DELPÓN, E.; TAMARGO, J.** 2006. Mecanismo de acción de la eplerenona. *Rev. Esp. Cardiol. Supl.* 6: 31B-47B.
13. **PINO, K.** 2006. Potencial participación de Aldosterona sobre la expresión y actividad de los cotransportadores de fosfato dependientes de sodio (NaPi-III) en un modelo experimental de insuficiencia renal crónica. Tesis para optar al título de Bioquímico. Valparaíso, Chile. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Fac. de Cs. Básicas y Matemáticas. 39 pp.
14. **PITT, B.; ZANNAD, F.; REMME, W.J.; CODY, R.; CASTAIGNE, A.; PEREZ, A.; PALENSKY, J.; WITTES, J.** 1999. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized aldactone evaluation study investigators. *N. Engl. J. Med.* 341: 709-717.
15. **PITT, B.** 2004. Effect of aldosterone blockade in patients with systolic left ventricular dysfunction: implications of the RALES and EPHEBUS studies. *Mol. Cell. Endocrinol.* 217(1-2): 53-58.
16. **REYNOLDS, J.L.; JOANNIDES, A.J.; SKEPPER, J.N.; McNAIR, R.; SCHURGERS, L.J.; PROUDFOOT, D.; JAHNEN-DECHENT, W.; WEISSBERG, P.L.; SHANAHAN, C.M.** 2004. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and

phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15: 2857-2867.

17. **ROCHA, R.; STIER, C.T. Jr.** 2001. Pathophysiological effects of aldosterone in cardiovascular tissues. *Trends. Endocrinol. Metab.* 14: 308-314.
18. **ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J.** 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. [en línea]. <<http://frodo.wi.mit.edu/>>. 1p. [consulta: abril 2007].
19. **SILVESTRE, J.S.; ROBERT, V.; HEYMES, C.; AUPETIT-FAISANT, B.; MOUAS, C.; MOALIC, J.M.; SWYNGHEDAUW, B.; DELCAYRE, C.** 1998. Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. physiological regulation. *J. Biol. Chem.* 273: 4883-4891.
20. **STEITZ, S.A.; SPEER, M.Y.; CURINGA, G.; YANG, H.Y.; HAYNES, P.; AEBERSOLD, R.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G.; GIACHELLI, C.M.** 2001. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ. Res.* 89(12): 1147-1154.
21. **STIER, C.T. Jr.; CHANDER, P.N.; ROCHA, R.** 2002. Aldosterone as a mediator in cardiovascular injury. *Cardiol. Rev.* 10: 97-107.
22. **STOWASSER, M.** 1995. New perspectives on the role of aldosterone excess in cardiovascular disease. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 28:783-791.
23. **TAKAI, S.; JIN, D.; MURAMATSU, M.; KIRIMURA, K.; SAKONJO, H.; MIYAZAKI, M.** 2005. Eplerenone inhibits atherosclerosis in nonhuman primates. *Hypertension.* 46: 1135-1139.
24. **TAKEDA, Y.; MIYAMORI, I.; YONEDA, T.; IKI, K.; HATAKEYAMA, H.; BLAIR, I.A.; HSIEH, F.Y.; TAKEDA, R.** 1995. Production of aldosterone in isolated rat blood vessels. *Hypertension.* 25: 170-173.

25. **TYSON, K.L.; REYNOLDS, J.L.; McNAIR, R.; ZHANG, Q.; WEISBERG, P.L.; SHANAHAN, C.M.** 2003. Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23: 489-494.
26. **VATTIKUTI, R.; TOWLER, D.A.** 2004. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 286: E686-696.
27. **WERNER, A.; DEHMELT, L.; NALBANT, P.** 1998. Na⁺-dependent phosphate cotransporters: the NaPi protein families. *J. Exp. Biol.* 201(Pt 23):3135-3142.
28. **WERNER, A.; KINNE, R.K.** 2001. Evolution of the Na-P(i) cotransport systems. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280(2): R301-312.
29. **ZOIDIS, E.; GHIRLANDA-KELLER, C.; GOSTELI-PETER, M.; ZAPF, J.; SCHMID, C.** 2004. Regulation of phosphate (Pi) transport and NaPi-III transporter (Pit-1) mRNA in rat osteoblasts. *J. Endocrinol.* 181: 531-540.

ANEXO: GLOSARIO.

ALDO: Aldosterona 10^{-9} , 10^{-8} ó 10^{-7} M
ALDO+SPI: Aldosterona 10^{-7} M más espironolactona $5 \cdot 10^{-6}$ M
ANDEVA: Análisis de Varianza
BMP: Proteína Morfogénica de Hueso
BSA: Albúmina Sérica Bovina
Cbfa-1: *Core binding factor • 1*
cDNA: Ácido Desoxirribonucleico complementario
cpm: Cuentas por minuto
D-MEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
dNTP: Desoxinucleósidos Trifosfatos
DPC: Dietilpirocarbonato
EDTA: Ácido Etilendiamino-tetra-acético
g: Gramo(s)
h: Hora(s)
IRC: Insuficiencia Renal Crónica
kDa: Kilodalton
Kg: Kilogramo(s)
KRB: Krebs-Ringer-Bicarbonato-Glucosa
M: Molar
mg: Miligramo(s)
MgCl₂: Cloruro de magnesio
min: Minuto(s)
mL: Mililitro(s)
mm: Milímetro(s)
mM: Milimolar
MOPS: Ácido 4-Morfolinopropanosulfónico
MR: Receptor de Mineralocorticoides
mRNA : Ácido Ribonucleico mensajero
NaPi: Cotransportador sodio-fosfato
NPX: nefrectomía 5/6
NPXspi: nefrectomía 5/6 más tratamiento con espironolactona

pb: Pares de bases
PCR: Reacción de Polimerasa en Cadena
PFA: Ácido Fosfonofórmico
PVDF: Fluoruro de Polivinilideno
RNA: Ácido Ribonucleico
RT-PCR: Reacción de Polimerasa en Cadena en Tiempo Real
SDS: Dodecil Sulfato de Sodio
seg: Segundo(s)
SHAM: control, cirugía ficticia
SPI: Espironolactona $5 \cdot 10^{-6}$ M
SRAA: Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
TTBS: Tris-Base Salino más Tween 20
u.a.: Unidades arbitrarias
UI: Unidades Internacionales
 μ g: Microgramo(s)
 μ L: Microlitro(s)
vs: Versus
1,25(OH)₂D₃: 1, 25-dihidroxi-vitamina D3
³²P: Ácido Ortofosfórico marcado con ³²P