

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO**



**SCUOLA DI DOTTORATO IN  
SCIENZE BIOCHIMICHE, NUTRIZIONALI E METABOLICHE**

**Dipartimento di Medicina, Chirurgia ed Odontoiatria**

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN  
FISIOPATOLOGIA, FARMACOLOGIA, CLINICA E  
TERAPIA DELLE MALATTIE METABOLICHE  
CICLO XXIV**

**STUDIO DEI MECCANISMI PATOGENETICI  
COINVOLTI NELLA PROGRESSIONE DELLE  
CALCIFICAZIONI VASCOLARI INDOTTE DA  
ELEVATI LIVELLI DI FOSFORO**

*Coordinatore del dottorato:* Chiar.ma Prof.ssa Anna Maria Di Giulio

*Relatore:* Prof. Mario Cozzolino

*Correlatore:* Dr.ssa Paola Ciceri

*Dottorando:* Dott.ssa Elisa Maria Volpi

*Matricola:* R08388

Anno Accademico 2010-2011

# **INDICE**

<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>4</b>
1. <i>CELLULE MUSCOLARI LISCE .....</i>	5
2. <i>CALCIFICAZIONI VASCOLARI.....</i>	7
3. <i>CALCIFICAZIONI VASCOLARI IN CORSO DI UREMIA.....</i>	9
4. <i>FOSFORO E CALCIFICAZIONI VASCOLARI IN CORSO DI UREMIA.....</i>	11
4.1 <i>Omeostasi del Fosforo .....</i>	11
4.2 <i>Dedifferenziazione cellulare.....</i>	15
4.3 <i>Induzione del fenotipo osteoblastico.....</i>	16
5. <i>PROTEINE COINVOLTE NELLO SVILUPPO DELLE CALCIFICAZIONI VASCOLARI .....</i>	18
6. <i>ACIDO ASCORBICO .....</i>	24
6.1 <i>Ruolo dell'Acido Ascorbico nel paziente uremico .....</i>	26
7. <i>SOSTANZE CHE CONTROLLANO LA FOSFATEMIA .....</i>	28
7.1 <i>Lantanio.....</i>	28
8. <i>CALCIUM SENSING RECEPTOR (CaSR) .....</i>	31
9. <i>AGONISTI E MODULATORI ALLOSTERICI DEL CaSR.....</i>	34
9.1 <i>Agonisti ortosterici o Calcimimetici di tipo I.....</i>	35
9.2 <i>Modulatori allosterici positivi o Calcimimetici di tipo II.....</i>	38
9.2.a <i>Utilizzo dei calcimimetici in clinica .....</i>	39
<b>SCOPO .....</b>	<b>41</b>
<b>MATERIALI E METODI.....</b>	<b>43</b>
1. <i>Espianto e coltura di VSMCs di aorta di ratto.....</i>	44
2. <i>Induzione della calcificazione .....</i>	45
3. <i>Colorazione con Alizarin red .....</i>	46

4. Misurazione dei livelli di calcio .....	47
5. Valutazione dell'espressione proteica .....	48
6. Estrazione di RNA, retrotrascrizione e Real Time RT-PCR.....	50
<b>RISULTATI .....</b>	<b>52</b>
1. Induzione della calcificazione di VSMCs di aorta di ratto.....	53
2. Acido Ascorbico e Calcificazioni Vascolari .....	55
2.1 Effetto dell'acido ascorbico sulla calcificazione di VSMCs.....	55
2.2 Effetto dell'acido ascorbico sulla differenziazione osteoblastica di VSMCs.	58
2.2.a Effetto dell'Acido Ascorbico sull'espressione proteica di $\alpha$ -actina .....	58
2.2.b Effetto dell'Acido Ascorbico sull'espressione genica di <i>Cbfa1</i> .....	60
3. Lantanio Cloruro e Calcificazioni Vascolari.....	62
3.1 Effetto di Lantanio e Gadolinio sulla calcificazione di VSMCs .....	62
3.2 Effetto di Neomicina, Spermina e Calindol sulla calcificazione di VSMCs...	66
3.3 Effetto combinato di Lantanio e Calindol sulla calcificazione di VSMCs.....	69
3.4 Effetto del Lantanio sull'espressione proteica di $\alpha$ -actina e SM-22 $\alpha$ .....	70
3.5 Effetto di Lantanio sull'espressione genica di <i>Cbfa1</i> .....	73
3.6 Effetto del Lantanio sull'espressione genica di <i>MGP</i> .....	74
<b>DISCUSSIONE .....</b>	<b>75</b>
<b>CONCLUSIONI .....</b>	<b>96</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>99</b>

# **INTRODUZIONE**

# 1. CELLULE MUSCOLARI LISCE

La parete delle arterie è composta da tre strati concentrici eterogenei tra loro che, in ordine dal lume del vaso verso l'esterno, sono rappresentati dalla tonaca intima, dalla media e dall'avventizia. La tonaca intima è costituita da un sottile strato di cellule endoteliali che delimitano il lume del vaso e da una lamina elastica interna di tessuto connettivo elastico che presenta delle *fenestrae* per favorire gli scambi nutritizi (Ross, 1993). La tonaca media, che funge da sostegno ed elemento contrattile del vaso, è costituita in gran parte da cellule muscolari lisce (VSMCs, vascular smooth muscle cells), collagene, fibre elastiche e componenti della matrice del tessuto connettivo. L'avventizia infine è composta da fibroblasti, collagene e glicosaminoglicani ed è separata dalla tonaca media dalla lamina elastica esterna (Ross and Glomset, 1973).

Le VSMCs, che rivestono un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'integrità funzionale e strutturale della parete arteriosa grazie alla loro attività contrattile ed alla sintesi di matrice extracellulare vascolare, sono la popolazione cellulare maggiormente coinvolta nel processo di calcificazione vascolare.

Le VSMCs, a seconda dello stadio di sviluppo in cui si trovano, possono presentare diversi fenotipi e, anche in organismi adulti, possono subire un cambiamento nel loro fenotipo in risposta a stimoli di varia natura. Esprimono due fenotipi principali, contrattile o sintetico (Ross and Glomset, 1973). Quello contrattile è caratteristico delle VSMCs adulte, notevolmente differenziate, che

rappresentano la popolazione predominante nella tunica media delle arterie; sono cellule quiescenti caratterizzate da un'elevata espressione di geni che codificano per proteine come  $\alpha$ -actina, SM22 $\alpha$  (smooth muscle 22 alpha), miosina,  $\gamma$ -actina e calponina, tutte coinvolte nel mantenimento della struttura e della funzione dei miofilamenti (Iyemere et al., 2006; Shanahan and Weissberg, 1998). Tra queste,  $\alpha$ -actina e SM22 $\alpha$ , essendo altamente espresse dalle VSMC con fenotipo contrattile, vengono spesso utilizzate come markers delle VSMCs in coltura (Solway et al., 1995).

Il fenotipo sintetico è invece tipico delle cellule dedifferenziate che si trovano nelle fasi iniziali di sviluppo cellulare ed in condizioni patologiche ed è caratterizzato da incrementata espressione di geni che codificano per fattori di crescita e per citochine e da una ridotta espressione di proteine contrattili (Ross, 1993).

Il cambiamento fenotipico è spesso associato alla capacità di queste cellule di acquisire caratteristiche di diverse linee cellulari mesenchimali quali osteoblasti, condrociti ed adipociti, e questa inappropriata differenziazione sembra dovuta a diversi fattori presenti nell'area patologica (Iyemere et al., 2006).

## 2. CALCIFICAZIONI VASCOLARI

La mineralizzazione della matrice extracellulare è un processo fisiologico nell'osso, nei denti e nella cartilagine di accrescimento, ma deve risultare inibita in tutti i tessuti connettivi lassi come la parete dei vasi, i polmoni, la cute e gli organi interni, i quali funzionano in virtù della loro plasticità (Cozzolino et al., 2005). Nonostante la calcificazione possa colpire la matrice connettivale di ogni organo, i tessuti connettivi più soggetti a calcificazione sono il sistema cardiocircolatorio ed in particolare le pareti vascolari.

Esistono due principali tipi di calcificazioni vascolari (Mizobuchi et al., 2009): la calcificazione della tonaca intima (aterosclerosi) e la calcificazione della tonaca media (arteriosclerosi).

L'aterosclerosi è una patologia multifattoriale a decorso progressivo ed è al primo posto tra le cause di morte ed invalidità nei paesi industrializzati. Le lesioni aterosclerotiche si sviluppano principalmente in arterie di grosso e medio calibro quali aorta, coronarie, carotidi, arterie degli arti inferiori e del circolo cerebrale (Ross, 1993); a seconda del distretto in cui si sviluppa la placca aterosclerotica verrà favorito lo sviluppo di diverse manifestazioni cliniche, quali le malattie cerebrovascolari, le patologie vascolari periferiche e la cardiopatia ischemica (Ross, 1999). Un'eccessiva risposta infiammatoria e fibro-proliferativa a varie forme di "insulto" all'endotelio ed alla muscolatura liscia della parete arteriosa è alla base dello sviluppo della lesione aterosclerotica. Diversi sono i tipi d'insulto che possono determinare il danno endoteliale: quello meccanico, dovuto per



esempio a moti turbolenti del sangue come avviene in pazienti affetti da ipertensione arteriosa, oppure a operazioni di by-pass aorto-coronarico e/o di angioplastica; quello chimico, che può essere causato da tossine (fumo di sigaretta) o da ipercolesterolemia (Ross, 1993; Steinberg and Witztum, 1990).

Proliferazione, migrazione ed accumulo delle VSMCs nella tunica intima delle arterie sono eventi precoci e fondamentali nella formazione iniziale della placca aterosclerotica (Raines and Ross, 1993; Wissler, 1991). In risposta a stimoli chemiotattici, le VSMCs migrano infatti dalla tonaca media all'intima, passando nelle fenestrate della lamina elastica interna e qui modificano il loro fenotipo da contrattile a sintetico (Campbell et al., 1988; Schwartz et al., 1986). Il progressivo accumulo di VSMCs, lipidi, macrofagi e cellule dell'infiammazione hanno come conseguenza la formazione di una placca ateromatosa che porta ad un graduale restringimento del lume vasale e ad una predisposizione ad un evento trombotico.

Il secondo tipo di calcificazione vascolare è invece definito arteriosclerosi o sclerosi calcifica della media o anche calcificazione di Monckeberg, dal nome dell'anatomo-patologo tedesco che per primo la descrisse nel 1903 (McCullough et al., 2008). E' tipica dei pazienti di età avanzata con insufficienza renale cronica o con diabete di tipo II (Edmonds et al., 1982). Non ha esiti stenosi sul lume vascolare ma è caratterizzata da un irrigidimento della tonaca dei vasi conseguente allo sviluppo di calcificazioni focali a livello della media di vasi arteriosi; quelli più comunemente affetti da questa patologia sono le arterie femorali, tibiali, radiali, ulnari ed uterine (Shioi et al., 2001). Questo tipo di calcificazione può

coesistere in uno stesso vaso con una lesione aterosclerotica. E' un processo multifattoriale, a decorso progressivo, età correlato e suscettibile di ulteriore peggioramento in diverse condizioni patologiche. L'eziopatogenesi ed i diversi fattori coinvolti nello sviluppo e nella progressione di questo tipo di calcificazioni verranno ampiamente discusse in seguito.

### **3. CALCIFICAZIONI VASCOLARI IN CORSO DI UREMIA**

La malattia renale cronica o CKD (Chronic Kidney Disease) è una patologia ampiamente diffusa nella popolazione, caratterizzata dalla progressiva perdita della funzionalità renale con importanti conseguenze sia sulla qualità della vita che sulla prognosi degli individui affetti. In questi soggetti, le calcificazioni e la patologia cardiovascolare sono sempre più frequenti e rappresentano la prima causa di mortalità nei pazienti in dialisi (Ganesh et al., 2001).

Nel contesto dell'insufficienza renale, accanto ai fattori di rischio classici per malattia cardiovascolare, tra cui l'età anagrafica, l'ipertensione arteriosa, il diabete mellito, le dislipidemie, l'obesità, l'abitudine al fumo di sigaretta, il sesso maschile e la storia familiare, si affiancano anche fattori di rischio per patologia cardiovascolare tipici dell'uremia: l'età dialitica, l'anemia, lo stress ossidativo, la malnutrizione, la disfunzione endoteliale, l'infiammazione cronica, le calcificazioni cardiovascolari e le alterazioni del metabolismo minerale ed osseo (Cozzolino et al., 2008) (Cozzolino 2011).

A differenza di quanto accade nella popolazione generale, dove è maggiore il riscontro di calcificazioni intimali di tipo aterosclerotico con esiti stenosanti sul lume vascolare (London et al., 2005), in corso di uremia, oltre alle calcificazioni a carico dell'intima, si osservano anche frequenti calcificazioni a carico della tonaca media vascolare (calcificazione di Monckeberg) che, pur non influenzando il calibro del lume, causano un aumento della rigidità vascolare (Blacher et al., 2001).

La prevalenza di CV osservata nei soggetti affetti da CKD è spesso associata alle alterazioni del metabolismo minerale che caratterizzano questa popolazione; essendo infatti il rene coinvolto nell'omeostasi calcio-fosforica, col venir meno della sua funzionalità il bilancio di questi minerali risulta profondamente alterato.

Fisiologicamente il fosfato di calcio, idrossiapatite, si forma in vescicole che si legano ai condrociti nel tessuto osseo in via di formazione. In maniera simile, il fosfato di calcio può formare vescicole che si legano alle pareti arteriose dei pazienti con insufficienza renale cronica. Infatti, con il deteriorarsi della funzione renale, la ridotta escrezione urinaria di fosfato e il deficit di calcitriolo causano iperfosforemia e iperparatiroidismo secondario (Cozzolino et al., 2001). Queste alterazioni biochimiche provocano un'alterazione del metabolismo osseo, con rischio aumentato di sviluppare osteodistrofia renale e calcificazioni extrascheletriche.

## **4. FOSFORO E CALCIFICAZIONI VASCOLARI IN CORSO DI UREMIA**

In passato si riteneva che le CV fossero da attribuire alla semplice precipitazione passiva di cristalli di fosfato di calcio che si verifica quando i livelli sierici di prodotto calcio-fosfato superano la saturazione.

Negli ultimi anni numerosi studi hanno invece dimostrato come l'alterata omeostasi minerale inneschi un processo biologico attivo e che quindi nella patogenesi delle CV, accanto a fenomeni passivi di precipitazione, ci sia da considerare una componente di calcificazione attiva, in grado di riprodurre a livello vascolare i processi di ossificazione che si verificano fisiologicamente nel tessuto scheletrico (Cozzolino et al. 2011). Si parla pertanto di una vera e propria "ossificazione vascolare", attivamente regolata e modulata.

### **4.1 Omeostasi del Fosforo**

Tra i numerosi fattori coinvolti nell'eziopatogenesi delle calcificazioni vascolari in pazienti affetti da insufficienza renale cronica, l'alterato metabolismo del fosforo gioca un ruolo di primo piano (Mizobuchi et al., 2009).

Il fosforo inorganico (Pi) è abbondantemente presente sotto forma di fosfati in tutto l'organismo e svolge un ruolo chiave nella sintesi degli acidi nucleici, nei processi energetici della cellula, come tampone intracellulare nonché come componente essenziale del tessuto osseo, in cui è ampiamente distribuito (85% del pool, rispetto

al 14% nel comparto intracellulare e all'1% nei fluidi extracellulari) (Shanahan et al.).

La maggior parte del Pi assunto durante la dieta viene assorbito nel tratto gastrointestinale principalmente per diffusione passiva o tramite un cotrasportatore del fosfato dipendente dal sodio (Na-P tipo IIb), presente negli enterociti a livello della membrana baso-laterale. Circa 80-90% del Pi filtrato viene poi riassorbito a livello renale, nel tubulo prossimale, principalmente attraverso un differente cotrasportatore sodio-fosforo (Na-P tipo IIa) (Murer et al., 2003).

Diversi fattori sono coinvolti nel mantenimento dell'omeostasi del Pi all'interno dell'organismo. Paratormone (PTH) e Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) sono in grado di controllare i livelli ematici di fosforo tramite modulazione dell'espressione sulla membrana cellulare del cotrasportatore Na-PIIa; la 1-25(OH)VitD promuove l'assorbimento intestinale di Pi agendo invece sul cotrasportatore Na-PIIb. I livelli di fosforo vengono normalmente mantenuti tra 2,8 e 4,5 mg/dl (Shanahan et al.).

Nei pazienti affetti da insufficienza renale cronica il trasporto tubulare renale di fosforo è alterato a causa della riduzione o disfunzione della massa dei trasportatori, con conseguente aumento della ritenzione di fosfati. Inoltre la secrezione di paratormone (PTH), sostenuta dall'ipocalcemia, aumenta i livelli ematici di calcio e fosforo mobilizzandone il pool a livello osseo, ma non è efficace nell'indurre un'adeguata fosfaturia, principalmente a causa del progressivo ridursi del filtrato.

L'effetto che ne deriva è l'iperfosforemia, la quale si associa ad un rischio

cardiovascolare aumentato (Block et al., 2004). Elevati livelli di fosfato possono direttamente regolare il processo di calcificazione, non solo precipitando passivamente a livello extracellulare, ma anche interagendo in modo attivo con elementi intracellulari. Negli ultimi anni sono stati svolti numerosi studi *in vitro* su cellule umane ed animali al fine d'indagare l'effetto di elevate concentrazioni di fosfato sullo sviluppo e la progressione delle calcificazioni vascolari. I risultati emersi hanno mostrato come la stimolazione delle cellule con Pi induca la formazione di calcificazioni morfologicamente simili a quelle osservate nell'aorta e nelle valvole cardiache umane calcificate (Jono et al., 2000; Steitz et al., 2001). In particolare sembra che il Pi, ad elevate concentrazioni, induca la deposizione di cristalli di idrossiapatite e stimoli una modificazione fenotipica delle VSMC, portando le cellule a ridurre l'espressione di markers fenotipici del muscolo liscio ed inducendo invece l'espressione di markers osteoblastici.

Affinchè il fosforo espliciti queste azioni è necessario che superi la membrana cellulare e questo sembra avvenire grazie alla presenza sulla membrana delle VSMC di un cotrasportatore del fosfato sodio-dipendente (Jono et al., 2000).

Questi trasportatori sono proteine glicosilate la cui funzione è quella di trasportare il fosfato dall'ambiente extracellulare all'interno della cellula. Ne sono stati identificati tre tipi: i cotrasportatori di tipo I e II sono espressi prevalentemente negli epitelii renali e intestinali e, mentre il ruolo fisiologico del tipo I rimane ancora sconosciuto, il tipo II, come già accennato in precedenza, è fondamentale

per l'assorbimento intestinale e renale del Pi (Takeda et al., 1999). Il cotrasportatore di tipo III, di cui esistono due diverse sottospecie, chiamate Pit-1 e Pit-2, è espresso in molti tessuti e tipi cellulari tra cui rene, cervello, cuore, polmone, osteoblasti; è stato inoltre dimostrato essere il principale trasportatore Na-Pi presente nelle VSMC ed in particolare Pit-1 sembra essere la forma predominante espressa in queste cellule (Li et al., 2006).

Il trattamento di VSMC con un inibitore competitivo dei cotrasportatori Na-Pi, l'acido fosfonofornico (PFA), causa un'inibizione dose-dipendente dell'uptake di Pi, della calcificazione e della trasformazione fenotipica delle VSMC in senso osteoblastico (Chen et al., 2002; Jono et al., 2000). Inoltre, in VSMC che, tramite silenziamento, esprimono bassissimi livelli di mRNA e proteina di Pit-1, l'ingresso di Pi è significativamente minore rispetto ai controlli e la calcificazione risulta assente, sia in termini di deposizione di calcio, sia di differenziamento osteoblastico (Li et al., 2006). E' stato anche dimostrato che l'espressione di Pit-1 è aumentata in tessuti di aorta calcificati ottenuti da ratti trattati con una dieta ad alto contenuto di fosforo (Mizobuchi et al., 2006). Questi dati suggeriscono quindi che il trasporto di Pi attraverso Pit-1 è essenziale per indurre la mineralizzazione delle VSMC (Giachelli, 2009).

## 4.2 Dedifferenziazione cellulare

Negli ultimi anni molti studi *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato il ruolo del Pi nell'indurre calcificazioni vascolari. In particolare, le cellule muscolari lisce trattate con elevate concentrazioni di Pi sembrano perdere l'espressione di alcuni markers tipici del fenotipo muscolare contrattile, quali ad esempio  $\alpha$ -actina e SM22 $\alpha$ , acquisendo invece markers tipici di un fenotipo simil-osteoblastico come Core Binding Factor Alpha1 (Cbf $\alpha$ 1) e le proteine Osteocalcina e Osteopontina (Giachelli, 2003).

In particolare Steitz et al. hanno appurato come VSMC bovine trattate con elevate concentrazioni di Pi perdano l'espressione di entrambe le proteine muscolari  $\alpha$ -actina e SM22 $\alpha$  (Steitz et al., 2001). In uno studio di Montes de Oca et al. è stato messo in evidenza anche come in VSMC umane e in anelli di aorta di ratto trattati con elevate concentrazioni di Pi, ci sia un'aumentata metilazione del promoter della SM22 $\alpha$ . Questa modificazione porta ad una diminuzione dell'espressione di SM22 $\alpha$  e all'aumento dell'espressione del fattore di trascrizione osteoblastico Cbf $\alpha$ 1, dell'attività della Fosfatasi Alcalina (ALP) ed in generale ad un incremento della calcificazione (Montes de Oca et al. 2010). I livelli di  $\alpha$ -actina diminuiscono anche nei vasi calcificati di pazienti affetti da arteriolopatia calcifica uremica (Ahmed et al., 2001), una grave patologia caratterizzata da calcificazioni della tonaca media delle arteriole e necrosi del tessuto sottocutaneo, detta anche calcifilassi.



### 4.3 Induzione del fenotipo osteoblastico

In questo processo di differenziamento in senso osteogenico delle VSMC, sembra giocare un ruolo di primo piano l'induzione di Cbfa1, chiamato anche Runx2 (runt-related transcription factor 2), uno dei più importanti fattori di trascrizione che regolano lo sviluppo osseo (Ducy et al., 1997).

I fattori di trascrizione Runx1, Runx 2 e Runx 3 sono proteine eterodimeriche formate da una subunità  $\alpha$  legante il DNA ed una  $\beta$  in grado di aumentare l'affinità di legame della subunità  $\alpha$  al DNA (Levanon and Groner, 2004); sono caratterizzati da una comune sequenza di 28 amminoacidi chiamata Runt attraverso cui interagiscono con i promotori dei geni target (Ducy, 2000). Runx1 è essenziale soprattutto per lo sviluppo delle cellule del sistema ematopoietico (Okuda et al., 1996), mentre Runx3 gioca un importante ruolo nella regolazione della crescita delle cellule epiteliali gastriche (Li et al., 2002) e nella neurogenesi (Levanon et al., 2002); entrambi sembrano essere fondamentali per lo sviluppo dei timociti (Woolf et al., 2003). Runx2/Cbfa1 è invece considerato come il principale regolatore per la differenziazione degli osteoblasti e per la formazione ossea (Ducy, 2000); agisce legando delle specifiche sequenze nel DNA conosciute come OSE2 (osteoblast-specific cis-acting elements) (Ducy et al., 1997), che si trovano nei promotori di geni osso-specifici come collagene di tipo I e osteoprotegerina durante il periodo di differenziamento osteoblastico. Il livello di Cbfa1 aumenta continuamente durante tale differenziamento (Komori, 2008) e la sua attività è strettamente correlata ad interazioni con proteine regolatrici durante tutti gli stadi

maturativi delle cellule. Alcune delle proteine che interagiscono con Cbfa1, come Sp7/Osterix ed alcune proteine del segnale Wnt (Gaur et al., 2005), vengono esse stesse riconosciute come regolatori del differenziamento osteoblastico ed agiscono soprattutto bloccando il differenziamento in senso adipogenico e condrogenico di cellule mesenchimali e favorendo quello in senso osteoblastico (Komori, 2008).

Il ruolo di Cbfa1 come promotore dello sviluppo osseo è sostenuto anche da esperimenti *in vivo*: topi knockout per Cbfa1 muoiono appena dopo la nascita e mostrano assoluta assenza di calcificazione, mentre topi eterozigoti per la delezione di Cbfa1 sviluppano un difetto osseo specifico (Otto et al., 1997).

Cbfa1 è coinvolto nello sviluppo delle calcificazioni vascolari. Negli ultimi anni infatti molti studi hanno dimostrato come l'espressione di Cbfa1 sia notevolmente aumentata in VSMC stimulate con elevate concentrazioni di Pi (Jono et al., 2000; Steitz et al., 2001) parallelamente ad una perdita dei markers muscolari e ad un'induzione dell'espressione di proteine osteoblastiche come osteocalcina, osteopontina e collagene di tipo I (Johnson et al., 2006). Moe et al. hanno inoltre evidenziato la presenza di Cbfa1 in arterie calcificate di pazienti uremici e hanno mostrato che VSMC bovine trattate con il siero di questi pazienti esprimono Cbfa1 (Moe et al., 2003). L'attivazione di Cbfa1 mediante fosforilazione a carico delle MAPK (mitogen-activated protein Kinase) e di PKA (protein Kinase A) (Franceschi and Xiao, 2003), favorisce quindi l'induzione del fenotipo osteoblastico, promuovendo l'espressione della maggior parte delle proteine che formano la matrice ossea (Ducy et al., 1997; Thirunavukkarasu et al., 2000).

## **5. PROTEINE COINVOLTE NELLO SVILUPPO DELLE CALCIFICAZIONI VASCOLARI**

Negli ultimi anni sono state identificate molte proteine regolatrici della deposizione dei minerali nella matrice extracellulare e il delicato equilibrio esistente tra queste proteine sembra essere cruciale per l'attivazione del processo di calcificazione, così come avviene per l'osteogenesi. In condizioni fisiologiche, infatti, l'integrità dei vasi è assicurata dall'equilibrio di diversi fattori, tra cui si annoverano minerali, quali calcio e fosfato, e diverse proteine. In corso di CKD, fenomeni fisici e biologici si intersecano, alterando il fisiologico bilancio esistente tra questi fattori, che si sono dimostrati agire direttamente sullo sviluppo delle calcificazioni, sia a livello sistemico che locale. In particolare, alcune proteine come osteocalcina, bone morphogenic protein 2 e fosfatasi alcalina, sembrano in grado di indurre direttamente la formazione di calcificazioni extrascheletriche; al contrario altre come matrix GLA protein, fetuina-A e osteopontina sembrerebbero agire come agenti "protettori", in grado di ridurre e forse prevenire le calcificazioni (Cozzolino et al., 2005).

La fosfatasi alcalina (ALP) è un'idrolasi che catalizza la rimozione di gruppi fosfato. E' essenziale per la normale formazione ossea e viene considerata un marker fenotipico osteoblastico ed un indicatore precoce di calcificazione (Johnson et al., 2006). VSMC calcificate esprimono elevati livelli di questa proteina e stimoli pro-calcificanti ne aumentano l'attività (Shanahan et al., 1999). Il meccanismo mediante cui ALP regola la mineralizzazione della matrice

extracellulare è tramite l'inattivazione di due delle principali molecole inibitrici: i pirofosfati, che vengono idrolizzati da ALP (Lomashvili et al., 2008), e l'osteopontina (OPN). ALP infatti non permette che OPN venga fosforilata, impedendo così che possa svolgere la sua azione inibitoria (Jono et al., 2000). A tutto ciò si associa una simultanea liberazione di Pi che contribuisce a peggiorare la deposizione di calcio.

Le proteine morfogeniche dell'osso (BMP) sono un gruppo di circa 30 citochine multifunzionali fondamentali nei processi di rimodellamento osseo e osteogenesi (Hruska et al., 2005). Tra queste, una delle più studiate per il suo ruolo nelle CV è BMP-2. Questa proteina è espressa dalle cellule a livello della lesione aterosclerotica umana (Bostrom et al., 1993) e può essere indotta da diversi fattori quali: stress ossidativo, infiammazione e iperglicemia (Fukui et al., 2003; Parhami et al., 1997). E' stato dimostrato inoltre che i livelli di BMP-2 sono elevati nel siero di pazienti uremici e VSMC bovine coltivate con questo siero hanno incrementati livelli di Cbfa1, incremento che viene annullato dall'aggiunta di un inibitore di BMP-2 (Chen et al., 2006). Inoltre la secrezione di questa proteina aumenta progressivamente durante la calcificazione e la presenza di siero uremico promuove tale secrezione rispetto al siero normale (Chen et al., 2006).

L'Osteocalcina (OCN) è una proteina ossea non collagenosa Vitamina K-dipendente, sintetizzata dagli osteoblasti durante l'osteogenesi (Razzaque). I livelli di OCN sierici sono considerati marker dell'attività osteoblastica e della funzionalità ossea (Price et al., 1980); tali livelli sono particolarmente alti in

pazienti uremici a causa probabilmente di una diminuita clearance renale e di aumentato metabolismo osseo (Delmas et al., 1983). Levy et al. hanno dimostrato come questa proteina sia maggiormente espressa a livello della placca aterosclerotica e delle valvole cardiache umane calcificate rispetto a vasi sani (Levy et al., 1983). Inoltre, in un modello animale, è stata mostrata una correlazione positiva tra i livelli di OCN sierici e l'induzione nei ratti di una condizione di uremia e conseguente sviluppo di calcificazioni arteriose (Price et al., 2006). Anche *in vitro* è stato dimostrato come l'espressione di questa proteina sia aumentata in VSMC umane calcificate (Jono et al., 2000).

Come accennato precedentemente, accanto ai promotori del processo di calcificazione, esiste una serie di molecole che, agendo sia a livello locale che sistemico, possono inibire tale processo.

In particolare la Fetuina-A (o  $\alpha_2$  glicoproteina di Heremans Schmid), una proteina circolante prodotta dal fegato e abbondantemente presente nel siero dei soggetti sani, svolge un importante ruolo nel controllo delle CV, inibendo la formazione di cristalli di idrossiapatite nei siti di calcificazione (Heiss et al., 2003). Anche studi in modelli animali hanno dimostrato il ruolo protettivo della Fetuina: topi privi del gene per questa proteina mostrano infatti diffuse calcificazioni extrascheletriche che coinvolgono polmoni, rene, miocardio e cute (Schafer et al., 2003). I livelli circolanti di Fetuina hanno inoltre un'elevata rilevanza clinica: Ketteler et al. hanno infatti mostrato come bassi livelli sierici di Fetuina-A in pazienti in emodialisi siano associati ad un aumento della mortalità (Ketteler et al., 2003).

L'Osteopontina (OPN) è invece una sialoproteina multifunzionale, espressa per lo più in ossa, denti e rene (Steitz et al., 2002), con un'elevata affinità per l'idrossiapatite (Boskey et al., 1993). Molti studi *in vitro* hanno infatti riscontrato come questa proteina sia particolarmente espressa nei siti di calcificazione di placche aterosclerotiche umane e in valvole aortiche calcificate, localizzata sulla superficie dei depositi calcificati (Ikeda et al., 1993; O'Brien et al., 1995). OPN si è dimostrata in grado di modulare la crescita di cristalli di idrossiapatite inibendo la calcificazione di VSMC umane e bovine (Wada et al., 1999).

Di particolare interesse per i nostri studi si è dimostrata essere un'altra nota proteina inibente le calcificazioni, la Matrix Gla Protein (MGP).

MGP è una proteina di 84 aminoacidi, isolata per la prima volta nell'osso e presente anche a livello di rene, polmone, fegato e cellule muscolari lisce della tonaca media vascolare. La MGP deve il suo nome ai residui di acido  $\gamma$ -carbossiglutammico (Gla) presenti nella sua sequenza, i quali sono in grado di legare il calcio. La sintesi di tali residui necessita di una forma ridotta di vitamina K ( $KH_2$ ) come cofattore; pertanto la MGP appartiene alla famiglia delle sostanze vitamina K dipendenti (Price et al., 1976).

Le proprietà anti-calcificanti della MGP sono state evidenziate da studi su topi knockout, i quali poche settimane dopo la nascita muoiono per "frattura" dell'aorta. Nel modello animale infatti, accanto a una diffusa calcificazione delle cartilagini articolari, si osserva calcificazione della tonaca media vascolare dovuta alla trasformazione delle cellule muscolari lisce in cellule simil-condrocitiche, che

iniziano a deporre matrice ossea causando il quadro patologico della frattura vascolare (Luo et al., 1997). E' stato inoltre dimostrato come l'espressione di MGP nelle cellule della tonaca vascolare sia inversamente correlata con quella di altri geni tipici degli osteoblasti, quali ad esempio il collagene tipo II e l'osteocalcina. Inoltre MGP è in grado di legare, inibendolo, un potente pro-calcificante, la Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2), che si è dimostrata capace di indirizzare le cellule dei vasi in senso osteogenico (Proudfoot and Shanahan, 2006). Dallo studio di ratti trattati con un bifosfonato è emerso anche che Fetuina-A e MGP sono in grado di legarsi e formare un complesso ad alto peso molecolare che lega il calcio e il fosfato circolanti inibendone la cristallizzazione (Price et al., 2002). Se a tutto ciò si associa la capacità intrinseca di questa proteina di legare i cristalli di idrossiapatite (Roy and Nishimoto, 2002), risulta che la presenza di MGP è fondamentale per l'inibizione della mineralizzazione extracellulare ed una sua carenza o la sua ridotta attivazione possano quindi contribuire in maniera significativa al processo di calcificazione vascolare.

Oltre alle numerose proteine appena descritte, anche altre sostanze sono note per i loro effetti a livello delle CV. Un esempio è il pirofosfato inorganico (PPi), una molecola sintetizzata fisiologicamente a livello intracellulare per idrolisi di ATP ad AMP, noto per essere un potente inibitore delle CV. La quota di PPi in grado di inibire tali calcificazioni è quella extracellulare, che risulta ridotta nei pazienti con CKD rispetto alla popolazione con normale funzione renale (O'Neill et al.). Il PPi,

essendo una molecola carica negativamente, può uscire dalla cellula solo grazie a un trasportatore anionico specifico, Ankyrin (ANK), che regola il suo efflusso dal citosol; l'attività di ANK aumenta dunque i livelli extracellulari di PPi di concerto con l'azione di NPP1 (Ectonucleotide Pyrophosphatase/ Phosphodiesterase), un enzima legato sul versante esterno della membrana cellulare in grado di sintetizzare PPi a partire da ATP extracellulare (Harmey et al., 2004; Johnson et al., 2006). E' stato dimostrato che topi privi di NNP1 vanno incontro a diffuse calcificazioni ectopiche (Johnson et al., 2005), così come anche topi knockout per ANK (Mizobuchi et al., 2009). La diminuita sintesi di PPi causata da un deficit di NPP1 è correlata inoltre ad una sindrome umana congenita, la calcificazione arteriosa idiopatica infantile (Rutsch et al., 2003).



## 6. ACIDO ASCORBICO

L'acido ascorbico (AA), o vitamina C, è un chetolattone a sei atomi di carbonio idrosolubile; è una sostanza ubiquitaria che svolge molteplici funzioni fondamentali per la sopravvivenza di tutti gli organismi. In molte specie animali viene sintetizzato nel fegato a partire dall'acido glucuronico derivante dal glucosio (Chatterjee et al., 1975); tra i mammiferi, l'uomo ed alcuni primati hanno perso la capacità sintetica ed è quindi indispensabile che venga assunto tramite la dieta.

L'AA viene assorbito nella parte prossimale dell'intestino tenue per trasporto facilitato  $\text{Na}^+$ -dipendente e viene trasportato nel plasma dall'albumina. Entra nelle cellule di mammifero attraverso due cotrasportatori  $\text{Na}^+$ -dipendenti, SVCT1 e SVCT2, che mostrano una distinta distribuzione tissutale (Takanaga et al., 2004): SVCT1 è presente per lo più nei tessuti epiteliali, in particolare in quelli di intestino e rene, mentre SVCT2 è più ampiamente diffuso, soprattutto nei neuroni, osso e sistema endocrino. In particolare sembra che anche nelle VSMCs il trasporto di AA avvenga tramite il cotrasportatore SVCT2 (Qiao et al., 2009). L'AA viene internalizzato nelle cellule anche nella sua forma ossidata, acido deidroascorbico (DHA); in questo caso il trasporto avviene attraverso un meccanismo di diffusione facilitata che sfrutta gli stessi trasportatori del glucosio (Vera et al., 1993), in particolare GLUT1, GLUT3 e GLUT4 in un processo sodio indipendente. Il DHA viene poi efficientemente ridotto a livello intracellulare ad AA.

Come già accennato, l'AA gioca un ruolo essenziale in tutti gli organismi viventi, e questo grazie alla sua capacità di andare facilmente incontro, nei sistemi biologici, ad ossidazione. Tale caratteristica gli consente di agire sia da scavenger diretto dei radicali liberi e delle specie attive dell'ossigeno e dell'azoto, che da agente riducente in numerose tappe del normale metabolismo cellulare (Padh, 1991). La vitamina C favorisce inoltre l'assorbimento del ferro: è infatti in grado di convertire il  $Fe^{+3}$ , forma prevalente negli alimenti, a  $Fe^{+2}$ , più facilmente assorbibile dalle cellule della mucosa intestinale.

Nei sistemi cellulari l'AA funziona principalmente come cofattore in diverse reazioni e, tra queste, di vitale importanza è quella che porta alla sintesi del collagene, una proteina necessaria per la formazione del tessuto connettivo della pelle, dei legamenti e delle ossa (Barnes, 1969). L'AA permette infatti l'idrossilazione di prolina e lisina ad idrossiprolina e idrossilisina, indispensabili per la formazione di una struttura stabile e resistente. Questo composto è inoltre in grado di regolare direttamente la sintesi di collagene in fibroblasti umani indipendentemente dall'attività delle idrossilasi (Murad et al., 1981). Da uno studio di Farquharson et al. sembra che l'AA aumenti la produzione di matrice da parte dei condrociti e la sintesi della 1,25(OH)vitamina D, a cui si accompagna un incremento nell'espressione di recettori per la vitamina D (VDR). Tutto ciò potrebbe causare un'amplificazione nella risposta dei VDR alla Vitamina D con conseguente ulteriore stimolo della differenziazione terminale dei condrociti (Farquharson et al., 1998). Altaf et al. hanno inoltre dimostrato che la vitamina C

accelera la differenziazione condrogenica di una particolare linea cellulare (ATDC5, linea cellulare derivante da carcinoma embrionale murino) ed hanno confermato come il trattamento con AA stimoli l'espressione di markers condrogenici come il collagene di tipo II (Altaf et al., 2006; Hering et al., 1994). E' stato anche provato che il trattamento di pre-osteoblasti di topo (linea cellulare MC3T3-E1) con AA induce la formazione di matrice extracellulare da parte di queste cellule e stimola la sintesi di molte proteine osteoblastiche come fosfatasi alcalina e osteocalcina (Franceschi and Iyer, 1992; Franceschi et al., 1994).

## **6.1 Ruolo dell'Acido Ascorbico nel paziente uremico**

Come accennato in precedenza, il profilo di rischio cardiovascolare dei soggetti affetti da CKD è più complesso rispetto a quello della popolazione generale e, tra i fattori di rischio per patologia cardiovascolare tipici dell'uremia, è contemplata anche l'anemia cronica (Levin and Foley, 2000). Questa patologia è di origine multifattoriale: è infatti in parte dovuta alla ridotta produzione renale di eritropoietina che determina una minor stimolazione dell'eritropoiesi midollare, in parte alla ridotta vita media degli eritrociti causata dalla presenza in circolo di tossine uremiche, ed in parte al deficit nutrizionale di ferro cui vanno spesso incontro i pazienti in dialisi. Per ottimizzare la terapia dell'anemia in alcuni pazienti in emodialisi che risultano resistenti al trattamento con eritropoietina, viene somministrato acido ascorbico (Deved et al., 2009). Si ritiene infatti che questa molecola possa aumentare la responsività dell'organismo all'eritropoietina

in parte mobilitando il ferro dai suoi depositi tissutali, in parte agendo come antiossidante (Attallah et al., 2006). Sebbene l'efficacia di AA in tal senso non sia del tutto comprovata, esso viene somministrato a questi pazienti con un dosaggio di 500 mg endovena al termine della seduta dialitica, tre volte alla settimana. Poco studiati sono anche i possibili effetti collaterali della somministrazione endovena di AA sulle calcificazioni vascolari. Data infatti l'azione di AA nel favorire i fisiologici processi di ossificazione agendo come cofattore nella biosintesi del collagene intracellulare, nell'attivazione della fosfatasi alcalina e nella deposizione di calcio ad opera degli osteoblasti (Franceschi and Iyer, 1992), non si può escludere un suo ruolo anche nell'ossificazione vascolare patologica che si verifica nei pazienti in dialisi.

## 7. SOSTANZE CHE CONTROLLANO LA FOSFATEMIA

Il controllo dei livelli di fosforo avviene mediante riduzione dell'apporto dietetico, attraverso la rimozione dialitica e grazie all'utilizzo di farmaci chelanti del fosforo che riducono l'assorbimento intestinale dei fosfati (Mazzaferro et al. 2011). Tra questi ci sono: idrossido di alluminio, sali di calcio, sevelamer (un polimero non assorbibile, privo di alluminio o calcio) e carbonato di lantanio ( $\text{La}_2(\text{CO}_3)_3$ ).

### 7.1 Lantanio

Il Lantanio (La) è un sale metallico che esercita la sua attività chelante grazie all'elevata affinità che gli ioni lantanio hanno per il fosfato, con il quale formano un complesso insolubile e non assorbibile nel tratto gastrointestinale (Pennick et al., 2006). Viene assorbito in minima parte in seguito a somministrazione orale (biodisponibilità orale assoluta  $<0,002\%$ ) e la piccola frazione assorbita si lega alle proteine plasmatiche in notevole quantità ( $>99,7\%$ ) (Damment and Pennick, 2008). L'efficacia, la tollerabilità e il profilo di sicurezza di  $\text{La}_2(\text{CO}_3)_3$  sono stati dimostrati in numerosi studi clinici sia di breve che di lungo periodo (Altmann et al., 2007; Hutchison et al., 2008).

Da uno studio clinico di Toussaint et al. risulta inoltre che la somministrazione di  $\text{La}_2(\text{CO}_3)_3$  in pazienti in emodialisi è associata ad una riduzione della progressione di calcificazioni vascolari a livello dell'aorta, a differenza di quanto avviene invece in pazienti trattati con Carbonato di Calcio (Toussaint et al. 2011).

Diversi studi sperimentali sono stati svolti al fine d'indagare dei possibili effetti del La sulle calcificazioni vascolari. E' stato infatti dimostrato che il trattamento con  $\text{La}_2(\text{CO}_3)_3$  riduce lo sviluppo di CV in ratti in cui è stata indotta l'insufficienza renale cronica. Un saggio immunohistochemico su sezioni d'aorta di questi ratti ha messo in evidenza che negli animali trattati con La è minore l'espressione dei markers osteogenici Cbfa1 e collagene di tipo II, rispetto ai ratti non trattati (Neven et al., 2009). Anche in topi uremici knockout per l'ApolipoproteinaE, caratterizzati da accentuata aterosclerosi e diffuse CV (Massy et al., 2005), è stato dimostrato che la somministrazione di  $\text{La}_2(\text{CO}_3)_3$  ritarda la progressione delle CV e riduce l'espressione di collagene di tipo I a livello dell'aorta (Nikolov et al. 2011). Damment et. al hanno inoltre mostrato come il trattamento con  $\text{La}_2(\text{CO}_3)_3$  a lungo termine (22 settimane) riduca i livelli di fosforo sierici e di PTH in ratti con insufficienza renale cronica indotta dall'aggiunta di adenina alla dieta (Damment et al.; Tamagaki et al., 2006). Un altro modello animale è stato usato da Zhou et al.: in questo caso viene indotta nei ratti la formazione di calcificazioni vascolari mediante l'aggiunta di Vitamina D3 e nicotina alla dieta. In questi animali il trattamento con La, sottoforma di Lantanio Acetato, causa una riduzione dell'espressione a livello dell'aorta di OPN e Pit-1, una diminuzione dei livelli di Pi nel plasma e dell'attività della ALP ed un'aumentata espressione di MGP (Zhou et al., 2009).

Anche studi *in vitro* sono stati svolti per poter meglio comprendere il ruolo del La nell'ambito delle calcificazioni vascolari. In particolare, Shi Yu et al. hanno

dimostrato che il La, sottoforma di Lantanio Cloruro ( $\text{LaCl}_3$ ), è in grado di ridurre la deposizione di calcio e l'attività di ALP in VSMC di aorta di ratto stimulate con Pi e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; ciò sembra avvenire mediante l'attivazione di due delle tre principali vie del sistema di trasduzione del segnale delle MAPK, ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase) e JUNK1 (c-jun N-terminal kinase), che vengono fosforilate (Shi et al., 2009). Questi dati sono confermati da Shi YL. et al in uno studio del 2009, in cui osservano che  $\text{LaCl}_3$  è in grado di inibire la trasformazione fenotipica in senso osteoblastico di VSMC di aorta di ratto, riducendo l'aumento dell'attività della ALP, dell'espressione di  $\text{Cbfa1}$  e la concomitante perdita dell'espressione di  $\alpha$ -actina causati dalla stimolazione con Pi. Tali effetti, anche in questo caso mediati dall'attivazione di ERK1/2 e JUNK1, vengono completamente aboliti dall'inibizione di una proteina G sensibile alla Pertussina (Shi et al., 2009). Il La sembra quindi agire a livello delle VSMC grazie all'interazione con una proteina G a cui segue l'attivazione a valle delle MAPK.

Il La è noto essere un agonista ortosterico di un recettore sensibile ai livelli di Calcio extracellulari, il Calcium Sensor Receptor (CaSR) (Riccardi, 2002). Infatti è stato dimostrato che tale recettore è espresso a livello dei vasi e che, attraverso l'attivazione di una proteina G, è in grado di attivare la cascata delle MAPK. Pertanto l'effetto del La sulle CV potrebbe quindi essere spiegato da una sua interazione con tale recettore.

## 8. CALCIUM SENSING RECEPTOR (CaSR)

Da oltre un secolo è noto il ruolo fondamentale del calcio nel regolare numerose funzioni biologiche (Ringer, 1883); l'idea che potesse esistere un recettore in grado di “sentire” e rispondere alle variazioni delle concentrazioni extracellulari di calcio è invece più recente e si deve agli studi del gruppo di Brown, che mise in evidenza come, in termini di tempo estremamente brevi (secondi o minuti), variazioni della concentrazione del Ca extracellulare potessero indurre variazioni della secrezione del PTH nelle cellule paratiroidee (Shoback et al., 1984). Nel 1993 clonarono una proteina di 1078 aminoacidi che venne identificata come sensore del Calcio, CaSR (Brown et al., 1993). Questa proteina appartiene alla superfamiglia dei recettori associati alle proteine G ed è strutturata in 3 domini principali. Il più voluminoso è rappresentato da quello amino-terminale, dove è presente il sito coinvolto nell'interazione con il calcio e con altri agonisti (Reyes-Cruz et al., 2001). Il secondo dominio è formato da 7 distinte porzioni intramembranose ed è implicato in numerose funzioni: trasporto del recettore sulla membrana, dimerizzazione (Zhang et al., 2001), trasduzione del segnale e interazione con i modulatori allosterici (calciomimetici e calciolitici) (Petrel et al., 2004). Il terzo dominio è quello idrofobico C-terminale che contiene numerosi siti di fosforilazione coinvolti nei processi di trasmissione dei vari meccanismi di segnale intracellulare (Brown et al., 1999). L'interazione di un agonista con la regione N-terminale extracellulare determina modificazioni steriche della molecola a livello delle regioni intracitoplasmatiche che comportano eventi fosforilativi attivanti differenti tipi di



proteine-G con conseguente attivazione di numerosi eventi biochimici, tra cui l'inibizione dell'adenilato ciclasi e la stimolazione delle fosfolipasi C,A e D (PLC, PLA, PLD) (Ward, 2004). A seconda quindi dell'agonista che interagisce con il CaSR verranno attivati diversi segnali intracellulari, tra cui riduzione dell'AMP ciclico, aumento di DAG (diacilglicerolo) e IP3 (inositolo trifosfato), stimolazione di numerose chinasi come la PKC (fosfochinasi C) e la cascata delle MAPK, a cui seguono eventi biologici differenti a seconda dei diversi tessuti in cui è espresso il CaSR (Magno et al.). In particolare, tale recettore si trova espresso ad alti livelli nelle ghiandole paratiroidi (Garrett et al., 1995), nell'intestino (Sheinin et al., 2000), nell'osso (Kameda et al., 1998) e nel rene (Riccardi et al., 1995) (Vezzoli et al., 2011), ma anche, a livelli più bassi, in tessuti non direttamente coinvolti nella regolazione sistemica del calcio, quali ad esempio pancreas (Squires et al., 2000), cervello (Ruat et al., 1995), cuore (Tfelt-Hansen et al., 2006), vasi (Smajilovic et al., 2006). Quello delle cellule paratiroidi è il sistema cellulare in cui gli effetti della stimolazione del CaSR sono stati sicuramente meglio definiti. Il principale effetto è rappresentato dall'aumento del calcio intracellulare, conseguente all'attivazione della PLC e alla successiva formazione del IP3 che impedisce la secrezione di paratormone (PTH) e degrada l'ormone preformato presente nelle vescicole citoplasmatiche (Brown, 2000); una stimolazione prolungata nel tempo del CaSR induce una ridotta trascrizione dell'm-RNA del PTH e nell'arco di giorni o settimane una diminuzione degli eventi proliferativi cellulari (Ritter et al., 2008). Negli ultimi anni è stato ampiamente dimostrato come il CaSR sia espresso, a

livello dei vasi, nelle cellule endoteliali e nelle VSMC umane, di ratto e di maiale (Smajilovic et al., 2006; Weston et al., 2005; Ziegelstein et al., 2006). Per questo motivo diversi autori hanno suggerito che tale recettore potrebbe avere un ruolo fisiologico nel controllo della funzionalità dei vasi. Weston et al. hanno dimostrato che l'attivazione del CaSR a livello di cellule endoteliali umane provoca l'apertura dei canali endoteliali del potassio sensibili al calcio con conseguente iperpolarizzazione dei miociti e conseguente vasodilatazione (Weston et al., 2005). Smajilovic et al. hanno invece appurato la presenza del CaSR in VSMC di aorta di ratto e hanno mostrato come la stimolazione della proliferazione di queste cellule indotta dal calcio extracellulare sia dipendente dall'attivazione della via ERK (Smajilovic et al., 2006); dato che è dimostrato che il CaSR è in grado di attivare ERK (Kifor et al., 2001), l'effetto del calcio sulla proliferazione cellulare potrebbe essere mediato dall'attivazione del CaSR. In uno studio di Molostov et al. è stato poi dimostrato come il CaSR sia espresso in VSMC umane e come tale recettore, quando stimolato con un suo agonista, sia in grado di attivare la via MEK/ERK. Gli autori mostrano anche come l'espressione del CaSR sia diminuita in VSMC di arterie ottenute da pazienti uremici ad uno stadio finale della malattia, rispetto a quella osservata in VSMC di arterie di pazienti sani, e come a questa diminuzione corrispondano delle aree di calcificazione dell'arteria (Molostvov et al., 2007). Da uno studio di Alam et. al è inoltre emersa una correlazione tra l'incremento della mineralizzazione vascolare ed una ridotta espressione del CaSR. E' stato dimostrato che il CaSR è espresso in VSMC umane e bovine *in vitro*, ed in arterie

umane sane, mentre tale espressione è significativamente ridotta in arterie calcificate. L'espressione di questo recettore nelle cellule diminuisce durante la formazione spontanea di noduli di mineralizzazione o in seguito al trattamento di tali cellule con elevate concentrazioni di fosforo e calcio al fine di stimolarne la mineralizzazione (Alam et al., 2009). Questi risultati mettono quindi in luce un possibile ruolo del CaSR nella patogenesi delle CV. Tutto ciò è supportato anche dal fatto che in clinica è stato appurato come il polimorfismo di questo recettore sia strettamente associato con un aumento della mortalità per cause cardiovascolari (Marz et al., 2007).

## **9. AGONISTI E MODULATORI ALLOSTERICI DEL CaSR**

Le sostanze in grado di interagire con il CaSR vengono classificate in agonisti ortosterici, in grado di attivare direttamente il recettore, e modulatori allosterici, che legano un sito allosterico del CaSR e necessitano della presenza sul recettore di un agonista ortosterico per poter produrre il loro effetto. Quest'ultima classe di composti agisce modulando l'attività dell'agonista, potenziandola (modulatori allosterici positivi) o riducendola (modulatori allosterici negativi).

## 9.1 Agonisti ortosterici o Calciomimetici di tipo I

Sebbene il nome di “sensore del calcio” sembrerebbe indicare una specificità del CaSR nel rispondere esclusivamente a variazioni delle concentrazioni di tale catione, il numero di agonisti recettoriali in grado di mimare l’azione del calcio è molto elevato. Tra essi i composti maggiormente affini al recettore sono alcune poliamine (spermina, spermidina e putrescina), antibiotici aminoglicosidici (Neomicina, Gentamicina e Tobramicina) (Saidak et al., 2009) e molti cationi bi e trivalenti tra cui, in ordine di potenza:  $\text{La}^{3+} > \text{Gd}^{3+} > \text{Be}^{2+} > \text{Ca}^{2+} = \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$  (Nemeth, 1990).

Già nel 1990 Brown et al. mostrano come alcuni cationi bi e trivalenti fossero in grado d’inibire il rilascio di PTH stimolato da basse concentrazioni di calcio extracellulare in cellule paratiroidee, così come di impedire l’accumulo intracellulare di cAMP e di stimolare invece la formazione di IP<sub>3</sub>, “mimando” quindi gli effetti del Calcio (Brown et al., 1990). Tra questi, il Gadolinio ( $\text{Gd}^{3+}$ ) si è dimostrato essere uno dei più potenti. Handlogten et al. hanno dimostrato inoltre come questo catione sia in grado di stimolare l’attivazione di ERK e PLA<sub>2</sub> in cellule HEK293 trasfettate che esprimono il CaSR umano (Handlogten et al., 2000). Il  $\text{Gd}^{3+}$  viene utilizzato in clinica come mezzo di contrasto nella risonanza magnetica per immagini. La riduzione della clearance renale del  $\text{Gd}^{3+}$  nei pazienti con insufficienza renale grave può causarne l’accumulo nei tessuti a causa della sua scarsa solubilità e della capacità di formare precipitati con ioni come il fosfato e il carbonato (Mann, 1993). Tutto ciò ha portato a pensare che il  $\text{Gd}^{3+}$ , in pazienti

affetti da patologia renale, possa essere coinvolto nello sviluppo della fibrosi nefrogenica sistemica, una malattia progressiva e debilitante che conduce ad eccessiva formazione di tessuto connettivo a livello della cute e degli organi interni, fino a morte (Wiginton et al., 2008). Nei pazienti affetti da tale patologia sono spesso presenti anche calcificazioni extrascheletriche (Nagai et al., 2008). Per cercare di comprendere meglio i meccanismi alla base dello sviluppo di queste calcificazioni, Okada et al. hanno effettuato uno studio *in vitro* in cui dimostrano che il  $Gd^{3+}$  è in grado di indurre in modo concentrazione-dipendente un aumento della calcificazione mediata dal fosforo in fibroblasti dermali umani ed in cellule mesenchimali derivanti da tessuto adiposo umano, a diverse concentrazioni (0,01-100  $\mu M$ ) (Okada et al.). Lo stesso risultato è stato ottenuto in pre-osteoblasti di topo (linea cellulare MC3T3-E1), ma solo per concentrazioni inferiori a 10 $\mu M$ . Per concentrazioni superiori si ha invece l'effetto opposto. In un differente studio *in vitro*, Alam et al. mostrano come il trattamento con  $Gd^{3+}$  aumenti la calcificazione in VSMC bovine in modo concentrazione-dipendente (Alam et al., 2009).

Anche il Lantanio ( $La^{3+}$ ) è classificato tra gli attivatori ortosterici del CaSR. Questo catione stimola l'aumento di Calcio intracellulare in HEK293 trasfettate che esprimono il CaSR umano, mentre nessuna risposta si ha in HEK non trasfettate (Carrillo-Lopez et al.); Shankar et al. mostrano come  $La^{3+}$  attivi CaSR anche negli osteoclasti, portando ad un aumento del Calcio intracellulare (Shankar et al., 1992). Il fatto che il Lantanio possa agire attivando il CaSR potrebbe anche spiegare il fatto che il  $La^{3+}$  aumenta la differenziazione fisiologica in osteoblasti di ratto,

stimolando un aumento dei livelli di Cbfa1(Wang et al., 2008). Recentemente è stato dimostrato come il  $\text{La}^{3+}$  sia in grado di revertire in parte la diminuzione dell'espressione del CaSR indotta da elevate concentrazioni di Pi e come il trattamento con un modulatore allosterico negativo del CaSR annulli l'effetto inibitorio del  $\text{La}^{3+}$  sulla deposizione di calcio indotta da Pi (Zhao et al. 2011). Questi dati mettono effettivamente in luce un possibile ruolo del CaSR nel mediare gli effetti del  $\text{La}^{3+}$  sulle CV.

Neomicina, Gentamicina e Tobramicina, composti appartenenti alla classe degli antibiotici aminoglicosidici, sono in grado di produrre un aumento concentrazione-dipendente del Calcio intracellulare in cellule umane embrionali di rene trasfettate con il CaSR (cellule HEK293) (McLarnon et al., 2002) e la potenza di questi composti nell'attivare tale recettore è positivamente correlata con il numero di aminogruppi presenti nella loro struttura: cinque per Gentamicina e Tobramicina e sei per la Neomicina (McLarnon et al., 2002). Già nel 1991 Brown et al. avevano dimostrato come la Neomicina fosse in grado di mimare l'effetto del calcio extracellulare in cellule paratiroidee bovine (Brown et al., 1991).

Le poliamine sono molecole endogene policationiche che mediano diverse funzioni cellulari tra cui proliferazione e differenziazione e sembra che abbiano un ruolo centrale nella neurotrasmissione (Kroigaard et al., 1992). La spermina in particolare sembra essere la più potente tra le poliamine nell'attivare il CaSR (Cheng et al., 2004). E' stato dimostrato che la spermina agisce direttamente sul CaSR inibendo la secrezione di PTH in cellule paratiroidee bovine (Quinn et al.,

1997) producendo un aumento concentrazione-dipendente del calcio intracellulare in epatociti di ratto attraverso l'attivazione di CaSR (Canaff et al., 2001).

## **9.2 Modulatori allosterici positivi o Calciomimetici di tipo II**

Queste sostanze non mimano l'azione del calcio, ma agiscono come attivatori allosterici del recettore interagendo con alcuni siti appartenenti al dominio intramembranoso e inducendo così delle modificazioni nella conformazione sterica del dominio N-terminale. Il risultato è un aumento dell'affinità del CaSR per l'agonista. Tra questi composti vi sono L-aminoacidi aromatici (L-fenilalanina, L-triptofano, L-tirosina, L-istidina) e alifatici (L-leucina, L-arginina) (Busque et al., 2005; Conigrave et al., 2007). Successivamente, allo scopo d'identificare dei nuovi trattamenti per la cura dell'iperparatiroidismo primitivo e secondario, è stata sviluppata una serie di composti, tra cui NPS R-568, NPS R-467 (Nemeth et al., 1998) AMG 073, chiamato anche Cinacalcet, e Calindol (Kessler et al., 2004), in grado di interagire con il CaSR aumentandone l'attività. Tra questi il primo potente e selettivo modulatore allosterico positivo del CaSR ad essere sintetizzato è stata la fenilalchilamina NPS R-568; questo composto è in grado di aumentare la concentrazione del calcio intracellulare e di inibire la secrezione di PTH da cellule paratiroidee bovine *in vitro* (Nemeth et al., 1998). Ivanovski et al. hanno trattato per due mesi dei topi uremici knockout per l'ApolipoproteinaE con R-568 e hanno osservato una riduzione della aterosclerosi e delle CV (Massy et al., 2005) (Ivanovski et al., 2009). Lo stesso gruppo ha anche dimostrato *in vitro* una diretta

inibizione da parte di R-568 della calcificazione indotta da fosforo in VSMC umane (Ivanovski et al., 2009).

Nel 2004 Kessler et al. hanno sintetizzato e caratterizzato un nuovo potente calciomimetico, il (R)-2-[1-(1-naphthyl)ethylaminomethyl]-1H-indole, chiamato anche Calindol (Kessler et al., 2004; Petrel et al., 2004). Questa molecola si è dimostrata in grado, in presenza di calcio, d'aumentare i livelli di IP<sub>3</sub> in modo concentrazione-dipendente (Petrel et al., 2004). Inoltre il Calindol induce iperpolarizzazione in arterie coronariche di ratto in modo concentrazione-dipendente e tale effetto viene potenziato aumentando la concentrazione di calcio extracellulare (Weston et al., 2005).

### **9.2.a Utilizzo dei calciomimetici in clinica**

Nei pazienti affetti da CKD, come risposta adattativa all'alterato metabolismo minerale, si sviluppa frequentemente ed abbastanza precocemente l'iperparatiroidismo secondario (SHPT), patologia caratterizzata da iperplasia delle ghiandole paratiroidi e da un'aumentata sintesi di PTH. E' conseguenza di fattori quali ipocalcemia, ritenzione di fosfati e riduzione della sintesi di calcitriolo (Cozzolino et al., 2009); il mantenimento di livelli ottimali di PTH, fosforo e calcio sierici è quindi da considerare la base per la scelta della terapia. A tale scopo, uno dei farmaci attualmente utilizzati per la terapia di SHPT è un modulatore allosterico positivo del CaSR: il Cinacalcet cloridrato o AMG073 (Cozzolino et al. 2011). Molti studi clinici hanno mostrato come il trattamento con Cinacalcet sia in



grado di ridurre livelli di PTH contemporaneamente ai livelli sierici di calcio e fosfato in pazienti con SHPT refrattaria alla terapia con vitamina D (Block et al., 2004; Quarles et al., 2003). Inoltre, i risultati dello studio ADVANCE (A Randomized Vascular Calcification Study to Evaluate the Effects of Cinacalcet) mostrano l'efficacia del trattamento con Cinacalcet, in associazione a basse dosi di vitamina D, nell'attenuare la progressione delle calcificazioni vascolari (Raggi et al.).

I principali effetti collaterali del Cinacalcet sono l'ipocalcemia e i disturbi gastrointestinali. L'ipocalcemia è generalmente asintomatica e può essere trattata con un incremento della dose di chelanti del fosfato contenenti calcio. I disturbi gastrointestinali come nausea e vomito, dovuti probabilmente ad un effetto diretto del farmaco sul tratto gastrointestinale che esprime CaSR, sono invece la principale causa della discontinuità nell'assunzione del farmaco da parte dei pazienti (Block et al., 2004).

# **SCOPO**

I meccanismi cellulari e molecolari della calcificazione vascolare sono in gran parte ignoti. In virtù dell'importanza che, anche da un punto di vista clinico, riveste la calcificazione vascolare, questo studio si propone di utilizzare dei sistemi “*in vitro*” al fine di valutare al meglio il contributo dei singoli fattori nel processo di calcificazione e d'indagare sui meccanismi favorenti e/o inibenti le calcificazioni vascolari indotte da alte concentrazioni di fosforo, ricreando un ambiente simile a quanto accade nel paziente uremico. Inoltre, l'identificazione dei meccanismi alla base dello sviluppo di calcificazioni vascolari potrebbe svelare nuove prospettive terapeutiche per la riduzione della morbilità e mortalità cardiovascolare in questi pazienti.

Nell'ambito dello studio dei meccanismi delle calcificazioni vascolari, abbiamo in particolare indagato due diversi aspetti:

- Gli effetti dell'acido ascorbico sulla calcificazione vascolare. In ambito clinico infatti questa sostanza viene a volte somministrata in bolo per via endovenosa a pazienti in emodialisi per il trattamento dell'anemia resistente alla terapia con eritropoietina. Tuttavia gli effetti dell'acido ascorbico sulle calcificazioni vascolari non sono stati mai indagati
- Il possibile effetto diretto del lantanio sulle calcificazioni vascolari. Dato che i pazienti uremici affetti da iperfosforemia possono essere trattati con il carbonato di lantanio, come chelante del fosforo, abbiamo studiato gli effetti diretti del lantanio nel nostro modello cellulare di calcificazione vascolare.

# **MATERIALI E METODI**

# 1. Espianto e coltura di VSMCs di aorta di ratto

I vasi, prelevati da ratti Sprague Dawley del peso di circa 250-300 g (Charles River), anestetizzati con etere etilico in ambiente asettico, sono posti in un ambiente salino (Dulbecco phosphate buffered saline: PBS). Il vaso è pulito dal sangue, privato dell'avventizia, lavato mediante lavaggi successivi in PBS in piastre petri ed aperto longitudinalmente; quindi, mediante un bisturi, si allontana anche l'intima raschiando la lama sulla superficie interna. Segue poi una suddivisione in frammenti molto piccoli che vengono disposti omogeneamente sulle piastre.

Dopo circa dieci minuti necessari per l'adesione, si aggiunge il medium di crescita (Minimum Essential Medium: MEM) addizionato di penicillina (100 U/ml), streptomicina (100 µg/ml) e siero fetale bovino (FCS) alla concentrazione del 10%.

Le piastre vengono poste in incubatore ed il terreno viene sostituito ogni tre giorni.

Dopo alcune settimane si possono vedere al microscopio ad ottica rovesciata le prime VSMCs che migrano dai frammenti dei vasi espantati. In un periodo di tempo variabile da almeno 30 giorni a qualche mese, le cellule arrivano ad occupare quasi tutta la superficie a disposizione sulla piastra di coltura, formando un monostrato con grado di confluenza variabile tra il 60 e l'80% della superficie totale.

La subcoltivazione prevede l'aspirazione del medium di crescita ed il successivo lavaggio del monostrato con PBS; le cellule sono quindi staccate dal fondo della piastra mediante un processo enzimatico, utilizzando tripsina. La sospensione così

ottenuta viene suddivisa in piastre di petri contenenti MEM addizionato di FCS al 10%. Una volta giunte a confluenza, le cellule vengono ulteriormente subcoltivate. Questo procedimento porta ad una linea cellulare che mantiene le caratteristiche originali delle cellule da cui deriva.

Al fine di valutare l'effettiva natura muscolare di tali cellule, sono state caratterizzate mediante analisi dell'espressione di  $\alpha$ -actina, marker tipico delle VSMCs.

Le cellule così ottenute vengono quindi coltivate in medium di crescita: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) high glucose (4,5 g/L), addizionato di penicillina (100 U/ml), streptomina (100  $\mu$ g/ml) e FCS alla concentrazione del 10% (DMEM completo).

## **2. Induzione della calcificazione**

Le cellule, coltivate in medium di crescita, una volta raggiunta la confluenza, vengono seminate in flask di 25 cm<sup>2</sup> di superficie. Ottenuto un grado di confluenza variabile tra il 60% e l'80%, il medium di crescita viene sostituito con medium di calcificazione: DMEM, 1% Pen/strep, 15% FBS, sodio piruvato 10 mM, fosfato inorganico (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) a diverse concentrazioni ed eventualmente varie concentrazioni di AA. Questo viene definito giorno zero di calcificazione. Il medium viene cambiato ogni 2 giorni fino al giorno 7, 10 o 14, in cui le cellule vengono processate per valutare la presenza di depositi di idrossiapatite tramite

colorazione con Alizarin Red e per quantificare i livelli di calcio mediante saggio con orto-cresoftaleina.

Negli esperimenti in cui abbiamo saggiato l'effetto di Lantanio e agonisti del Calcium Sensing Receptor (Gadolinio, Spermina e Neomicina) sulla calcificazione, al giorno 0 di calcificazione il Pi viene aggiunto alle cellule solo dopo pretrattamento con tali composti per 2 ore. Nel caso invece del Calindol, viene effettuato un pretrattamento di 3 ore. Nel medium di calcificazione è sempre presente AA 50µg/ml.

### **3. Colorazione con Alizarin red**

Le petri contenenti un plastichino (un disco di plastica di 13mm di diametro) su cui si è formato il monostrato di cellule, private del medium di calcificazione, vengono lavate con PBS non sterile due volte e successivamente ricoperte con etanolo al 70%. Dopo ulteriori lavaggi con PBS, le cellule vengono ricoperte con una soluzione di Alizarin Red (concentrazione finale 1mg/mL, pH 5,5) in grado di legare i depositi di calcio extracellulari. Trascorsi 30 minuti, il colorante viene rimosso e il monostrato viene lavato e montato con una soluzione di glicerolo (pH>7,4 tamponato con PBS). Una volta che il montante è seccato, è possibile valutare i risultati al microscopio ottico e procedere con un'analisi semiquantitativa dei depositi di calcio. Tale analisi è stata effettuata utilizzando uno score da 1 a 4 relativo all'area "colorata": 0<10%, 1=11-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4>75%.

## 4. Misurazione dei livelli di calcio

Il monostrato di cellule, privato del medium di calcificazione, viene lavato 2 volte con PBS e ogni flask è addizionata con 1,5 ml di HCl 0,6N. Le flask vengono così lasciate una notte a temperatura ambiente. Il giorno seguente viene prelevato l'HCL ed utilizzato per la misurazione del  $\text{Ca}^{++}$  mediante saggio con ortocresoftaleina, sostanza che, complessando questo ione, lo rende misurabile per via spettrofotometrica. Il campione o lo standard e la soluzione di lavoro vengono miscelati in rapporto 1:100 e, dopo 5 minuti d'incubazione, vengono letti i valori di assorbanza a 575nm. Per la normalizzazione dei livelli di  $\text{Ca}^{++}$  è stata misurata la concentrazione proteica di ogni campione. Le flask, private dell'HCl, vengono lavate 2 volte con PBS e viene aggiunto 1 ml/flask di NaOH 0,1M/SDS 0,1% . Il monostrato viene quindi rimosso meccanicamente mediante scaper e sonicato per favorire la totale lisi delle cellule (5 cicli x 20 sec x 40% di potenza). Il lisato viene poi centrifugato 15 min a 13,4 g. E' possibile quindi misurare la concentrazione proteica del surnatante secondo la metodica dell'acido bicinconinico (BCA) utilizzando il BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit (Pierce); la lettura viene effettuata ad una lunghezza d'onda di 562 nm. I dati vengono espressi come  $\mu\text{g}$  di Calcio per mg di proteine. Negli esperimenti inerenti lo studio del Lantanio, i dati sono espressi come % d'inibizione calcolata rispetto ai valori di Calcio dei campioni trattati solo con Pi 5mM. Per la curva del Lantanio in presenza o meno di Calindol, la % d'inibizione viene calcolata considerando i valori di Calcio dei campioni trattati con Pi 5mM e Calindol 10nM.



## 5. Valutazione dell'espressione proteica

L'espressione proteica di  $\alpha$ -actina e SM22a è stata valutata con la metodica del Western Blot.

### Preparazione dei campioni

Dopo 8 giorni di calcificazione, le rVSMCs vengono lavate 2 volte con PBS a 4°C e trattate con 1ml di tampone di lisi preparato fresco (Igepal 0,5%, PMSF 1mM, TrisHCl pH8 50mM, benzamidina 1mM, sodio fluoruro 1mM, b-glicerofosfato 10mM e Complete). Le cellule sono poi rimosse meccanicamente dalle flask tramite scraper e la sospensione così ottenuta viene sottoposta prima a due cicli di congelamento/scongelo a -80°C/37°C, quindi sonicata (5 cicli x 20 sec x 40% di potenza). Il lisato totale di cellule così ottenuto viene centrifugato per 15 minuti a 13,4 g a 4°C. E' possibile quindi misurare la concentrazione proteica del surnatante secondo la metodica dell'acido biconinico (BCA) utilizzando il BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit (Pierce).

### Corsa elettroforetica

Per la separazione del contenuto proteico dei campioni si effettua un'elettroforesi su gel di poliacrilammide. E' necessario preparare un gel costituito da due componenti: un running gel al 12% di poliacrilamide e uno stacking gel per compattare il campione. I campioni vengono denaturati con un tampone adatto (Laemmli buffer contenente il SDS 4%, glicerolo 20%, 2-mercaptoetanololo 10%,

blu di bromofenolo 0.004% e Tris HCl 0.125M) e posti poi in acqua bollente 5 minuti. Sono quindi seminati in quantità isoproteiche e sottoposti a corsa elettroforetica. Tale corsa è effettuata a voltaggio costante (80 V per compattare i campioni per 20 minuti e 120 V fino alla fine della corsa) con un tampone contenente TRIS 25mM, glicina 192mM, SDS 0,1% e acqua. Al termine della corsa elettroforetica le proteine così separate sono sottoposte a western blotting.

### **Blotting**

Il trasferimento, effettuato su membrane di PVDF (polivinilidene fluoride) utilizzando un'apposita cella, viene effettuato in camera fredda (4°C) a 100V per un'ora e mezza. La membrana è successivamente saturata con PBS Tween20 0,05% (PBST) al 5% in latte in polvere (tampone bloccante) per un'ora a temperatura ambiente. Dopo di che si incuba la membrana per un'ora con l'anticorpo (Ab) primario, ( $\alpha$ -actina: Ab mouse, diluizione 1:7500; SM22  $\alpha$ : Ab goat, diluizione 1:2500). Dopo tre lavaggi di 15 minuti ciascuno, si incuba la membrana per un'ora con un anticorpo secondario coniugato con l'enzima perossidasi ( $\alpha$ -actina: Ab anti-mouse, diluizione 1:40000; SM22  $\alpha$ : Ab anti-goat diluizione 1:5000). Seguono tre lavaggi di 15 minuti ciascuno con PBST. Tutte queste operazioni vengono svolte sotto lenta agitazione. L'attività della perossidasi è valutata per mezzo del Kit ECL; è stata inoltre eseguita la quantificazione dell'area delle bande.

## **6. Estrazione di RNA, retrotrascrizione e Real Time RT-PCR**

L'RNA totale è stato isolato utilizzando il Pure Link™ RNA mini kit. Il protocollo prevede per prima cosa la lisi delle cellule in 1ml di TRIreagent® per flask da 25cm<sup>2</sup>. L'aggiunta poi di 200µL di cloroformio e la successiva centrifugazione, separano la soluzione in una fase organica ed in una acquosa superiore contenente RNA. Quest'ultima viene prelevata, addizionata con un egual volume di etanolo e caricata su una colonnina di estrazione contenente una membrana in grado di legare l'RNA. Tale RNA subisce quindi un processo di purificazione che prevede diversi lavaggi in appositi buffer e trattamento con DNasi; l'RNA così ottenuto viene infine eluito in acqua e, mediante analisi spettrofotometrica, ne vengono misurate la concentrazione (lunghezza d'onda 260 nm) e la purezza (rapporto 260/280).

Per il successivo utilizzo in Real Time RT-PCR, l'RNA estratto viene retrotrascritto a cDNA utilizzando il kit High capacity RNA-to-cDNA. Ogni campione è stato così preparato: 10 µl di 2x RTBuffer, 1 µl di 20x RT Enzyme Mix, 2µg di RNA diluiti in acqua, per un volume totale da retrotrascrivere pari a 20 µl. La reazione avviene alle seguenti temperature: 37° per 60 minuti, 95° per 5 minuti.

L'amplificazione dei geni di interesse è stata effettuata con StepOne Real-Time PCR, utilizzando la tecnologia Taqman, che prevede l'utilizzo di una mix con oligonucleotidi non marcati e di una sonda con primer specifici per il gene di

interesse, marcata con un fluorocromo. Ogni campione è stato così preparato: 10  $\mu$ l di 2x TaqMan Universal Master Mix , 1  $\mu$ l di sonda con primer specifici e una quantità adeguata di DNA, per un volume totale da amplificare pari a 20  $\mu$ l.

Il cDNA è stato amplificato con i seguenti cicli di temperatura: 95° per 10 minuti, seguiti da 40 cicli ognuno da 15 secondi a 95° più 1 minuto a 60°.

L'amplificazione del gene di interesse è stata normalizzata per i valori della  $\beta$ -actina, “gene housekeeping” amplificato simultaneamente, e calibrata rispetto al campione con espressione minore (cellule controllo).

# **RISULTATI**

# 1. Induzione della calcificazione di VSMCs di aorta di ratto

Le cellule sono state coltivate in DMEM al 15% di siero e trattate dal giorno 0 con due diverse concentrazioni di fosfato inorganico (Pi), rispettivamente 3 mM e 5 mM. Al decimo ed al quattordicesimo giorno d'incubazione le cellule vengono poi processate al fine di valutarne l'avvenuta calcificazione. A tale scopo abbiamo quantificato i livelli di calcio extracellulare mediante saggio con orto-cresoftaleina (Fig. 1).

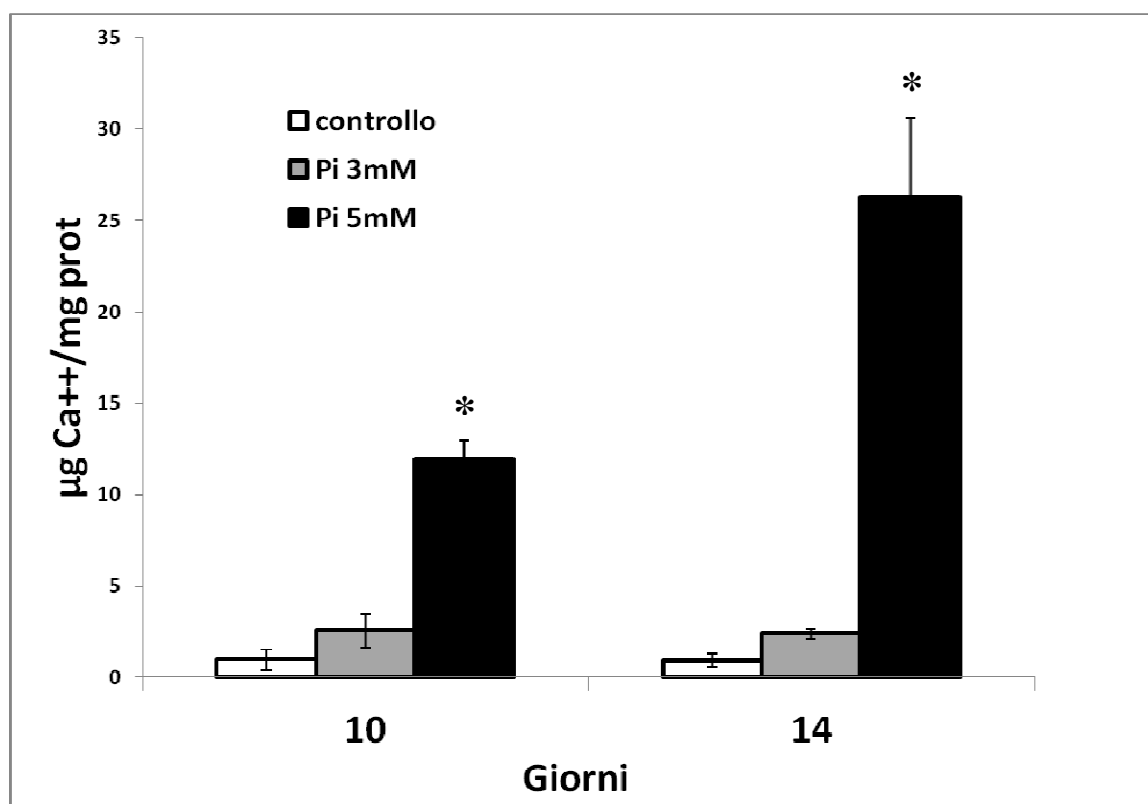


Fig.1

I risultati mostrano come la stimolazione con Pi 3 mM non modifichi in maniera significativa i livelli di calcio extracellulare rispetto a quanto osservato nelle cellule controllo. Al contrario, le cellule stimolate con Pi 5 mM mostrano un

aumento significativo dei livelli di calcio extracellulari sia a 10 (da  $0.9 \pm 0.5$  a  $11.9 \pm 1.0$   $\mu\text{g Ca/mg proteina}$ ,  $*p < 0.01$ ) che a 14 giorni di esposizione (da  $0.9 \pm 0.3$  a  $26.3 \pm 4.3$   $\mu\text{g Ca/mg proteina}$ ,  $*p < 0.01$ ), con andamento tempo-dipendente. Per questo motivo, la concentrazione di Pi utilizzata in tutti gli esperimenti è di 5 mM. Abbiamo poi effettuato un saggio istochimico che prevede la colorazione delle cellule con Alizarin-red dopo 10 (fig 2B) e dopo 14 giorni (fig 2C) di calcificazione.

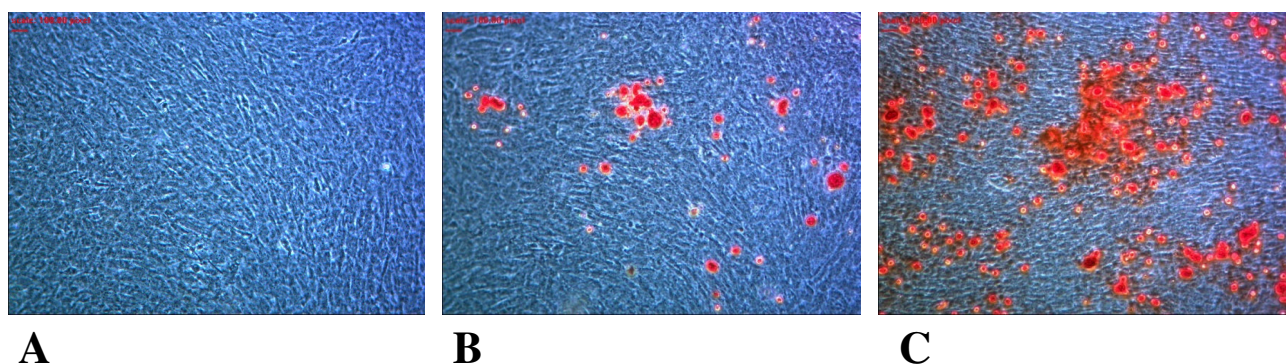


Fig.2

Tale colorazione risulta positiva nelle cellule trattate con Pi 5 mM a differenza dei controlli, nei quali è invece assente (fig 2A). Questo dato è confermato anche dall'analisi semi-quantitativa (Pi 10gg  $2.34 \pm 0.07$ , Pi 14gg  $3.78 \pm 0.09$ , score 0-4,  $p < 0.01$ )

Sebbene la deposizione di calcio a 14 giorni risulti maggiore, stimoliamo le cellule con Pi per soli 10 giorni, in modo da proteggere i campioni rispetto al rischio di sofferenza cellulare che si inizia ad osservare dopo 14 giorni, mantenendo così i dati più riproducibili.

## 2. Acido Ascorbico e Calcificazioni Vascolari

### 2.1 Effetto dell'acido ascorbico sulla calcificazione di VSMCs

Una volta ottenuto un modello stabile e riproducibile di calcificazione di VSMCs, abbiamo valutato su tale modello l'effetto di dosi crescenti di Acido Ascorbico (AA). La curva concentrazione-risposta (fig. 3) mostra come l'AA aumenti la deposizione di calcio indotta dal fosfato esplicando un'azione concentrazione-dipendente significativa a tutte le concentrazioni saggate (\* $p < 0.01$ ).

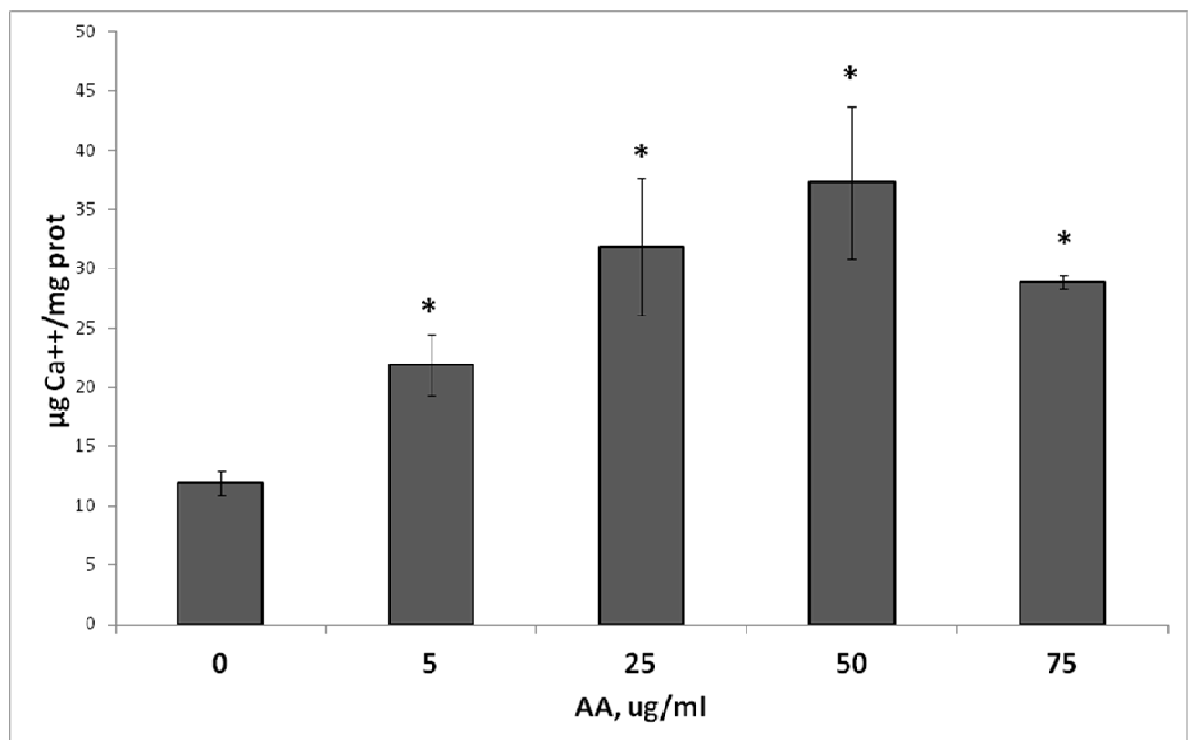


Fig.3

La curva presenta un picco ad una concentrazione di AA pari a 50µg/ml (37,3 ± 6,4µg Ca/mg proteina); tale concentrazione di AA sarà quella che utilizzeremo per tutti i successivi esperimenti. In presenza di concentrazioni di AA  $\geq 75$  µg/ml si



osserva una diminuzione dei livelli di calcio dovuti alla formazione e precipitazione di cristalli di ossalato di calcio.

La colorazione istochimica con Alizarin-red mostra come le cellule trattate simultaneamente con Pi e AA (Fig 4B) presentino una maggior quantità di depositi di calcio rispetto a quelle stimulate solo con Pi (Fig 4A). L'analisi semi-quantitativa ha confermato una significativa differenza tra la calcificazione ottenuta in presenza e in assenza di AA (rispettivamente  $3.23 \pm 0.08$  contro  $2.34 \pm 0.07$ , score 0-4,  $p < 0.05$ ).

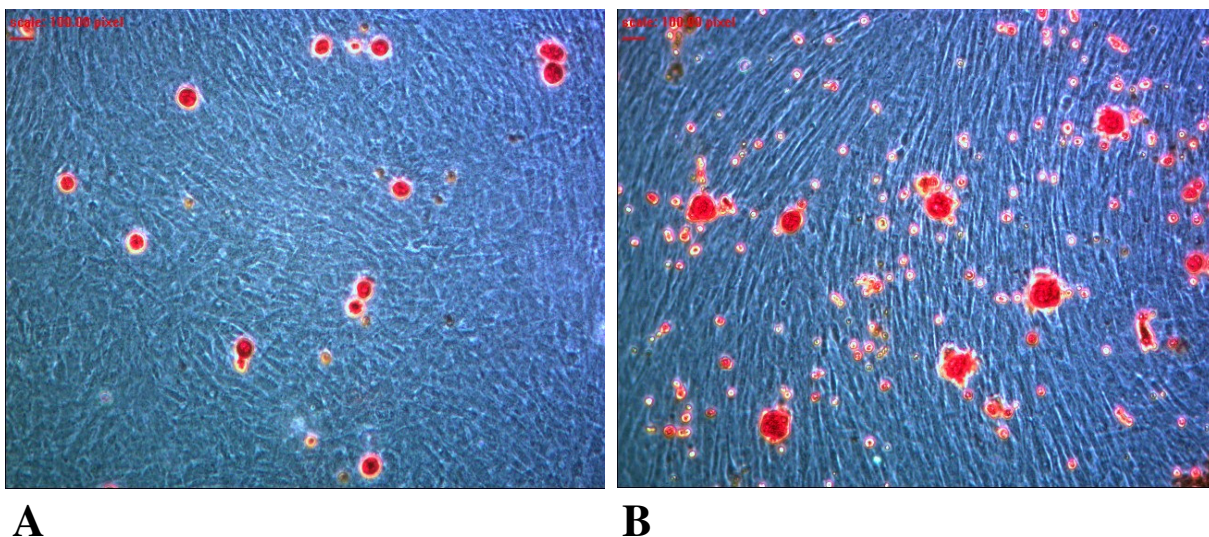


Fig.4

Abbiamo quindi valutato l'effetto sulla calcificazione di VSMCs di diverse concentrazioni di Pi, in presenza o assenza di AA, ottenendo due differenti curve concentrazione-risposta (fig. 5).

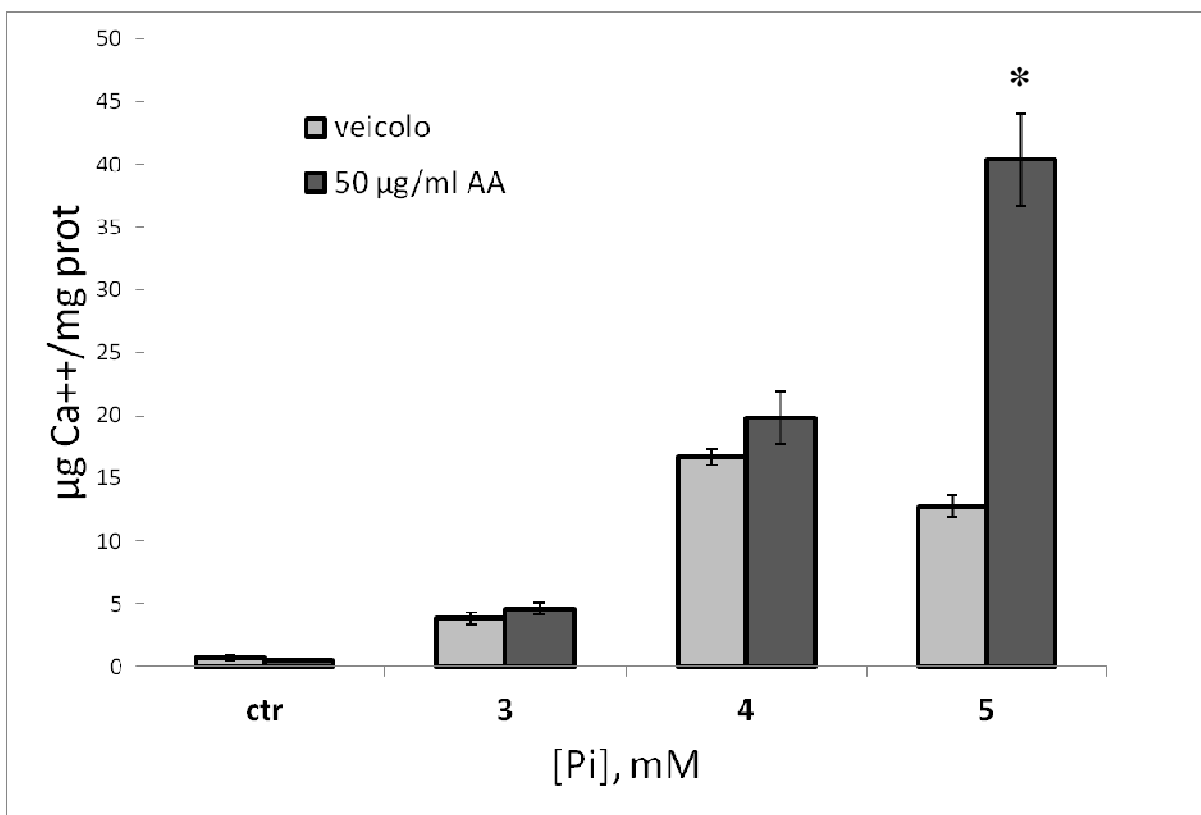


Fig. 5

In assenza di AA, i livelli di calcio raggiungono un plateau a concentrazioni di fosforo pari a 4 mM; in presenza di AA non si osserva nessun potenziamento della calcificazione per concentrazioni di Pi pari a 3 mM e 4 mM, mentre tale effetto è evidente e statisticamente significativo per concentrazioni di Pi pari a 5 mM (senza AA  $12,64 \pm 0,85$ ; con AA  $40,38 \pm 3,65$  µg Ca/mg proteina, \* $p < 0,01$ ).

Nel nostro modello non è possibile utilizzare concentrazioni di Pi maggiori di 5mM a causa dell'insorgenza di tossicità cellulare.

Abbiamo poi trattato le cellule con Pi e AA, in presenza o meno di 1 mM di acido fosfonofornico (PFA), un inibitore del co-trasportatore sodio-fosfato Pit-1.

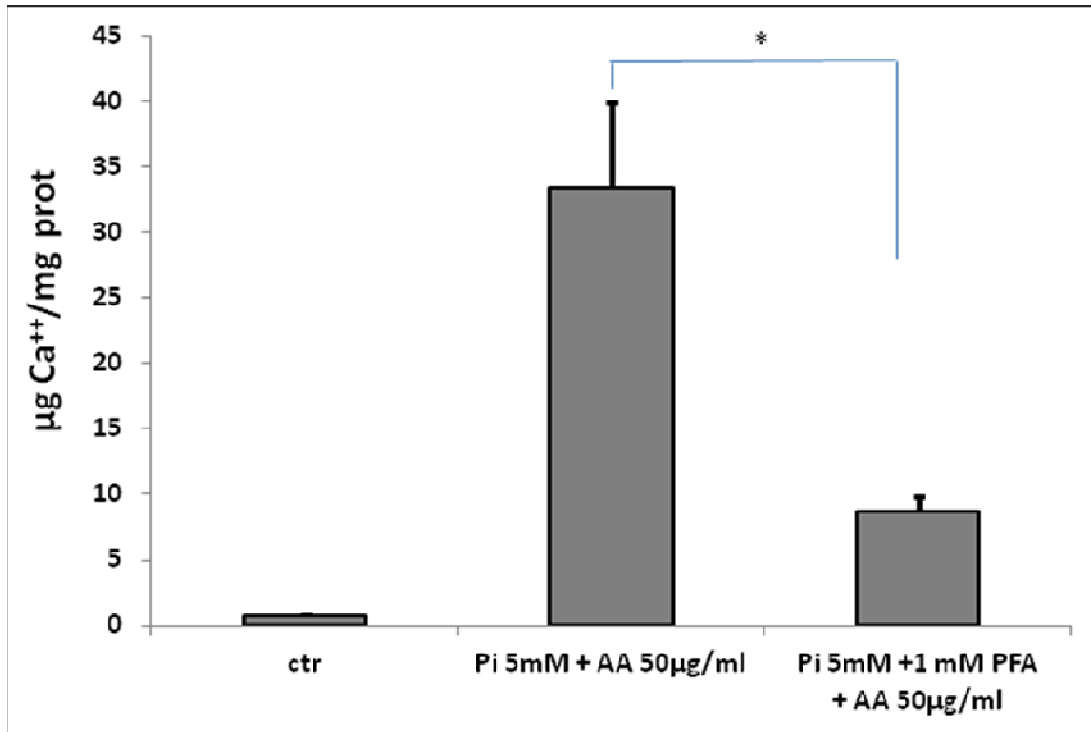


Fig. 6

Come mostrato in fig 6, il PFA inibisce la deposizione di calcio dopo stimolazione con Pi (Pi:  $33.4 \pm 6.6$ , Pi+PFA:  $8.73 \pm 1.1$  µg Ca/mg proteina, \* $p < 0.01$ ).

## 2.2 Effetto dell'acido ascorbico sulla differenziazione osteoblastica di VSMCs

Siamo quindi passati ad indagare i possibili effetti combinati della stimolazione con AA e Pi sul fenotipo cellulare del nostro modello.

### 2.2.a Effetto dell'Acido Ascorbico sull'espressione proteica di $\alpha$ -actina

La sola stimolazione con Pi (fig. 7, banda 2), protratta per 7 giorni, non influenza l'espressione di  $\alpha$ -actina, proteina tipica del fenotipo muscolare, rispetto al controllo (fig. 7, banda 1) (intensità delle bande: ctr  $97.9 \pm 0.1\%$ , Pi  $94.3 \pm 0.1\%$ ).

Al contrario, la stimolazione combinata con Pi e AA si associa ad una significativa

riduzione nell'espressione di tale proteina (fig. 7, banda 4), rispetto alla stimolazione con solo AA (fig. 7, banda 3) (intensità delle bande: AA 86.8 ± 0.4%, AA+Pi 51.2 ± 2.7%,  $p < 0.01$ ).

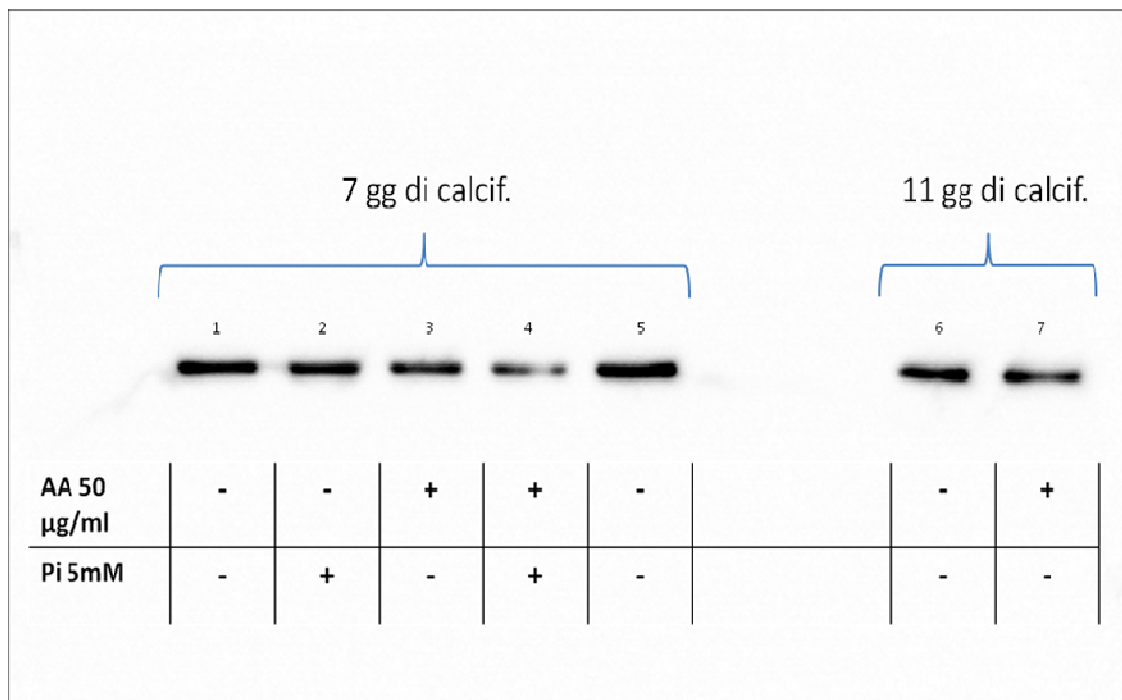


Fig. 7

Inoltre, la sola stimolazione con AA, in assenza di Pi, si associa a una lieve diminuzione dell'espressione di  $\alpha$ -actina a 7 giorni (fig. 7, banda 3), se confrontata con l'espressione di  $\alpha$ -actina nel controllo (fig. 7, banda 1) (intensità delle bande: ctr 97.9 ± 0.1%, AA 86.8 ± 0.4%); questa tendenza è più evidente a 11 giorni di esposizione (fig. 7, bande 6 e 7) (intensità delle bande: ctr 99.9 ± 7.1%, AA 73.8 ± 0.3%).

## 2.2.b Effetto dell'Acido Ascorbico sull'espressione genica di Cbfa1

Abbiamo quindi analizzato l'effetto dell'AA sull'espressione genica di Runx2/Cbfa1, fattore di trascrizione coinvolto nella differenziazione osteoblastica, osservando l'andamento nel tempo dell'espressione genica nelle VSMCs trattate o meno con Pi, in presenza di AA (fig. 8). Il grafico mostra come al settimo giorno di stimolazione con Pi si evidenzi un picco nell'espressione di Cbfa1 mRNA rispetto alle VSMCs controllo (incremento di  $4.44 \pm 0.74$ , rispetto a  $2.15 \pm 0.19$ ,  $*p < 0.01$ ).

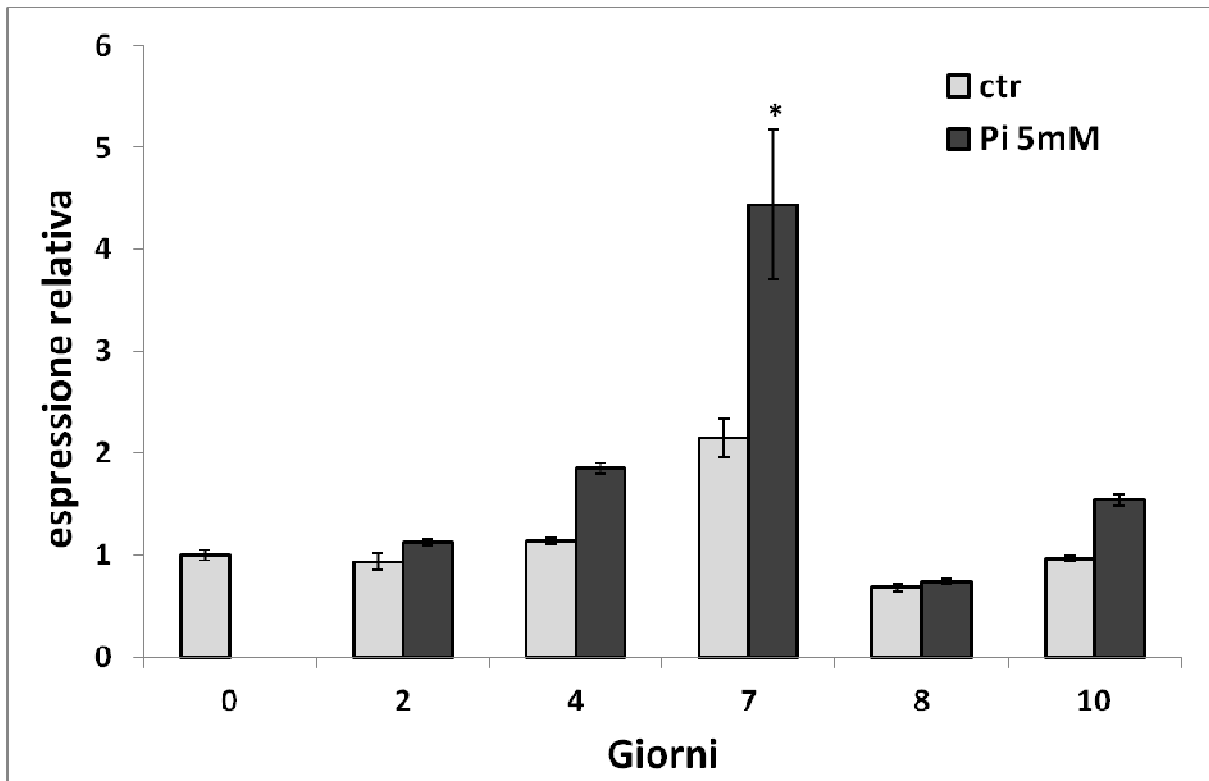


Fig. 8

Inoltre, come mostrato in figura 9, l'effetto combinato di AA e Pi, osservato al settimo giorno di calcificazione, è significativamente superiore a quello ottenuto in presenza di solo Pi (incremento di  $2.67 \pm 0.47$  rispetto a  $1.54 \pm 0.03$ ,  $*p < 0.05$ ).

L'espressione di Cbfa1 sembra aumentare leggermente anche nelle cellule controllo coltivate in presenza di AA se confrontate con quelle coltivate in assenza di AA (incremento di  $1.25 \pm 0.14$  rispetto a  $0.91 \pm 0.17$ ).

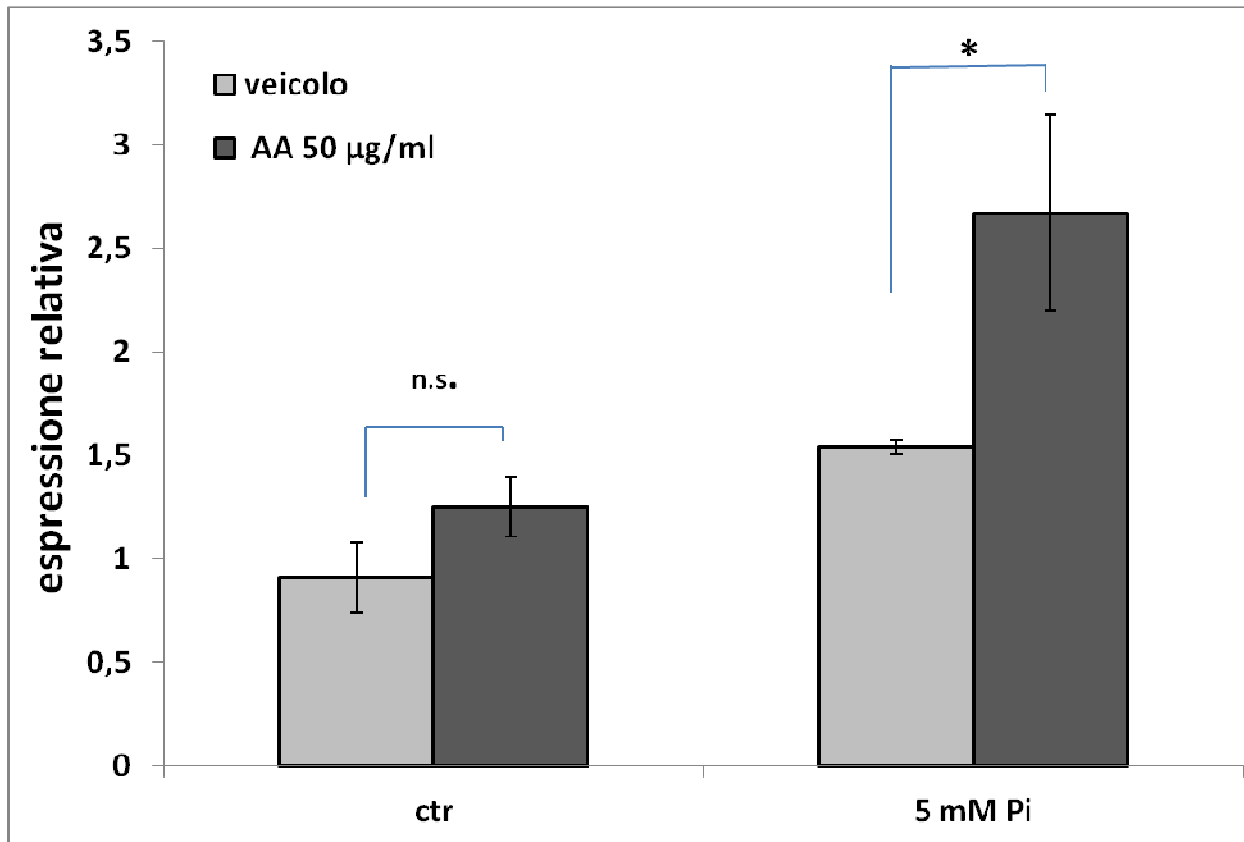


Fig. 9

### 3. Lantanio Cloruro e Calcificazioni Vascolari

#### 3.1 Effetto di Lantanio e Gadolinio sulla calcificazione di VSMCs

Al fine di valutare un eventuale effetto del Lantanio (La) nel nostro modello di calcificazione *in vitro*, abbiamo trattato le cellule per 7 giorni con con Pi e AA, in presenza di concentrazioni crescenti di Lantanio Cloruro ( $\text{LaCl}_3$ ).

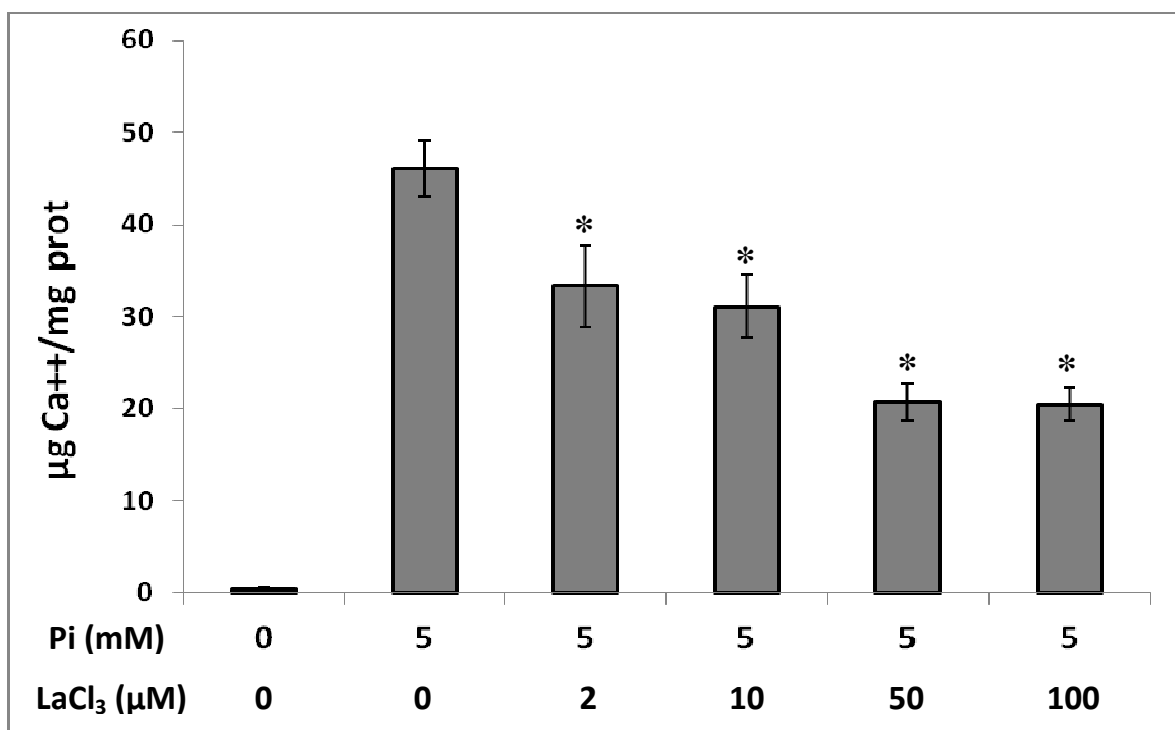


Fig. 10

Come si evince dalla Fig.10,  $\text{LaCl}_3$  inibisce la deposizione di calcio rispetto a campioni trattati unicamente con Pi con un effetto massimo a  $100\mu\text{M}$  (% d'inibizione  $59.0 \pm 2.5$ ,  $*p < 0.01$ ). A concentrazioni maggiori risulta essere tossico per le cellule. Il ruolo protettivo del La sulle calcificazioni vascolari è indipendente dal suo effetto chelante: le concentrazioni di Pi nel medium di calcificazione non

variano dopo aggiunta di  $\text{LaCl}_3$  ( $[\text{Pi}] = 5,18 \pm 0,05$  mM nei campioni con solo Pi 5mM.  $[\text{Pi}] = 5,39 \pm 0,06$  mM nei campioni con Pi 5 mM + La 100  $\mu\text{M}$ ).

Dopo aver dimostrato l'efficacia del La nell'inibire la calcificazione, abbiamo saggiato l'effetto sulla deposizione di calcio di un catione trivalente con caratteristiche simili al La, il Gadolinio, un noto agonista del CaSR (Fig.11). Per gli esperimenti è stato utilizzato Gadolinio Cloruro ( $\text{GdCl}_3$ ).

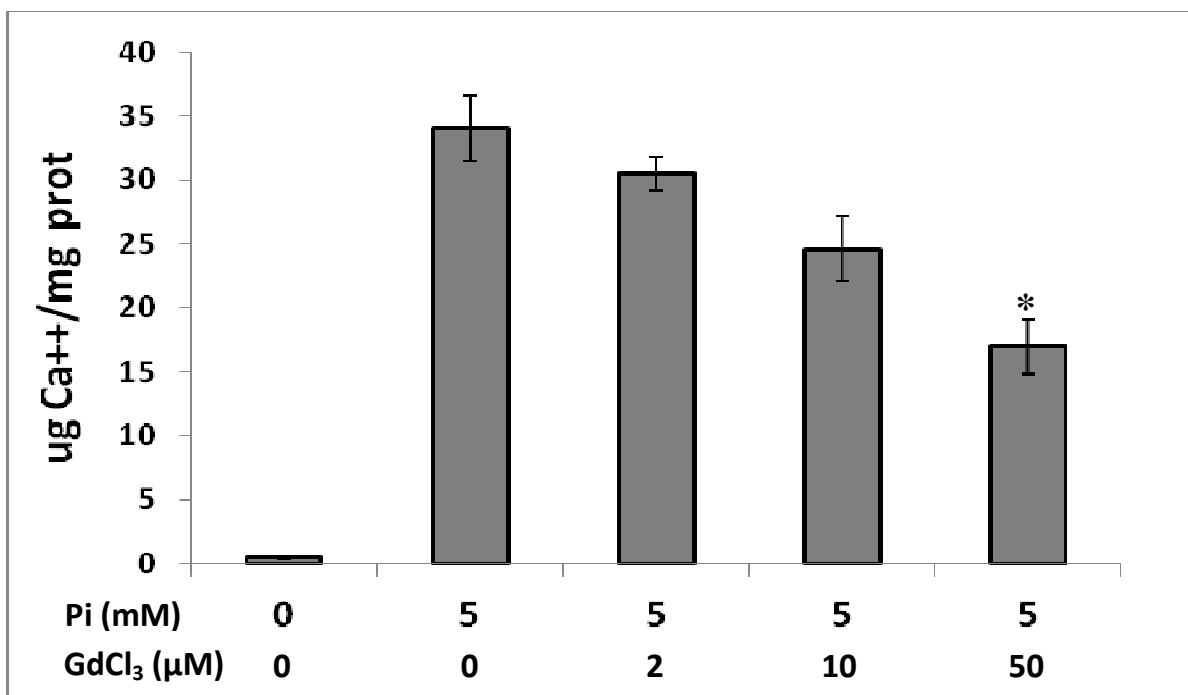


Fig. 11

I risultati ottenuti mostrano come  $\text{GdCl}_3$  sia in grado d'inibire la deposizione di calcio indotta da stimolazione con Pi 5 mM per 7 giorni, con un effetto massimo a 50 $\mu\text{M}$  (% d'inibizione  $55.9 \pm 2.2$ , \* $p < 0.01$ ). A concentrazioni maggiori risulta essere tossico per le cellule.

La colorazione istochimica con Alizarin-red conferma questi dati: le cellule trattate con Pi e  $\text{LaCl}_3$  100  $\mu\text{M}$  o  $\text{GdCl}_3$  50  $\mu\text{M}$  (Fig 12B e 12C rispettivamente) presentano



una minore quantità di depositi di calcio rispetto a quelle stimulate solo con Pi (Fig 12A). L'analisi semi-quantitativa ha confermato una significativa differenza tra la calcificazione ottenuta in presenza e in assenza di  $\text{LaCl}_3$  100  $\mu\text{M}$  o  $\text{GdCl}_3$  50  $\mu\text{M}$  (Pi  $3.03 \pm 0.12$ ,  $\text{LaCl}_3$  100 $\mu\text{M}$   $1.80 \pm 0.17$ , Gd 50 $\mu\text{M}$   $1.90 \pm 0.09$ ; score 0-4;  $p < 0.01$ ).

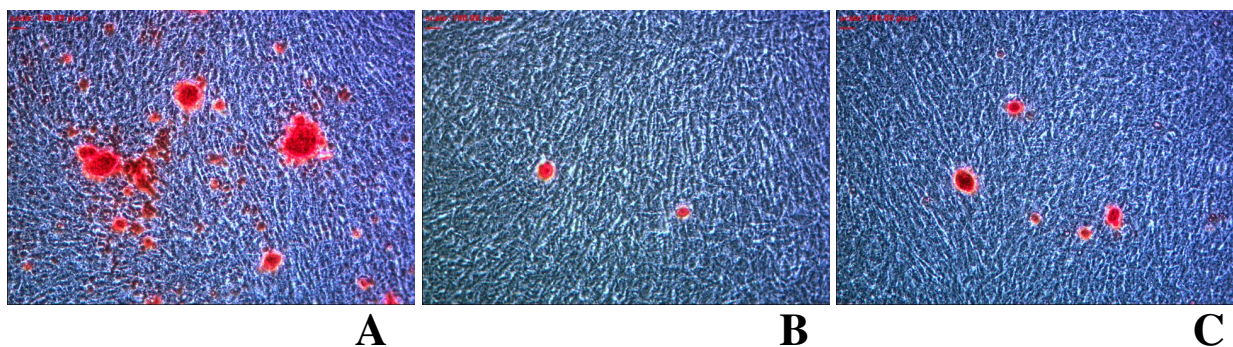


Fig. 12

Il ruolo protettivo esplicito da  $\text{LaCl}_3$  100  $\mu\text{M}$  e  $\text{GdCl}_3$  50  $\mu\text{M}$  permane anche dopo stimolazione delle cellule con Pi per 15 giorni, come mostrato sia dai valori di calcio (Fig.13), (% d'inibizione:  $\text{LaCl}_3$   $45.12 \pm 3.5$ ,  $\text{GdCl}_3$   $61.21 \pm 3.3$ ,  $*p < 0.01$ ), sia dal saggio istochimico con Alizarin Red in cui le cellule trattate con solo Pi (Fig.14A) mostrano molti più depositi rispetto a quelle trattate con  $\text{LaCl}_3$  (Fig.14B) e  $\text{GdCl}_3$  (Fig.14C) (Pi  $3.78 \pm 0.09$ ,  $\text{LaCl}_3$  100  $\mu\text{M}$   $2.1 \pm 0.11$ ,  $\text{GdCl}_3$  50  $\mu\text{M}$   $1.96 \pm 0.13$ ; score 0-4,  $p < 0.01$ ).

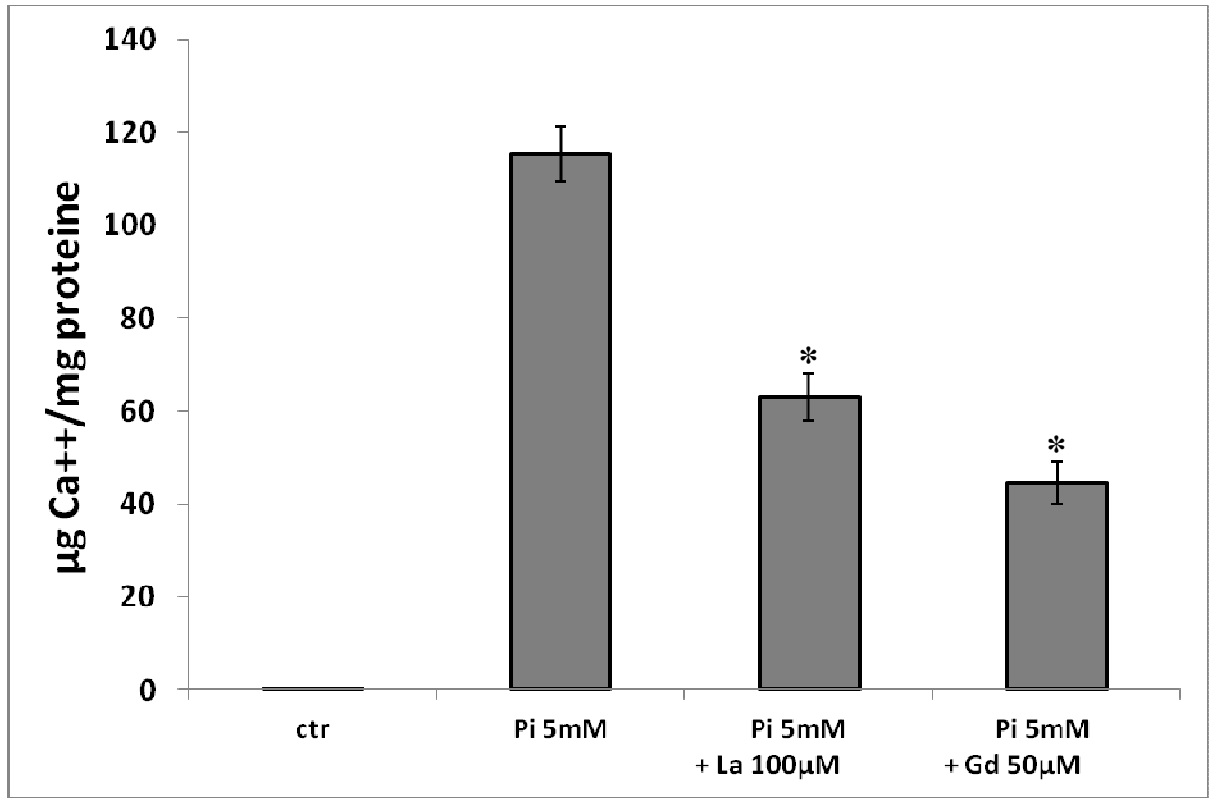


Fig. 13

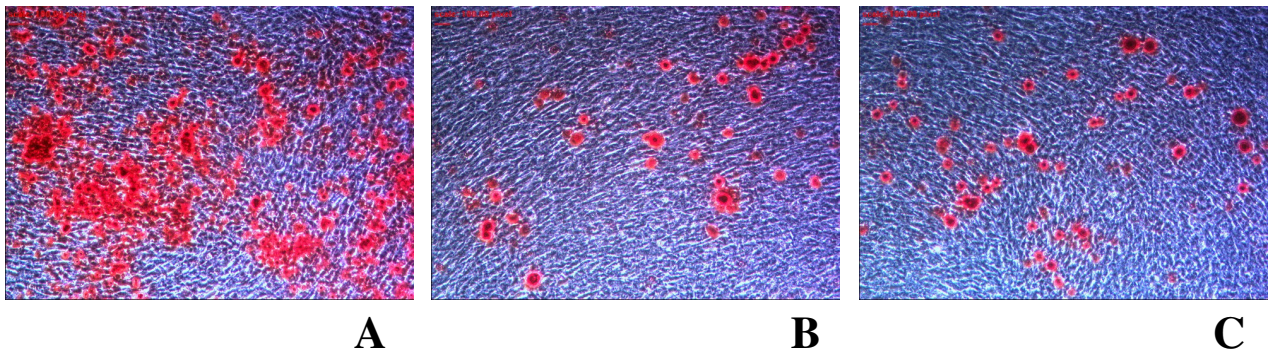


Fig.14

### 3.2 Effetto di Neomicina, Spermina e Calindol sulla calcificazione di VSMCs

Abbiamo quindi valutato l'effetto sul nostro modello di calcificazione di altri due noti agonisti del CaSR, la poliamina Spermina e l'antibiotico aminoglicosidico Neomicina. Anche in questo caso i due agonisti inibiscono significativamente la deposizione di calcio indotta da Pi (Fig.15) (% d'inibizione Spermina 1  $\mu$ M 30.2  $\pm$  5.7, % d'inibizione Neomicina 100  $\mu$ M 37.3  $\pm$  4.7 \* $p$ <0,05).

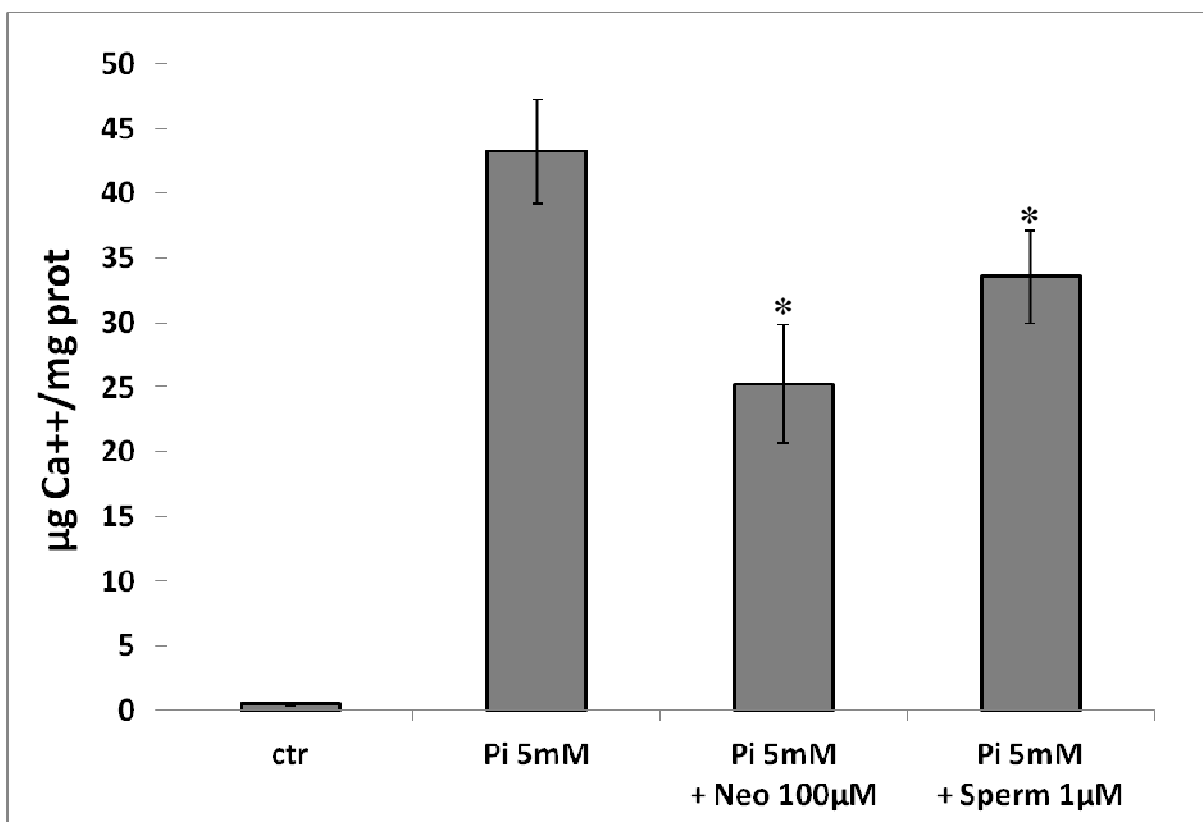


Fig. 15

In aggiunta, abbiamo studiato l'effetto del calciomimetico Calindol, un modulatore allosterico positivo del CaSR (Fig.16). Calindol è in grado di inibire significativamente la calcificazione vascolare (\* $p$ <0,01) in modo concentrazione-dipendente, con un effetto massimo a 100 nM (% d'inibizione 63.8  $\pm$  5.7,

\* $p < 0,01$ ). Non è possibile utilizzare concentrazioni maggiori di Calindol a causa dell'insorgere di tossicità cellulare.

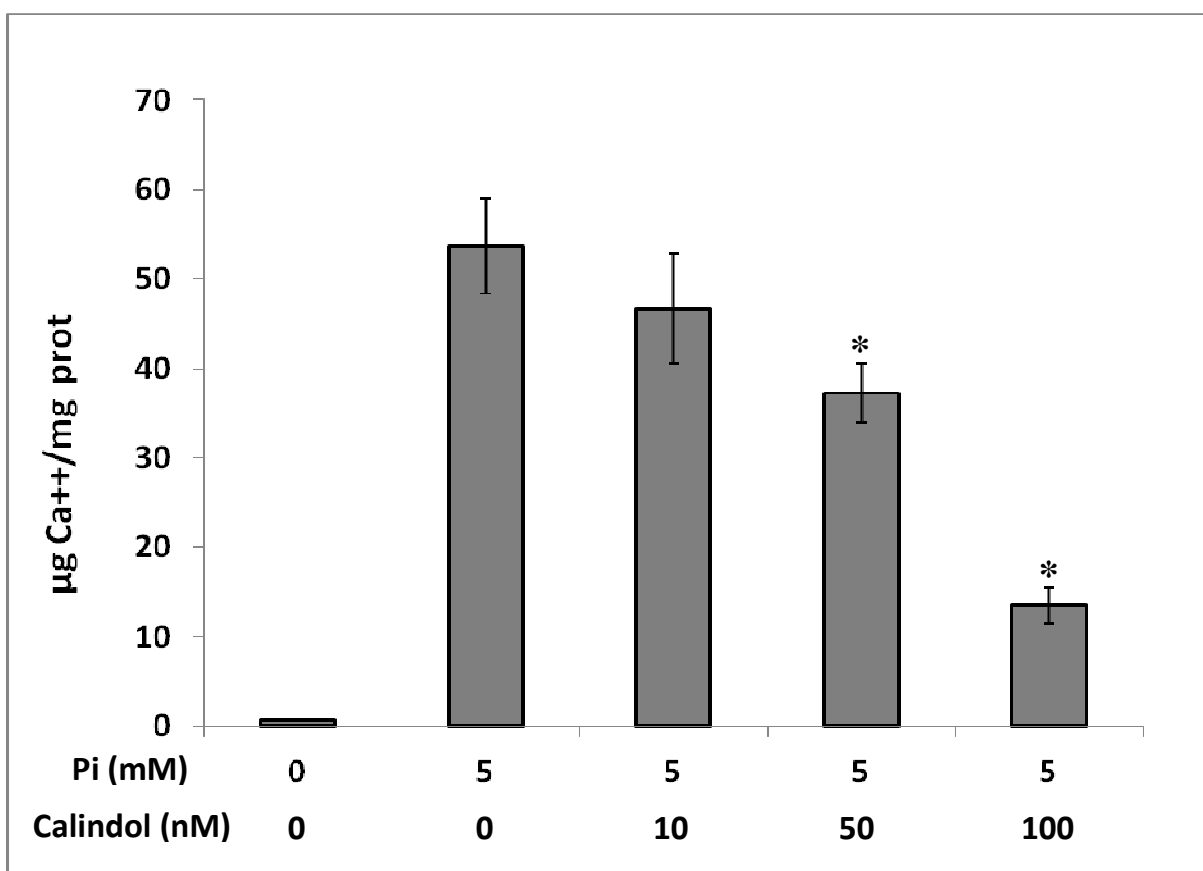
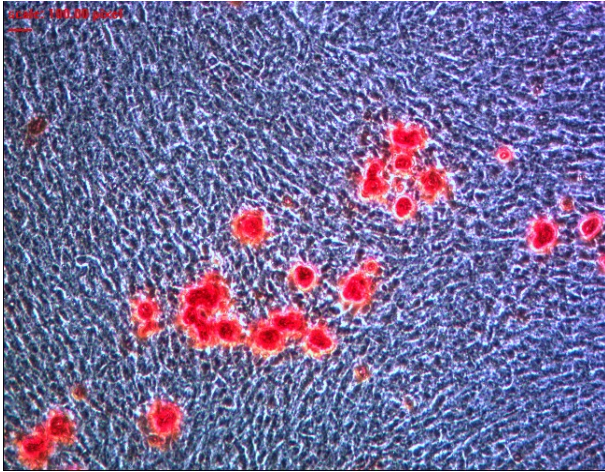


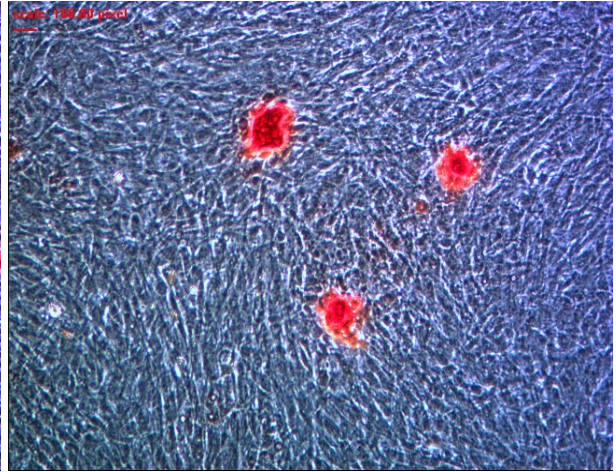
Fig. 16

La colorazione con Alizarin Red conferma il fatto che anche queste ultime sostanze agiscono inibendo la deposizione di calcio. Le cellule trattate con Neomicina, Spermina e Calindol (rispettivamente Fig 17B, 17C e 17D), presentano infatti un minor numero di depositi rispetto a quelle trattate con solo Pi (Fig 17A). Ciò si evince anche dall'analisi semiquantitativa (Pi  $3.03 \pm 0.12$ , Neomicina  $100 \mu\text{M}$   $2.32 \pm 0.19$ , Spermina  $1 \mu\text{M}$   $2.45 \pm 0.16$  e Calindol  $100 \text{ nM}$   $2.03 \pm 0.17$ ; score 0-4;  $p < 0.01$ ).

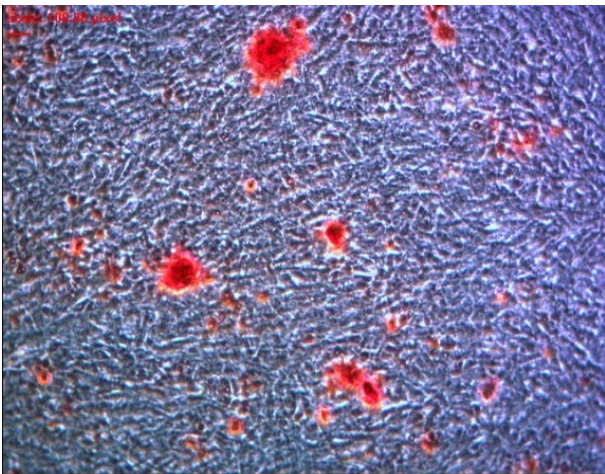




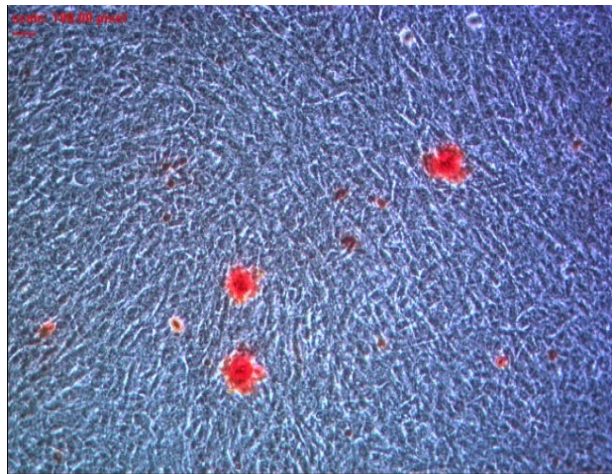
**A**



**B**



**C**



**D**

Fig. 17

### 3.3 Effetto combinato di Lantanio e Calindol sulla calcificazione di VSMCs

Abbiamo poi studiato l'effetto combinato di  $\text{LaCl}_3$  e Calindol sulla deposizione di calcio indotta da Pi. A questo scopo abbiamo trattato le cellule con Pi e diverse concentrazioni di  $\text{LaCl}_3$ , in presenza o meno di Calindol ad una concentrazione tale da non indurre inibizione della calcificazione (10nM) (Fig.18).

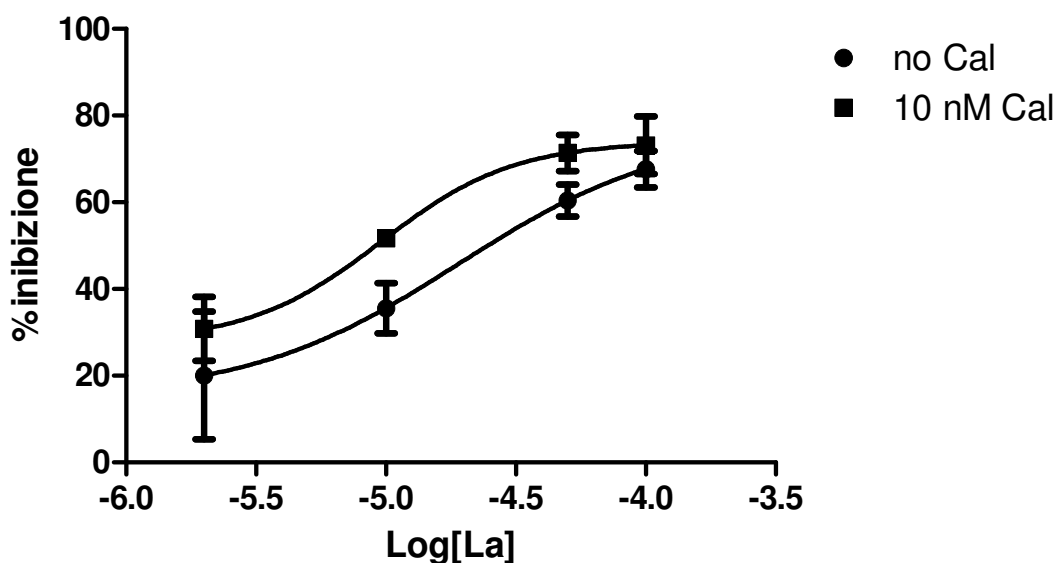


Fig. 18

Come si evince dai risultati ottenuti, la presenza di Calindol causa uno spostamento a sinistra della curva concentrazione-risposta del  $\text{LaCl}_3$ . In presenza di solo  $\text{LaCl}_3$  il valore di  $\text{IC}_{50}$  è di  $19.0 \pm 4.8 \mu\text{M}$  e la Hill slope è 1.06, mentre in presenza anche di Calindol l' $\text{IC}_{50}$  è di  $9.6 \pm 2.6 \mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ). e la Hill slope è 1.70.

### 3.4 Effetto del Lantanio sull'espressione proteica di $\alpha$ -actina e SM-22 $\alpha$

Siamo quindi passati ad indagare i possibili effetti di lantanio sul fenotipo cellulare del nostro modello, andando per prima cosa ad analizzare l'espressione di  $\alpha$ -actina dopo 8 giorni di calcificazione. I risultati ottenuti mostrano che, mentre la sola stimolazione con Pi 5 mM si associa ad una significativa riduzione nell'espressione di  $\alpha$ -actina (fig.19, banda 2) rispetto al controllo (fig. 19, banda 1) (intensità delle bande: ctr  $100 \pm 0.96 \%$ , Pi  $76.54 \pm 1.41 \%$ ,  $p < 0.01$ ), tale espressione non varia quando viene aggiunto  $\text{LaCl}_3$  100  $\mu\text{M}$  (fig. 19, banda 3) (Pi+  $\text{LaCl}_3$   $103.99 \pm 2.01 \%$ , n.s. rispetto al controllo).

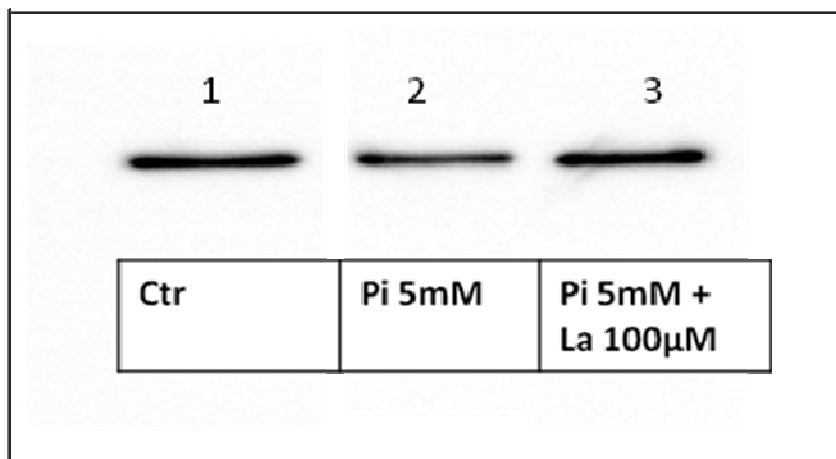


Fig. 19

Abbiamo poi studiato l'espressione di un'altra proteina tipica del fenotipo muscolare, la SM22 $\alpha$  (Smooth Muscle 22 alpha), sempre dopo 8 giorni di calcificazione. Anche in questo caso il trattamento con solo Pi causa una significativa riduzione dell'espressione di tale proteina (fig. 20, banda 2) rispetto al controllo (fig. 20, banda 1) (intensità delle bande: ctr  $100 \pm 0.26 \%$ , Pi  $85.71 \pm$

2.89 %,  $p < 0.01$ ). La presenza di  $\text{LaCl}_3$  100  $\mu\text{M}$  mantiene invece i livelli di SM22 $\alpha$  simili a quelli delle cellule controllo (fig. 20, banda 3) ( $\text{Pi} + \text{LaCl}_3$   $95.02 \pm 4.6$  %, n.s. rispetto al controllo).

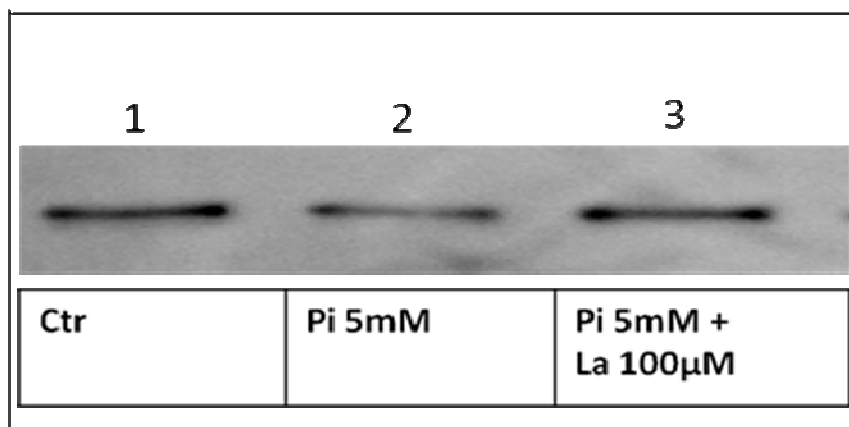


Fig. 20

Abbiamo anche valutato la modulazione nel tempo dell'espressione di  $\alpha$ -actina (fig. 21) e SM22 $\alpha$  (fig. 22), in risposta al trattamento con  $\text{LaCl}_3$ .

I risultati mostrano come  $\text{LaCl}_3$  100  $\mu\text{M}$  preservi l'espressione di  $\alpha$ -actina dopo 8, 9 e 12 giorni di trattamento (fig. 21, rispettivamente bande 3, 4 e 5). I livelli di proteina in presenza di  $\text{LaCl}_3$  non sono infatti significativamente differenti rispetto a quelli delle cellule controllo (intensità delle bande: ctr  $100 \pm 2.28$  %; Pi  $75.36 \pm 2.71$  %;  $\text{LaCl}_3$  8gg  $106.86 \pm 2.74$  %, 9gg  $113.52 \pm 2.85$  %, 12gg  $103.36 \pm 2.27$  %)



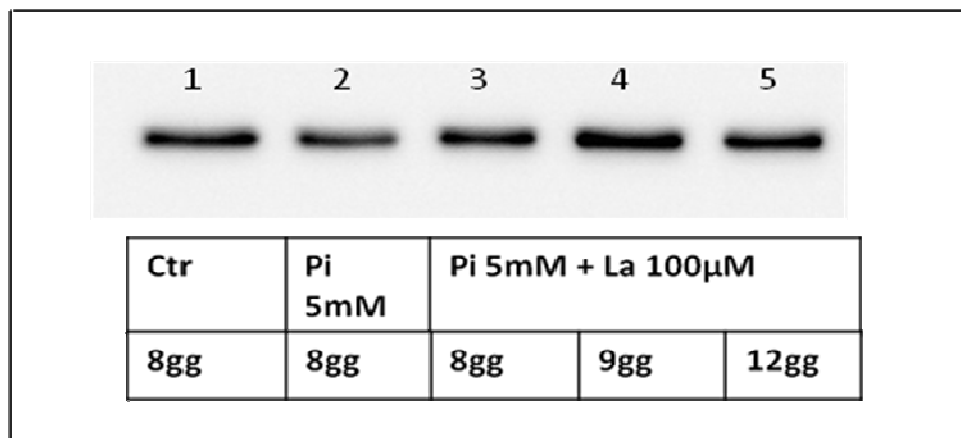


Fig. 21

Anche l'espressione di SM22 $\alpha$  non viene alterata dal trattamento con LaCl<sub>3</sub> 100  $\mu$ M per 8, 9 e 12 giorni (fig. 22, rispettivamente bande 3, 4 e 5) e, anche in questo caso, i livelli di SM22 $\alpha$  non sono significativamente diversi nelle cellule trattate con LaCl<sub>3</sub> rispetto ai controlli (intensità delle bande: ctr 100  $\pm$  0.21 %; Pi 80.95  $\pm$  0.42 %; LaCl<sub>3</sub> 8gg 109.2  $\pm$  0.45%, 9gg 93.31  $\pm$  0.64%, 12gg 95.16  $\pm$  0.4%).

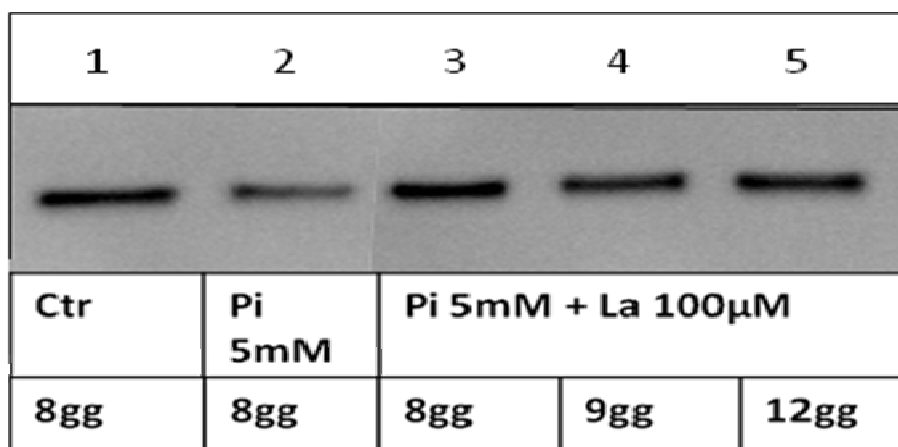


Fig. 22

### 3.5 Effetto di Lantanio sull'espressione genica di Cbfa1

Siamo passati poi ad analizzare l'effetto di  $\text{LaCl}_3$  100  $\mu\text{M}$  sull'espressione genica di Cbfa1 al settimo giorno di calcificazione, giorno in cui si evidenzia un picco nell'espressione di mRNA rispetto alle VSMCs controllo (incremento di  $2.12 \pm 0.27$ ,  $*p < 0.01$ ). Il trattamento con  $\text{LaCl}_3$  non influisce sull'aumento dell'espressione di Cbfa1 indotto da Pi (incremento di  $2.02 \pm 0.02$  rispetto alle VSMCs controllo) (Fig.23).

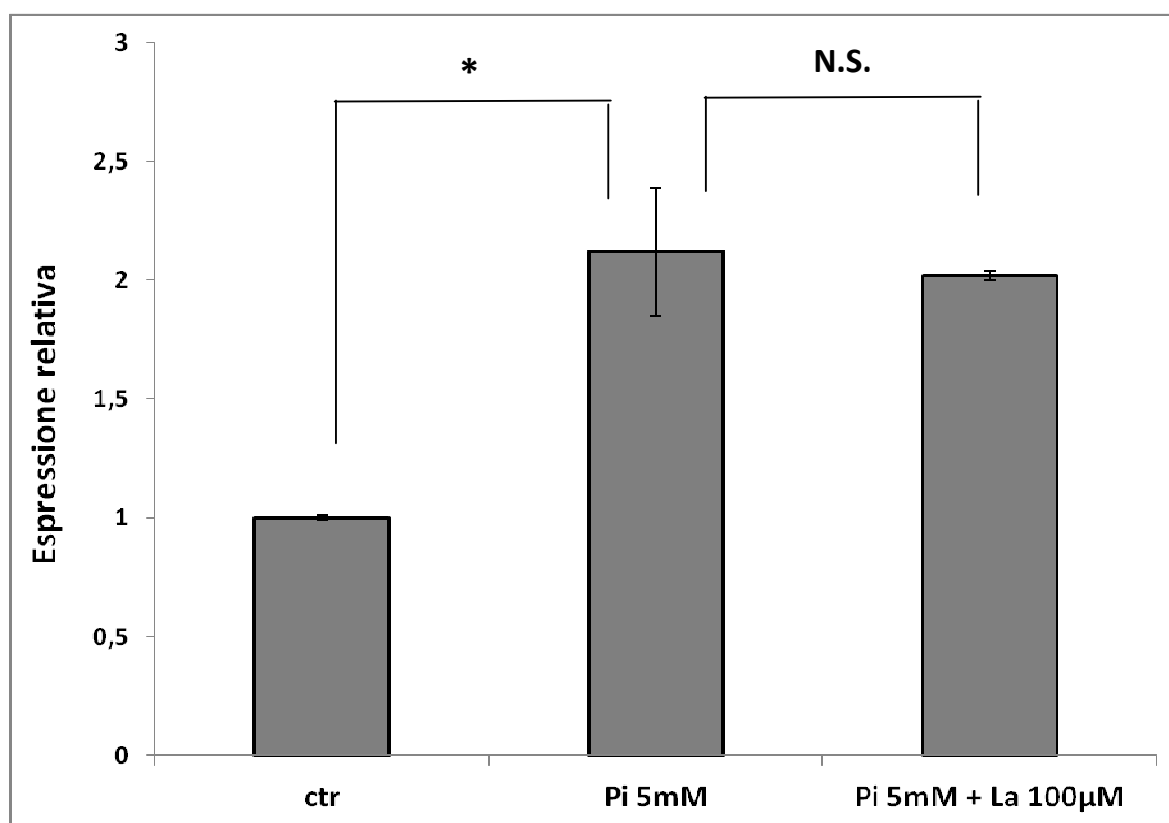


Fig.23

### 3.6 Effetto del Lantanio sull'espressione genica di MGP

Abbiamo infine analizzato l'effetto di  $\text{LaCl}_3$  sull'espressione genica della Matrix Gla Protein (MGP), una proteina fondamentale per l'inibizione della mineralizzazione extracellulare, osservando l'andamento nel tempo dell'espressione del suo mRNA nelle VSMCs trattate o meno con Pi e  $\text{LaCl}_3$  (fig. 24). Il grafico mostra come, nelle cellule stimulate per 5 giorni con Pi, si evidenzi un picco nell'espressione di mRNA significativamente maggiore rispetto a quello evidenziato nelle VSMCs controllo (incremento di  $28.05 \pm 3.4$  rispetto a  $16.34 \pm 2.41$ ,  $*p < 0.01$ ). Con l'aggiunta di  $\text{LaCl}_3$  100  $\mu\text{M}$  si ottiene un valore, sempre al giorno 5, paragonabile a quello ottenuto nelle cellule controllo quindi inferiore a quello delle cellule stimulate con solo Pi (incremento di  $18.58 \pm 0.25$ ,  $*p < 0.01$ ).

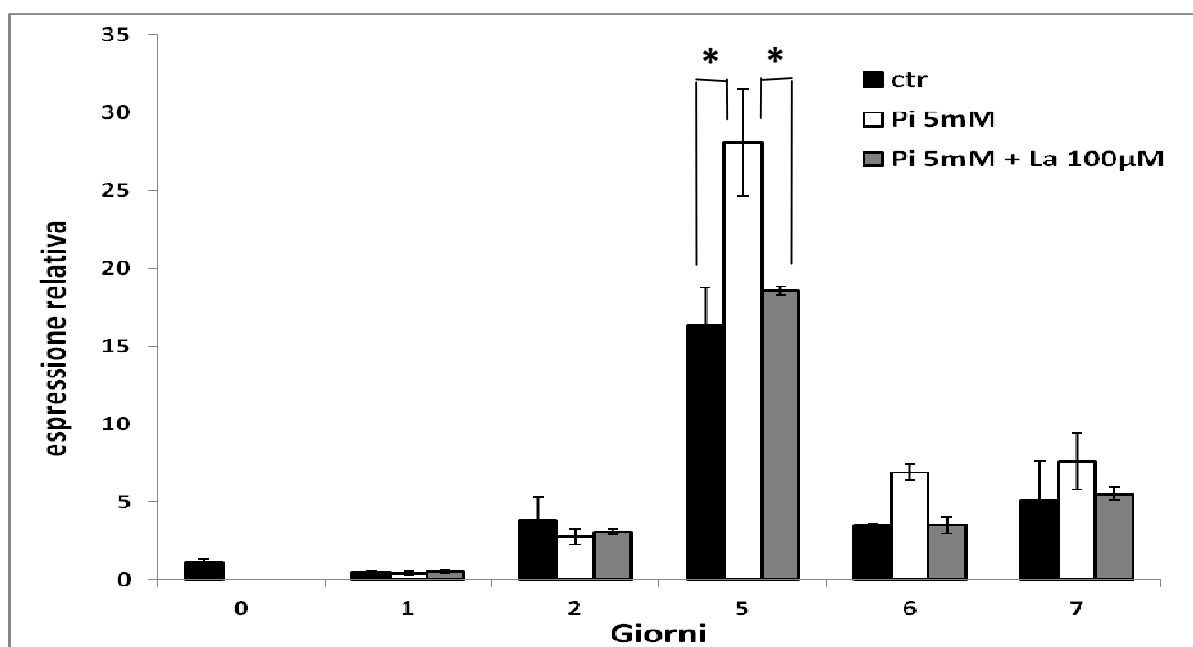


Fig. 24

# **DISCUSSIONE**

Le calcificazioni vascolari e la patologia cardiovascolare sono una complicanza rilevante nei soggetti affetti da insufficienza renale cronica, data la frequenza con cui si manifestano e l'impatto negativo che hanno sulla qualità della vita e sulla sopravvivenza dei pazienti. Le alterazioni del metabolismo minerale ed osseo, che rappresentano una delle peculiarità del soggetto uremico, contribuiscono in maniera importante alla patogenesi delle calcificazioni (Goodman et al., 2000; London et al., 2000), che si associano a loro volta ad un incremento della patologia e della mortalità cardiovascolare.

In particolare, negli ultimi anni, è stato ampiamente dimostrato il ruolo fondamentale del fosforo nell'indurre calcificazioni vascolari (Mizobuchi et al., 2009). L'iperfosforemia infatti, non solo è responsabile della deposizione passiva di calcio-fosfato nella tonaca media vascolare, ma è anche promotrice di un'attiva differenziazione fenotipica delle VSMCs. Le cellule muscolari lisce stimolate con elevati livelli di fosfato tendono infatti a perdere l'espressione di markers fenotipici del muscolo liscio quali ad esempio  $\alpha$ -actina e SM22 $\alpha$ , e ad acquisirne altri tipici di un fenotipo simil-osteoblastico come Core Binding Factor Alpha1 (Cbf $\alpha$ 1) e le proteine Osteocalcina e Osteopontina (Giachelli, 2003). Moe et al. hanno inoltre dimostrato che VSMC bovine trattate con il siero di pazienti uremici esprimono elevati livelli di Cbf $\alpha$ 1 (Moe et al., 2003). Il sovraccarico di fosfato sierico sarebbe pertanto in grado di mediare una vera e propria ossificazione vascolare.

Al fine di approfondire la conoscenza dei meccanismi molecolari e cellulari coinvolti nella patogenesi e nella progressione delle calcificazioni vascolari, abbiamo indotto la calcificazione di VSMCs, ottenute dopo aver eseguito degli espianti di aorta da ratto. A tale scopo abbiamo stimolato le cellule con elevate concentrazioni di fosfato inorganico per diversi giorni. In particolare abbiamo saggiato l'effetto di Pi 3 e 5 mM, notando come le VSMCs di ratto da noi utilizzate calcifichino, ma solo in presenza di Pi 5 mM e non con concentrazioni inferiori (Fig 1). La calcificazione risulta evidente dopo 10 giorni di stimolazione; in queste condizioni infatti i livelli di calcio aumentano e, mediante colorazione istochimica con Alizarin Red, è possibile visualizzare i depositi di idrossiapatite che si sono formati (Fig 2). Dopo 14 giorni di stimolazione con Pi 5 mM la calcificazione risulta essere ancora maggiore, ma in questo caso abbiamo notato come le cellule inizino ad essere sofferenti a causa della prolungata stimolazione. Abbiamo quindi deciso, per i successivi esperimenti, d'indurre la calcificazione mediante stimolazione con Pi 5 mM per 10 giorni.

In letteratura esistono diversi modelli cellulari in cui viene stimolata la deposizione di calcio mediante diverse concentrazioni di Pi. In particolare, per indurre la calcificazione in VSMCs umane vengono utilizzate concentrazioni nell'ordine di 2 - 3.3 mM (Jono et al., 2000; Montes de Oca et al. 2010) La concentrazione di Pi con cui stimoliamo le cellule nel nostro studio (5 mM o 15,4 mg/dl), può sembrare molto elevata, soprattutto se confrontata con i livelli di fosforemia umana (2,8 - 4,5 mg/dl). Bisogna però considerare che i valori fisiologici di fosforemia nel ratto

sono già molto più alti rispetto all'uomo, quindi la concentrazione di 5 mM “mima” la condizione di iperfosforemia nel ratto. Anche Prosdocimo et al. in uno studio del 2010, utilizzano infatti Pi 3 - 5 mM per indurre calcificazione in VSMCs di ratto (Prosdocimo et al. 2010). Nel nostro studio, come anche in quello appena citato, viene utilizzato come stimolo il fosforo inorganico, di cui è possibile calcolare precisamente la concentrazione che si vuole utilizzare. Molti autori, invece, anche tra quelli che utilizzano cellule di ratto, scelgono come stimolo il fosforo organico sotto forma di  $\beta$ -glicerofosfato ( $\beta$ -GP), quasi sempre alla concentrazione di 10 mM (Panizo et al., 2009; Trion et al., 2008). Il  $\beta$ -GP è lo stimolo più scelto anche per indurre calcificazione in VSMCs bovine (Jono et al., 2000; Montes de Oca et al.; Shioi et al., 1995; Wada et al., 1999). Questa molecola è in grado di donare Pi grazie all'azione della fosfatasi alcalina, enzima presente nei sieri utilizzati nei media di coltura. Utilizzando come stimolo  $\beta$ -GP non è quindi possibile sapere la concentrazione effettiva di Pi con cui si stimolano le cellule, essendo dipendente dalla presenza e dall'attività della fosfatasi alcalina. Dato il nostro interesse nel cercare di ottenere un modello di calcificazione, mediata di Pi, che fosse il più stabile e riproducibile possibile, abbiamo quindi preferito utilizzare Pi inorganico, di cui è possibile misurare la precisa concentrazione.

Oltre all'iperfosforemia, un altro importante fattore di rischio cardiovascolare tipico dei soggetti uremici, è rappresentato dall'anemia cronica (Locatelli et al.,

2009). Per ottimizzare la terapia dell'anemia, ai pazienti in emodialisi che risultano resistenti al trattamento con eritropoietina e sviluppano un'anemia con elevati livelli circolanti di ferritina, viene somministrato acido ascorbico (AA). Si ritiene infatti che questa molecola possa aumentare la responsività dell'organismo all'eritropoietina in parte mobilitando il ferro dai suoi depositi tissutali, in parte agendo come antiossidante. Sebbene l'efficacia dell'AA non sia del tutto comprovata, esso viene a volte somministrato al termine della seduta dialitica a questi pazienti poco responsivi all'eritropoietina, mediante diversi schemi terapeutici. (Deved et al., 2009). Tra questi, il più utilizzato, prevede la somministrazione di 500mg di AA endovena tre volte alla settimana.

Per verificare se l'uso dell'AA a dosaggi simili a quelli utilizzati nei pazienti in dialisi possa avere conseguenze sulle calcificazioni vascolari, abbiamo indagato il suo effetto, combinato a quello del fosfato, nel nostro modello di calcificazione *in vitro*.

Abbiamo per prima cosa osservato che l'AA è in grado di potenziare la deposizione di calcio, indotta dalla stimolazione con Pi 5 mM, in modo concentrazione-dipendente (Fig 3). La deposizione di calcio infatti aumenta progressivamente con l'aumentare della concentrazione di AA, raggiungendo un picco in presenza di AA 50 µg/ml. A concentrazioni maggiori, invece, la deposizione di calcio diminuisce. Questo è dovuto alla formazione e precipitazione di cristalli di ossalato di calcio.



Nel 2007 Trion et al. hanno saggiato l'effetto di diverse concentrazioni di AA su VSMC di ratto neonatale, mostrando anch'essi come all'aumentare di tali concentrazioni, aumenti la deposizione di calcio indotta da  $\beta$ -glicerofosfato 10mM (Trion et al., 2008). Gli autori saggiano anche alte concentrazioni di AA (500  $\mu$ g/ml) senza notare alcuna precipitazione di cristalli di ossalato di calcio. Questo potrebbe essere dovuto alle diverse condizioni sperimentali utilizzate, tra cui una concentrazione di calcio molto alta (8 mM) e l'utilizzo di  $\beta$ -GP come stimolo, che non ci permette di sapere la concentrazione esatta di Pi con cui inducono la calcificazione. In realtà, a causa del forte aumento dell'acidità del medium di cultura che si verifica in presenza di elevate concentrazioni di AA, gli autori scelgono di utilizzare anch'essi la concentrazione di 50  $\mu$ g/ml per i successivi esperimenti.

Abbiamo quindi valutato l'effetto sulla calcificazione vascolare a diverse concentrazioni di Pi, in presenza o assenza di AA, al fine di valutare se l'acido ascorbico possa avere un effetto pro-calcificante, come avviene in altre linee cellulari. Abbiamo ottenuto due differenti curve concentrazione-risposta da cui risulta che l'effetto dell'AA si manifesta solo in presenza di concentrazioni di Pi pari a 5mM e non per concentrazioni inferiori (Fig 5), dimostrando così che l'effetto dell'AA sulla calcificazione è dovuto ad una sua azione combinata con alte concentrazioni di Pi. L'AA ha quindi un effetto potenziante su un fenomeno che è dipendente dal Pi. Al fine di confermare questa ipotesi abbiamo trattato le cellule con Pi ed AA in presenza di acido fosfonoformico (PFA), un inibitore del

co-trasportatore sodio-fosfato della famiglia di Pit-1. La calcificazione vascolare risulta totalmente inibita dall'aggiunta del PFA il quale, inibendo il co-trasportatore sodio/fosfato dipendente Pit-1, impedisce l'ingresso di fosfato nella cellula ed abolisce quindi lo stimolo pro-calcificante (Fig 6). L'AA potenzia dunque la calcificazione delle VSMCs che si manifesta in seguito alla stimolazione delle cellule con Pi 5 mM. E' interessante anche notare come il trattamento delle cellule con il solo AA non induca alcun aumento della deposizione di calcio. L'AA quindi, in assenza di Pi, non ha effetto *per se* nell'indurre calcificazione.

Oltre a valutare gli effetti combinati di AA e Pi sulla deposizione di calcio, ne abbiamo indagato i possibili effetti sulla differenziazione cellulare.

Abbiamo per prima cosa valutato l'espressione di  $\alpha$ -actina, proteina tipica del fenotipo muscolare. Nel nostro modello la stimolazione con il solo Pi alla concentrazione di 5 mM per 7 giorni, pur innescando il processo di calcificazione, non causa una diminuzione nei livelli di questa proteina (Fig 7). Pertanto, il fosfato da solo non sembra in grado di innescare una de-differenziazione delle VSMCs. Questi dati sono in contrasto con quanto dimostrato da Steitz et al., secondo cui la stimolazione con elevati livelli di Pi è sufficiente per indurre inibizione nell'espressione di  $\alpha$ -actina (Steitz et al., 2001). Questa discrepanza potrebbe essere dovuta al diverso modello *in vitro* in cui viene analizzata l'espressione della proteina. In questo studio vengono infatti utilizzate VSMCs bovine e la calcificazione viene indotta con  $\beta$ -GP 10mM.

Nel nostro modello è la concomitante stimolazione con Pi 5 mM e AA 50 $\mu$ g/ml per 7 giorni ad indurre invece un'evidente riduzione dell'espressione proteica di  $\alpha$ -actina (Fig 7), suggerendo che una loro azione combinata sia in grado di modificare l'assetto fenotipico delle cellule. E' interessante notare che le cellule stimulate con il solo AA mostrano, dopo 7 giorni di esposizione, una lieve diminuzione nell'espressione di  $\alpha$ -actina; questa tendenza è più evidente dopo 11 giorni di esposizione, suggerendo un possibile effetto dell'AA *per se* sulla differenziazione cellulare delle VSMCs.

Abbiamo considerato a questo punto l'effetto dell'AA sull'espressione genica di Cbfa1, fattore di trascrizione coinvolto nella differenziazione osteoblastica, osservando un picco nella sua espressione dopo 7 giorni di stimolazione con Pi 5 mM e AA. (Fig. 8) Tale incremento rispetto alle cellule controllo al giorno 7 è di 2,06 volte. Abbiamo quindi valutato l'espressione di mRNA di Cbfa1, dopo 7 giorni di calcificazione, in presenza o assenza di AA, osservando come, in seguito ad una stimolazione combinata di Pi e AA, si verifichi un aumento nella sintesi di tale fattore di trascrizione osteoblastica rispetto alle cellule stimulate solo con Pi (Fig. 9). Questi dati per la prima volta dimostrano l'effetto combinato di Pi e AA nell'indurre una differenziazione in senso simil-osteoblastico in VSMCs di ratto. Inoltre, analogamente a quanto osservato per l'espressione proteica di  $\alpha$ -actina, anche l'espressione genica di Cbfa1 sembra influenzata, dalla sola presenza dell'AA. Infatti, nelle cellule stimulate unicamente con AA, si può notare un leggero aumento dell'espressione dell'RNA messaggero di Cbfa1 rispetto alle

cellule controllo. Questo dato conforta la precedente osservazione: è possibile che l'AA abbia un effetto *per se* sulla differenziazione cellulare delle VSMCs.

Nel nostro studio abbiamo quindi dimostrato come l'AA abbia un'azione potenziante sulla calcificazione indotta da elevate concentrazioni di Pi (5mM). Tale effetto porta ad un aumento nei livelli di calcio ed induce una de-differenziazione cellulare ed un cambiamento fenotipico delle VSMCs in senso simil-osteoblastico. L'AA *per se* non induce un aumento nella deposizione vascolare di calcio, mentre sembra che abbia un effetto sulla differenziazione in senso osteoblastico delle VSMCs (Ciceri et al. 2011).

Una possibile spiegazione del fatto che l'AA abbia un effetto potenziante sulla deposizione di calcio indotta da Pi, si potrebbe ricercare nel ruolo che l'AA svolge quale cofattore in diversi processi, tra cui la biosintesi del collagene intracellulare, l'attivazione della fosfatasi alcalina e la deposizione di calcio negli osteoblasti (Franceschi et al., 1994). Inoltre, studi sulle cellule mesenchimali (Franceschi, 1992), condrali (Farquharson et al., 1998) e su cellule ATDC5 (una linea derivata da carcinoma embrionale murino) hanno evidenziato ulteriormente l'importanza dell'AA nel promuovere la differenziazione dei condrociti e nell'accelerare le tappe che fisiologicamente si osservano nell'ossificazione endocondrale. (Altaf et al., 2006). In queste cellule, inoltre, l'esposizione ad AA si associa all'aumentata espressione di alcuni geni, tra cui, Sox9, collagene II e collagene X, che sono implicati sia nella fisiologica mineralizzazione del tessuto scheletrico, sia nelle

calcificazioni vascolari patologiche che si osservano in corso di insufficienza renale (Altaf et al., 2006). L'AA sembra inoltre in grado di aumentare la produzione di matrice da parte dei condrociti e la sintesi della 1,25(OH)vitamina D, a cui si accompagna un incremento nell'espressione di recettori per la vitamina D (VDR). Tutto ciò potrebbe causare un'amplificazione nella risposta dei VDR alla Vitamina D con conseguente ulteriore stimolo della differenziazione terminale dei condrociti (Farquharson et al., 1998). Uno di questi meccanismi potrebbe quindi essere coinvolto negli effetti che l'AA esercita sulla deposizione di calcio indotta da Pi. nel nostro modello *in vitro*.

Dal punto di vista clinico è infine molto importante notare che nei pazienti in dialisi si somministrano dai 500 ai 1000 mg in bolo endovenosa di AA. L'AA si distribuisce nell'organismo con un andamento farmacocinetico tale per cui il picco di concentrazione ematica, raggiunto entro tre ore, corrisponde a circa 40-50µg/ml, lo stesso range di concentrazione che abbiamo dimostrato essere in grado, nel nostro modello sperimentale, di potenziare la calcificazione indotta da elevate concentrazioni di Pi. Inoltre, la presenza nella soluzione di dialisi di calcio e di bicarbonato crea una situazione di alcalosi metabolica che può favorire la precipitazione del calcio in questi pazienti che sono anche frequentemente trattati con Vitamina D, che a sua volta aumenta l'assorbimento di calcio e fosforo. Si creano così delle condizioni che possono favorire lo sviluppo di calcificazione vascolare (Branaccio et al., 2002).

I dati ottenuti dal nostro studio, effettuato su un modello *in vitro*, potrebbero quindi portare a riconsiderare l'utilizzo dell'AA in pazienti in dialisi.

Nell'ambito dello studio delle calcificazioni dei tessuti vascolari nell'uremia, abbiamo intrapreso uno studio finalizzato ad analizzare l'effetto di lantanio sulle CV. Il lantanio carbonato, agendo come chelante del fosforo, è uno dei farmaci attualmente utilizzati per ridurre gli elevati livelli di fosfati presenti nei pazienti con insufficienza renale cronica. Viene assorbito in minima parte in seguito a somministrazione orale (biodisponibilità orale assoluta <0,002%) e la piccola frazione assorbita si lega alle proteine plasmatiche in notevole quantità (>99,7%) (Damment and Pennick, 2008).

In questo studio abbiamo per prima cosa appurato che  $\text{LaCl}_3$  è in grado di esplicare un'azione protettiva nel nostro modello *in vitro*. Infatti, dopo 7 giorni di calcificazione inibisce la deposizione di calcio indotta da Pi in modo concentrazione-dipendente (fig. 10). Questo risultato è confermato anche dal saggio istochimico con Alizarin Red che evidenzia come le cellule trattate con  $\text{LaCl}_3$  abbiano una minor quantità di depositi di calcio rispetto a quelle stimulate solo con Pi (fig. 12). E' interessante notare come, dopo aggiunta di  $\text{LaCl}_3$ , le concentrazioni di Pi nel medium di calcificazione non varino, a dimostrazione del fatto che l'effetto del lantanio non è dovuto ad una sua azione chelante, ma è il risultato di un effetto diretto sulle cellule.

Anche Shi et al. hanno mostrato come  $\text{LaCl}_3$  sia in grado di ridurre in modo concentrazione dipendente la progressione della CV indotta dal fosforo in VSMCs di ratto, confermando quanto da noi dimostrato. In questo studio si riscontra però una differenza importante rispetto al nostro modello di calcificazione: lo stimolo utilizzato è infatti  $\beta\text{-GP}$  e non è quindi possibile sapere la precisa concentrazione di Pi mediante cui viene indotta la calcificazione. Forse per questo motivo, gli autori osservano come  $\text{LaCl}_3$  eserciti il suo massimo effetto ad una concentrazione di 10  $\mu\text{M}$ , mentre i nostri risultati evidenziano come tale effetto si ottenga in presenza di  $\text{LaCl}_3$  100  $\mu\text{M}$  (Shi et al., 2009).

Dopo aver dimostrato l'efficacia di  $\text{LaCl}_3$  nell'inibire la calcificazione, abbiamo iniziato a studiare il possibile meccanismo d'azione mediante cui esplica tale effetto. E' stato dimostrato che diversi cationi bi e trivalenti come magnesio, stronzio, bario, berillio e gadolinio sono in grado di legarsi al Calcium Sensing Receptor (CaSR) (Saidak et al., 2009), un recettore sensibile ai livelli extracellulari di calcio (Brown et al., 1993). Abbiamo quindi ipotizzato che il lantanio, essendo un catione trivalente, potesse esplicare la sua azione protettiva mediante interazione con tale recettore.

Al fine di verificare questa ipotesi, abbiamo saggiato l'effetto sulla deposizione di calcio del gadolinio, un catione trivalente con caratteristiche simili al La, noto agonista del CaSR.  $\text{GdCl}_3$ , nel nostro modello di calcificazione, si è mostrato in grado d'inibire la deposizione di calcio indotta da Pi in modo concentrazione dipendente, esercitando il suo massimo effetto inibente ad una concentrazione pari

a 50 $\mu$ M (Fig. 11). L'azione protettiva del GdCl<sub>3</sub> è confermata, come nel caso del lantanio, anche dalla colorazione con Alizarin Red (Fig. 12).

Questi dati sono in contrasto con quanto mostrato in uno studio del 2009 da Alam et al., secondo cui il trattamento con GdCl<sub>3</sub> causa un aumento della calcificazione in VSMC bovine in modo concentrazione-dipendente (Alam et al., 2009). Oltre alla diversa specie cellulare, la discrepanza dei dati potrebbe essere dovuta anche alle differenti condizioni sperimentali mediante cui viene indotta la calcificazione. Le cellule vengono infatti stimulate con  $\beta$ -GP 5mM, e quindi non viene specificata la concentrazione di Pi, ed in presenza di ridotte concentrazioni di calcio (1,2 mM), mentre nel nostro modello la concentrazione di calcio nel medium è di 1,8 mM.

Per valutare se l'azione protettiva svolta nel nostro modello cellulare da LaCl<sub>3</sub> e GdCl<sub>3</sub> fosse presente anche dopo più giorni di calcificazione, abbiamo osservato l'effetto di LaCl<sub>3</sub> 100  $\mu$ M e GdCl<sub>3</sub> 50 $\mu$ M dopo 15 giorni di trattamento in presenza di Pi. E' interessante notare come, nonostante la calcificazione progredisca con il tempo, sia nelle cellule stimulate con solo Pi, sia in quelle trattate con LaCl<sub>3</sub> e GdCl<sub>3</sub>, non varia l'entità dell'effetto esercitato dai due composti in termini di percentuale d'inibizione della calcificazione (Fig. 13). Entrambi i composti si sono quindi dimostrati in grado di mantenere il loro effetto anche dopo un lungo periodo di stimolazione con Pi.

Questi dati confermano che LaCl<sub>3</sub> è quindi in grado di rallentare la progressione della calcificazione indotta da Pi.

Abbiamo a questo punto saggiato l'effetto sulla calcificazione di altre due sostanze



in grado d'interagire con il CaSR: gli agonisti ortosterici Neomicina, un antibiotico aminoglicosidico, e Spermina, una poliamina. Anche in questo caso i due agonisti si sono dimostrati in grado, proprio come  $\text{LaCl}_3$  e  $\text{GdCl}_3$  di inibire la deposizione di calcio indotta da Pi (Fig. 15). Oltre agli agonisti ortosterici, anche un agonista allosterico positivo, il calciomimetico calindol, si è dimostrato in grado di inibire la deposizione di calcio indotta da Pi in modo concentrazione-dipendente, raggiungendo l'effetto massimo a 100nM (Fig. 16). Quindi, dato che diversi composti in grado d'interagire con il CaSR causano una diminuzione della calcificazione, anche il  $\text{LaCl}_3$  potrebbe svolgere il suo ruolo protettivo sulle calcificazioni vascolari grazie all'interazione ed al forte legame con questo recettore.

Altre evidenze in letteratura portano a ipotizzare un possibile coinvolgimento del CaSR negli effetti mediati dal lantanio. In particolare è stato dimostrato che, affinché  $\text{LaCl}_3$  espliciti il suo effetto protettivo, è necessaria l'attivazione di due delle tre principali vie delle MAPK: ERK e JNK (Shi et al., 2009). Inoltre, tale effetto, viene annullato dall'inibizione di una proteina G sensibile alla Pertussina (Shi et al., 2009). Dato che è noto che il CaSR è un recettore associato alle proteine G e che è in grado di attivare la cascata delle MAPK, si può supporre che sia tramite l'interazione con questo recettore che  $\text{LaCl}_3$  espliciti il suo effetto sulle calcificazioni vascolari. In un recente studio è stato inoltre dimostrato come il trattamento con  $\text{LaCl}_3$  sia in grado di far revertire in parte la diminuzione dell'espressione di CaSR in VSMC bovine stimulate con  $\beta$ -GP 10mM (Zhao et al.

2011). Tale diminuzione è stato dimostrato essere associata ad una condizione di calcificazione (Alam et al., 2009). Anche in questo caso  $\text{LaCl}_3$  esercita quindi un'azione protettiva nei confronti delle cellule stimulate con Pi grazie alla sua interazione con il CaSR.

Per confermare l'ipotesi che nel nostro modello il  $\text{LaCl}_3$  agisca grazie all'interazione con il CaSR, abbiamo studiato l'effetto combinato di  $\text{LaCl}_3$  e calindol sulla deposizione di calcio indotta da Pi.

E' noto che un composto che agisce come modulatore allosterico positivo è in grado d'indurre una modificazione conformazionale nel recettore a cui si lega tale da aumentare l'affinità del recettore stesso per il suo agonista ortosterico, incrementandone di conseguenza la potenza. Tale incremento è dimostrato dal fatto che una cooperazione tra un modulatore allosterico positivo ad un agonista, sullo stesso recettore, causa uno spostamento a sinistra della curva concentrazione-risposta dell'agonista. Quindi, la presenza di calindol, noto modulatore allosterico positivo del CaSR, dovrebbe aumentare la potenza del lantanio, se quest'ultimo agisse come agonista di tale recettore.

I dati ottenuti mostrano come l'aggiunta di calindol, ad una concentrazione tale da non indurre inibizione della calcificazione, provochi effettivamente un potenziamento dell'effetto inibitorio del  $\text{LaCl}_3$ . Infatti il calindol causa uno spostamento a sinistra della curva concentrazione-risposta del  $\text{LaCl}_3$  (Fig. 18), come confermato dall'analisi dei parametri delle curve: il valore di  $\text{IC}_{50}$  della curva ottenuta in presenza di solo  $\text{LaCl}_3$  che è di 19.0, mentre in presenza anche di

Calindol è significativamente minore (9.6  $\mu$ M). Inoltre, mentre la Hill slope, in presenza di solo La, è 1.06, in presenza anche di Calindol è 1.70. Tutto ciò conferma il fatto che sussista una cooperazione positiva tra  $\text{LaCl}_3$  e Calindol.

Questo dato evidenzia quindi una correlazione diretta tra  $\text{LaCl}_3$  e Calindol, supportando così l'ipotesi che il  $\text{LaCl}_3$  esplichi la sua azione protettiva mediante interazione con il CaSR (Ciceri et al. 2012).

Dal punto di vista più strettamente clinico, questi studi sono molto interessanti in quanto attualmente i pazienti in dialisi, iperfosforemici e affetti da iperparatiroidismo secondario, possono essere trattati con Lantanio Carbonato in associazione con il calciomimetico Cinacalcet. I nostri studi *in vitro* sull'effetto combinato di  $\text{LaCl}_3$  e Calindol nell'inibire la calcificazione indotta da Pi, suggeriscono che l'associazione del Lantanio con un calciomimetico potrebbe avere un effetto positivo nel ridurre le CV, grazie all'interazione di questi composti con il medesimo recettore, identificabile probabilmente nel CaSR.

Per poter meglio comprendere il meccanismo mediante cui il  $\text{LaCl}_3$  svolge la sua azione protettiva sulle VSMCs stimulate con elevati livelli di Pi, ne abbiamo indagato l'effetto sull'espressione proteica di  $\alpha$ -actina, una proteina caratteristica del fenotipo muscolare e quindi considerata marker delle VSMC in coltura. Il Pi agisce causando una diminuzione dell'espressione della proteina e quindi promuovendo una dedifferenziazione cellulare. Nelle cellule trattate con  $\text{LaCl}_3$ , invece, i livelli di  $\alpha$ -actina sono elevati, tanto quanto nel controllo (Fig. 19). Il

LaCl<sub>3</sub> permette quindi alle cellule di preservare il loro fenotipo muscolare. A conferma di ciò abbiamo indagato il suo effetto sull'espressione proteica di un'altra proteina tipica del fenotipo muscolare, la SM22 $\alpha$ . Anche in questo caso il Pi provoca una riduzione dell'espressione della proteina, mentre LaCl<sub>3</sub> mantiene i livelli di SM22 $\alpha$  uguali a quelli delle cellule controllo (Fig. 20). Abbiamo anche analizzato la modulazione nel tempo dell'espressione di  $\alpha$ -actina e SM22 $\alpha$  in risposta al trattamento con LaCl<sub>3</sub>, ed i risultati mostrano come tale trattamento preservi l'espressione delle due proteine anche dopo una prolungata stimolazione con Pi (12 giorni) (Fig. 21 e 22).

Il LaCl<sub>3</sub> sembra quindi in grado di proteggere le cellule impedendo la diminuzione, indotta dal Pi, dell'espressione di due proteine fondamentali per il mantenimento del fenotipo muscolare,  $\alpha$ -actina e SM22 $\alpha$ . Anche in uno studio del 2009 è stato osservato come l'espressione proteica di  $\alpha$ -actina, ridotta dalla stimolazione con Pi, venga invece mantenuta ai livelli del controllo dal trattamento con LaCl<sub>3</sub> (Shi et al., 2009). Questo dato conferma quanto da noi dimostrato in merito all'azione protettiva di LaCl<sub>3</sub> nell'impedire la dedifferenziazione cellulare delle VSMCs indotta dal Pi.

Abbiamo poi indagato se il LaCl<sub>3</sub> avesse un effetto anche sull'espressione genica di Cbfa1, fattore di trascrizione fondamentale per la differenziazione degli osteoblasti, che si è dimostrato essere in grado di favorire l'induzione del fenotipo osteoblastico in VSMCs stimulate con elevati livelli di Pi. Nel nostro modello cellulare abbiamo dimostrato esserci un picco nell'espressione del mRNA di Cbfa1

dopo sette giorni di stimolazione con Pi. Abbiamo quindi valutato l'effetto del trattamento con  $\text{LaCl}_3$  al settimo giorno di calcificazione notando come tale trattamento non influisca sull'aumento dell'espressione genica di  $\text{Cbfa1}$  indotto da Pi (Fig. 23).  $\text{LaCl}_3$  potrebbe quindi ritardare la progressione della calcificazione indotta da Pi mediante il mantenimento di elevati livelli di espressione di proteine muscolari, mentre non si è dimostrato in grado di preservare le cellule dall'aumento dell'espressione genica di  $\text{Cbfa}$  indotto da Pi.

La perdita delle proteine marker del fenotipo muscolare è un fenomeno precoce, che avviene prima dello sviluppo di calcificazione (Speer et al., 2009); è quindi ipotizzabile che sia sufficiente l'azione del  $\text{LaCl}_3$  nell'impedire la dedifferenziazione delle VSMC, favorendo il mantenimento di elevati livelli di proteine muscolari, al fine di inibire lo sviluppo di calcificazioni vascolari.

In riferimento invece ad un possibile effetto del  $\text{LaCl}_3$  sull'espressione di  $\text{Cbfa1}$  in VSMCs di ratto, Shi et al. hanno osservato come  $\text{LaCl}_3$  sia in grado di ridurre l'espressione del fattore di trascrizione, indotta dalla stimolazione con  $\beta$ -GP 10mM, andando però a valutare i livelli della proteina e non del mRNA di  $\text{Cbfa1}$  (Shi et al., 2009). Il  $\text{LaCl}_3$  potrebbe quindi esercitare un'azione anche sul  $\text{Cbfa1}$  andando ad agire non tanto sull'espressione genica a monte, ma su quella della proteina.

Per poter approfondire il meccanismo d'azione del  $\text{LaCl}_3$ , abbiamo studiato il suo effetto sull'espressione genica di un'altra proteina coinvolta nella regolazione dello sviluppo delle calcificazioni vascolari, la Matrix Gla Protein (MGP). In particolare

la MGP è stato dimostrato essere una proteina in grado di inibire la mineralizzazione extracellulare. Abbiamo per prima cosa analizzato l'andamento nel tempo dell'espressione del suo mRNA nelle VSMCs stimolate o meno con Pi, osservando come, nelle cellule coltivate con medium di calcificazione senza Pi (controllo), si evidenzi un picco nell'espressione di mRNA dopo cinque giorni di coltura (Fig. 24). Dato che nel medium in cui sono state coltivate queste cellule è presente AA 50µg/ml, abbiamo ipotizzato che l'aumento nei livelli di MGP osservati nei controlli potesse essere causato dall'azione che l'AA sembra avere *per se* sulla differenziazione delle VSMCs. Abbiamo quindi provato a valutare l'espressione genica di MGP dopo cinque giorni di coltura in assenza di AA, osservando come effettivamente in questo caso l'aumento dei livelli di MGP, rispetto alle cellule al giorno zero, sia decisamente minore di quello delle cellule coltivate in presenza di AA (dati non mostrati).

Passando poi a valutare l'effetto di Pi sull'espressione di MGP, i risultati ottenuti hanno evidenziato come la stimolazione con Pi induca un aumento nei livelli di MGP di 1,71 volte rispetto alle cellule controllo al giorno 5 (Fig. 24). Tale aumento potrebbe essere imputabile ad un meccanismo di difesa che le cellule attuano in risposta alla stimolazione con Pi. MGP è infatti una proteina in grado d'inibire la calcificazione, grazie soprattutto alla sua capacità di legare i cristalli di idrossiapatite (Roy and Nishimoto, 2002). Proudfoot et al., evidenziando un aumento nei livelli di espressione genica in VSMC umane calcificate, hanno ipotizzato che la MGP non sia più in grado di legare il calcio in queste cellule, le

quali, in risposta al conseguente aumento dei livelli di calcio, inducono l'espressione di nuova MGP (Proudfoot et al., 1998)

A differenza di quanto avviene in presenza di solo Pi, l'aggiunta di  $\text{LaCl}_3$  non causa una modificazione nei livelli di mRNA della MGP rispetto alle cellule controllo al giorno 5 (Fig. 24). E' importante sottolineare come, dopo 5 giorni di stimolazione con Pi, non ci sia ancora stato un innalzamento nei livelli di  $\text{Cbf}\alpha 1$  e le cellule non siano ancora calcificate. Il fatto che l'espressione genica di MGP non aumenti in presenza di  $\text{LaCl}_3$  potrebbe quindi essere dovuto al fatto che le cellule siano già protette grazie all'effetto esercitato dal  $\text{LaCl}_3$  prima che si manifesti una calcificazione conclamata, e quindi non sentano la necessità d'indurre un'elevata espressione di una proteina inibitrice della calcificazione qual è la MGP.

In questo studio abbiamo quindi dimostrato come il lantanio cloruro sia in grado d'inibire la deposizione di calcio indotta da elevate concentrazioni di Pi. Dato che è noto che diversi cationi bi e trivalenti con caratteristiche simili al lantanio sono in grado di legarsi al CaSR, abbiamo ipotizzato che l'effetto di  $\text{LaCl}_3$  sulle CV fosse dovuto ad una sua interazione con tale recettore. Nel nostro modello *in vitro* quattro diverse sostanze che si legano al CaSR si sono dimostrate in grado di inibire la calcificazione indotta da fosforo, supportando la possibilità che anche  $\text{LaCl}_3$  esplichi la sua azione attraverso il CaSR. A conferma di tale ipotesi abbiamo evidenziato una correlazione diretta tra  $\text{LaCl}_3$  e il calciomimetico calindol, un modulatore allosterico positivo del CaSR (Ciceri et al. 2012).

LaCl<sub>3</sub> si è inoltre dimostrato in grado d'impedire il dedifferenziamento delle VSMC preservando l'espressione di marker tipici del fenotipo muscolare. Tutto ciò crea una situazione in cui le cellule sono protette e non sono stimolate a produrre MGP come meccanismo di difesa.



# **CONCLUSIONI**

Nell'ambito dello studio delle calcificazioni vascolari in corso d'uremia, abbiamo utilizzato un modello *in vitro* per indagare i meccanismi molecolari e cellulari coinvolti nella patogenesi e nella progressione di tale patologia.

Il nostro primo obiettivo è stato quello d'indurre la calcificazione delle VSMCs, ottenute da espianti di aorta di ratto, mediante stimolazione con fosforo inorganico. Dagli studi effettuati si deduce che le VSMCs vasali da noi utilizzate calcificano se stimulate con concentrazioni di Pi pari a 5mM per 10 giorni.

Su questo modello di calcificazione vascolare *in vitro*, abbiamo poi dimostrato che dosi farmacologiche di acido ascorbico potenziano la deposizione di calcio indotta da concentrazioni di fosfato calcificanti. Inoltre, la combinazione delle due sostanze si traduce in una dedifferenziazione cellulare e in un cambiamento fenotipico delle VSMCs in senso simil-osteoblastico. Alla luce di questi dati, l'utilizzo dell'AA per via endovenosa nei pazienti in dialisi come complemento alla terapia per l'anemia cronica, dovrebbe essere rivalutato.

Siamo passati quindi a studiare l'effetto sulle CV del lantanio, uno dei farmaci attualmente utilizzati per ridurre gli elevati livelli di fosfati presenti nei pazienti con insufficienza renale cronica. Dai dati ottenuti, possiamo affermare che  $\text{LaCl}_3$  è in grado di ridurre efficacemente la progressione della CV indotta dal fosforo. Tale effetto sembra essere dovuto all'interazione di  $\text{LaCl}_3$  con il CaSR, recettore

sensibile ai livelli di calcio extracellulare, che è stato dimostrato essere espresso dalle VSMCs di ratto (Smajilovic et al., 2006). Abbiamo anche dimostrato come  $\text{LaCl}_3$ , mantenendo elevati i livelli di proteine muscolari quali  $\alpha$ -actina e SM22 $\alpha$ , sia in grado d'inibire la dedifferenziazione delle VSMCs, rallentando la progressione della calcificazione indotta da Pi.

I risultati fin ora ottenuti ci hanno permesso di approfondire la conoscenza dei meccanismi alla base dello sviluppo di calcificazioni vascolari. Attraverso studi futuri proseguiremo nella comprensione di tali meccanismi al fine di chiarire appieno il contributo dei singoli fattori nel processo di calcificazione in corso di uremia.

# **BIBLIOGRAFIA**

- Ahmed S, O'Neill KD, Hood AF, Evan AP and Moe SM (2001) Calciphylaxis is associated with hyperphosphatemia and increased osteopontin expression by vascular smooth muscle cells. *Am J Kidney Dis* **37**(6):1267-1276.
- Alam MU, Kirton JP, Wilkinson FL, Towers E, Sinha S, Rouhi M, Vizard TN, Sage AP, Martin D, Ward DT, Alexander MY, Riccardi D and Canfield AE (2009) Calcification is associated with loss of functional calcium-sensing receptor in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* **81**(2):260-268.
- Altaf FM, Hering TM, Kazmi NH, Yoo JU and Johnstone B (2006) Ascorbate-enhanced chondrogenesis of ATDC5 cells. *Eur Cell Mater* **12**:64-69; discussion 69-70.
- Altmann P, Barnett ME and Finn WF (2007) Cognitive function in Stage 5 chronic kidney disease patients on hemodialysis: no adverse effects of lanthanum carbonate compared with standard phosphate-binder therapy. *Kidney Int* **71**(3):252-259.
- Attallah N, Osman-Malik Y, Frinak S and Besarab A (2006) Effect of intravenous ascorbic acid in hemodialysis patients with EPO-hyporesponsive anemia and hyperferritinemia. *Am J Kidney Dis* **47**(4):644-654.
- Barnes MJ (1969) Ascorbic acid and the biosynthesis of collagen and elastin. *Bibl Nutr Dieta* **13**:86-98.
- Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ and London GM (2001) Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension* **38**(4):938-942.
- Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie EG and Chertow GM (2004) Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* **15**(8):2208-2218.
- Block GA, Martin KJ, de Francisco AL, Turner SA, Avram MM, Suranyi MG, Hercz G, Cunningham J, Abu-Alfa AK, Messa P, Coyne DW, Locatelli F, Cohen RM, Evenepoel P, Moe SM, Fournier A, Braun J, McCary LC, Zani VJ, Olson KA, Drueke TB and Goodman WG (2004) Cinacalcet for secondary hyperparathyroidism in patients receiving hemodialysis. *N Engl J Med* **350**(15):1516-1525.
- Boskey AL, Maresca M, Ullrich W, Doty SB, Butler WT and Prince CW (1993) Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Miner* **22**(2):147-159.

- Bostrom K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM and Demer LL (1993) Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* **91**(4):1800-1809.
- Brancaccio D, Tetta C, Gallieni M and Panichi V (2002) Inflammation, CRP, calcium overload and a high calcium-phosphate product: a "liaison dangereuse". *Nephrol Dial Transplant* **17**(2):201-203.
- Brown EM (2000) Calcium receptor and regulation of parathyroid hormone secretion. *Rev Endocr Metab Disord* **1**(4):307-315.
- Brown EM, Butters R, Katz C and Kifor O (1991) Neomycin mimics the effects of high extracellular calcium concentrations on parathyroid function in dispersed bovine parathyroid cells. *Endocrinology* **128**(6):3047-3054.
- Brown EM, Fuleihan Ge-H, Chen CJ and Kifor O (1990) A comparison of the effects of divalent and trivalent cations on parathyroid hormone release, 3',5'-cyclic-adenosine monophosphate accumulation, and the levels of inositol phosphates in bovine parathyroid cells. *Endocrinology* **127**(3):1064-1071.
- Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J and Hebert SC (1993) Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* **366**(6455):575-580.
- Brown EM, Vassilev PM, Quinn S and Hebert SC (1999) G-protein-coupled, extracellular Ca(2+)-sensing receptor: a versatile regulator of diverse cellular functions. *Vitam Horm* **55**:1-71.
- Busque SM, Kerstetter JE, Geibel JP and Insogna K (2005) L-type amino acids stimulate gastric acid secretion by activation of the calcium-sensing receptor in parietal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**(4):G664-669.
- Campbell GR, Campbell JH, Manderson JA, Horrigan S and Rennick RE (1988) Arterial smooth muscle. A multifunctional mesenchymal cell. *Arch Pathol Lab Med* **112**(10):977-986.
- Canaff L, Petit JL, Kisiel M, Watson PH, Gascon-Barre M and Hendy GN (2001) Extracellular calcium-sensing receptor is expressed in rat hepatocytes. coupling to intracellular calcium mobilization and stimulation of bile flow. *J Biol Chem* **276**(6):4070-4079.
- Carrillo-Lopez N, Fernandez-Martin JL, Alvarez-Hernandez D, Gonzalez-Suarez I, Castro-Santos P, Roman-Garcia P, Lopez-Novoa JM and Cannata-Andia JB Lanthanum activates calcium-sensing receptor and enhances sensitivity to calcium. *Nephrol Dial Transplant* **25**(9):2930-2937.

- Chatterjee IB, Majumder AK, Nandi BK and Subramanian N (1975) Synthesis and some major functions of vitamin C in animals. *Ann N Y Acad Sci* **258**:24-47.
- Chen NX, Duan D, O'Neill KD, Wolisi GO, Koczman JJ, Laclair R and Moe SM (2006) The mechanisms of uremic serum-induced expression of bone matrix proteins in bovine vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* **70**(6):1046-1053.
- Chen NX, O'Neill KD, Duan D and Moe SM (2002) Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* **62**(5):1724-1731.
- Cheng SX, Geibel JP and Hebert SC (2004) Extracellular polyamines regulate fluid secretion in rat colonic crypts via the extracellular calcium-sensing receptor. *Gastroenterology* **126**(1):148-158.
- Ciceri P, Volpi E, Brenna I, Arnaboldi L, Neri L, Brancaccio D and Cozzolino M Combined effects of ascorbic acid and phosphate on rat VSMC osteoblastic differentiation. *Nephrol Dial Transplant*.
- Ciceri P, Volpi E, Brenna I, Elli F, Borghi E, Brancaccio D and Cozzolino M The combination of lanthanum chloride and the calcimimetic calindol delays the progression of vascular smooth muscle cells calcification. *Biochem Biophys Res Commun*.
- Conigrave AD, Mun HC and Lok HC (2007) Aromatic L-amino acids activate the calcium-sensing receptor. *J Nutr* **137**(6 Suppl 1):1524S-1527S; discussion 1548S.
- Cozzolino M The calciotropic hormones PTH and vitamin D: from bone to blood vessels. *J Intern Med*.
- Cozzolino M, Brancaccio D, Gallieni M and Slatopolsky E (2005) Pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease. *Kidney Int* **68**(2):429-436.
- Cozzolino M, Brenna I, Ciceri P, Volpi E, Cusi D and Brancaccio D Vascular calcification in chronic kidney disease: a changing scenario. *J Nephrol* **24 Suppl 18**:S3-10.
- Cozzolino M, Dusso AS and Slatopolsky E (2001) Role of calcium-phosphate product and bone-associated proteins on vascular calcification in renal failure. *J Am Soc Nephrol* **12**(11):2511-2516.
- Cozzolino M, Mazzaferro S and Messa P New insights into the role of calcium-sensing receptor activation. *J Nephrol* **24 Suppl 18**:S38-41.
- Cozzolino M, Mazzaferro S, Pugliese F and Brancaccio D (2008) Vascular calcification and uremia: what do we know? *Am J Nephrol* **28**(2):339-346.

- Cozzolino M, Olivi L, Voli E, Ciceri P and Brancaccio D (2009) [Prevention and treatment of secondary hyperparathyroidism in non-dialyzed patients with stage 3-5 chronic kidney disease]. *G Ital Nefrol* **26 Suppl 49**:S30-35.
- Damment S, Secker R, Shen V, Lorenzo V and Rodriguez M Long-term treatment with lanthanum carbonate reduces mineral and bone abnormalities in rats with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* **26**(6):1803-1812.
- Damment SJ and Pennick M (2008) Clinical pharmacokinetics of the phosphate binder lanthanum carbonate. *Clin Pharmacokinet* **47**(9):553-563.
- Delmas PD, Wilson DM, Mann KG and Riggs BL (1983) Effect of renal function on plasma levels of bone Gla-protein. *J Clin Endocrinol Metab* **57**(5):1028-1030.
- Deved V, Poyah P, James MT, Tonelli M, Manns BJ, Walsh M and Hemmelgarn BR (2009) Ascorbic acid for anemia management in hemodialysis patients: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis* **54**(6):1089-1097.
- Ducy P (2000) Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn* **219**(4):461-471.
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL and Karsenty G (1997) Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* **89**(5):747-754.
- Edmonds ME, Morrison N, Laws JW and Watkins PJ (1982) Medial arterial calcification and diabetic neuropathy. *Br Med J (Clin Res Ed)* **284**(6320):928-930.
- Farquharson C, Berry JL, Mawer EB, Seawright E and Whitehead CC (1998) Ascorbic acid-induced chondrocyte terminal differentiation: the role of the extracellular matrix and 1,25-dihydroxyvitamin D. *Eur J Cell Biol* **76**(2):110-118.
- Franceschi RT (1992) The role of ascorbic acid in mesenchymal differentiation. *Nutr Rev* **50**(3):65-70.
- Franceschi RT and Iyer BS (1992) Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* **7**(2):235-246.
- Franceschi RT, Iyer BS and Cui Y (1994) Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* **9**(6):843-854.
- Franceschi RT and Xiao G (2003) Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways. *J Cell Biochem* **88**(3):446-454.



- Fukui N, Zhu Y, Maloney WJ, Clohisy J and Sandell LJ (2003) Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am* **85-A Suppl 3**:59-66.
- Ganesh SK, Stack AG, Levin NW, Hulbert-Shearon T and Port FK (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**(10):2131-2138.
- Garrett JE, Tamir H, Kifor O, Simin RT, Rogers KV, Mithal A, Gagel RF and Brown EM (1995) Calcitonin-secreting cells of the thyroid express an extracellular calcium receptor gene. *Endocrinology* **136**(11):5202-5211.
- Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS and Lian JB (2005) Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem* **280**(39):33132-33140.
- Giachelli CM (2003) Vascular calcification: in vitro evidence for the role of inorganic phosphate. *J Am Soc Nephrol* **14**(9 Suppl 4):S300-304.
- Giachelli CM (2009) The emerging role of phosphate in vascular calcification. *Kidney Int* **75**(9):890-897.
- Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, Yoon C, Gales B, Sider D, Wang Y, Chung J, Emerick A, Greaser L, Elashoff RM and Salusky IB (2000) Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med* **342**(20):1478-1483.
- Handlogten ME, Shiraishi N, Awata H, Huang C and Miller RT (2000) Extracellular Ca(2+)-sensing receptor is a promiscuous divalent cation sensor that responds to lead. *Am J Physiol Renal Physiol* **279**(6):F1083-1091.
- Harmey D, Hesse L, Narisawa S, Johnson KA, Terkeltaub R and 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**(4):1199-1209.
- Heiss A, DuChesne A, Denecke B, Grotzinger J, Yamamoto K, Renne T and Jahnchen-Dechent W (2003) Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles. *J Biol Chem* **278**(15):13333-13341.
- Hering TM, Kollar J, Huynh TD, Varelas JB and Sandell LJ (1994) Modulation of extracellular matrix gene expression in bovine high-density chondrocyte

- cultures by ascorbic acid and enzymatic resuspension. *Arch Biochem Biophys* **314**(1):90-98.
- Hruska KA, Mathew S and Saab G (2005) Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circ Res* **97**(2):105-114.
- Hutchison AJ, Barnett ME, Krause R, Kwan JT and Siami GA (2008) Long-term efficacy and safety profile of lanthanum carbonate: results for up to 6 years of treatment. *Nephron Clin Pract* **110**(1):c15-23.
- Ikeda T, Shirasawa T, Esaki Y, Yoshiki S and Hirokawa K (1993) Osteopontin mRNA is expressed by smooth muscle-derived foam cells in human atherosclerotic lesions of the aorta. *J Clin Invest* **92**(6):2814-2820.
- Ivanovski O, Nikolov IG, Joki N, Caudrillier A, Phan O, Mentaverri R, Maizel J, Hamada Y, Nguyen-Khoa T, Fukagawa M, Kamel S, Lacour B, Drueke TB and Massy ZA (2009) The calcimimetic R-568 retards uremia-enhanced vascular calcification and atherosclerosis in apolipoprotein E deficient (apoE<sup>-/-</sup>) mice. *Atherosclerosis* **205**(1):55-62.
- Iyemere VP, Proudfoot D, Weissberg PL and Shanahan CM (2006) Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification. *J Intern Med* **260**(3):192-210.
- Johnson K, Polewski M, van Etten D and Terkeltaub R (2005) Chondrogenesis mediated by PPI depletion promotes spontaneous aortic calcification in NPP1<sup>-/-</sup> mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**(4):686-691.
- Johnson RC, Leopold JA and Loscalzo J (2006) Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res* **99**(10):1044-1059.
- Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H and Giachelli CM (2000) Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* **87**(7):E10-17.
- Jono S, Peinado C and Giachelli CM (2000) Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Biol Chem* **275**(26):20197-20203.
- Kameda T, Mano H, Yamada Y, Takai H, Amizuka N, Kobori M, Izumi N, Kawashima H, Ozawa H, Ikeda K, Kameda A, Hakeda Y and Kumegawa M (1998) Calcium-sensing receptor in mature osteoclasts, which are bone resorbing cells. *Biochem Biophys Res Commun* **245**(2):419-422.
- Kessler A, Faure H, Petrel C, Ruat M, Dauban P and Dodd RH (2004) N<sup>2</sup>-benzyl-N<sup>1</sup>-(1-(1-naphthyl)ethyl)-3-phenylpropane-1,2-diamines and conformationally

- restrained indole analogues: development of calindol as a new calcimimetic acting at the calcium sensing receptor. *Bioorg Med Chem Lett* **14**(12):3345-3349.
- Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R, Wildberger JE, Mahnken AH, Bohm R, Metzger T, Wanner C, Jahnen-Dechent W and Floege J (2003) Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet* **361**(9360):827-833.
- Kifor O, MacLeod RJ, Diaz R, Bai M, Yamaguchi T, Yao T, Kifor I and Brown EM (2001) Regulation of MAP kinase by calcium-sensing receptor in bovine parathyroid and CaR-transfected HEK293 cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **280**(2):F291-302.
- Komori T (2008) Regulation of bone development and maintenance by Runx2. *Front Biosci* **13**:898-903.
- Kroigaard M, Thams P and Thorn NA (1992) Polyamines in nerve terminals and secretory granules isolated from neurohypophyses. *Acta Physiol Scand* **146**(2):233-239.
- Levanon D, Bettoun D, Harris-Cerruti C, Woolf E, Negreanu V, Eilam R, Bernstein Y, Goldenberg D, Xiao C, Fliegau M, Kremer E, Otto F, Brenner O, Lev-Tov A and Groner Y (2002) The Runx3 transcription factor regulates development and survival of TrkC dorsal root ganglia neurons. *Embo J* **21**(13):3454-3463.
- Levanon D and Groner Y (2004) Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes. *Oncogene* **23**(24):4211-4219.
- Levin A and Foley RN (2000) Cardiovascular disease in chronic renal insufficiency. *Am J Kidney Dis* **36**(6 Suppl 3):S24-30.
- Levy RJ, Gundberg C and Scheinman R (1983) The identification of the vitamin K-dependent bone protein osteocalcin as one of the gamma-carboxyglutamic acid containing proteins present in calcified atherosclerotic plaque and mineralized heart valves. *Atherosclerosis* **46**(1):49-56.
- Li QL, Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi XZ, Lee KY, Nomura S, Lee CW, Han SB, Kim HM, Kim WJ, Yamamoto H, Yamashita N, Yano T, Ikeda T, Itohara S, Inazawa J, Abe T, Hagiwara A, Yamagishi H, Ooe A, Kaneda A, Sugimura T, Ushijima T, Bae SC and Ito Y (2002) Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* **109**(1):113-124.
- Li X, Yang HY and Giachelli CM (2006) Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* **98**(7):905-912.

- Locatelli F, Covic A, Eckardt KU, Wiecek A and Vanholder R (2009) Anaemia management in patients with chronic kidney disease: a position statement by the Anaemia Working Group of European Renal Best Practice (ERBP). *Nephrol Dial Transplant* **24**(2):348-354.
- Lomashvili KA, Garg P, Narisawa S, Millan JL and O'Neill WC (2008) Upregulation of alkaline phosphatase and pyrophosphate hydrolysis: potential mechanism for uremic vascular calcification. *Kidney Int* **73**(9):1024-1030.
- London GM, Marchais SJ, Guerin AP and Metivier F (2005) Arteriosclerosis, vascular calcifications and cardiovascular disease in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **14**(6):525-531.
- London GM, Pannier B, Marchais SJ and Guerin AP (2000) Calcification of the aortic valve in the dialyzed patient. *J Am Soc Nephrol* **11**(4):778-783.
- Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR and Karsenty G (1997) Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* **386**(6620):78-81.
- Magno AL, Ward BK and Ratajczak T The calcium-sensing receptor: a molecular perspective. *Endocr Rev* **32**(1):3-30.
- Mann JS (1993) Stability of gadolinium complexes in vitro and in vivo. *J Comput Assist Tomogr* **17 Suppl 1**:S19-23.
- Marz W, Seelhorst U, Wellnitz B, Tiran B, Obermayer-Pietsch B, Renner W, Boehm BO, Ritz E and Hoffmann MM (2007) Alanine to serine polymorphism at position 986 of the calcium-sensing receptor associated with coronary heart disease, myocardial infarction, all-cause, and cardiovascular mortality. *J Clin Endocrinol Metab* **92**(6):2363-2369.
- Massy ZA, Ivanovski O, Nguyen-Khoa T, Angulo J, Szumilak D, Mothu N, Phan O, Daudon M, Lacour B, Druke TB and Muntzel MS (2005) Uremia accelerates both atherosclerosis and arterial calcification in apolipoprotein E knockout mice. *J Am Soc Nephrol* **16**(1):109-116.
- Mazzaferro S, Pasquali M and Cozzolino M Treatment of cardiovascular calcification in uremia. *Curr Vasc Pharmacol* **9**(6):741-749.
- McCullough PA, Agrawal V, Danielewicz E and Abela GS (2008) Accelerated atherosclerotic calcification and Monckeberg's sclerosis: a continuum of advanced vascular pathology in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* **3**(6):1585-1598.

- McLarnon S, Holden D, Ward D, Jones M, Elliott A and Riccardi D (2002) Aminoglycoside antibiotics induce pH-sensitive activation of the calcium-sensing receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **297**(1):71-77.
- Mizobuchi M, Ogata H, Hatamura I, Koiwa F, Saji F, Shiizaki K, Negi S, Kinugasa E, Ooshima A, Koshikawa S and Akizawa T (2006) Up-regulation of Cbfa1 and Pit-1 in calcified artery of uraemic rats with severe hyperphosphataemia and secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant* **21**(4):911-916.
- Mizobuchi M, Towler D and Slatopolsky E (2009) Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **20**(7):1453-1464.
- Moe SM, Duan D, Doehle BP, O'Neill KD and Chen NX (2003) Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels. *Kidney Int* **63**(3):1003-1011.
- Molostvov G, James S, Fletcher S, Bennett J, Lehnert H, Bland R and Zehnder D (2007) Extracellular calcium-sensing receptor is functionally expressed in human artery. *Am J Physiol Renal Physiol* **293**(3):F946-955.
- Montes de Oca A, Madueno JA, Martinez-Moreno JM, Guerrero F, Munoz-Castaneda J, Rodriguez-Ortiz ME, Mendoza FJ, Almaden Y, Lopez I, Rodriguez M and Aguilera-Tejero E High-phosphate-induced calcification is related to SM22alpha promoter methylation in vascular smooth muscle cells. *J Bone Miner Res* **25**(9):1996-2005.
- Murad S, Grove D, Lindberg KA, Reynolds G, Sivarajah A and Pinnell SR (1981) Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(5):2879-2882.
- Murer H, Hernando N, Forster I and Biber J (2003) Regulation of Na/Pi transporter in the proximal tubule. *Annu Rev Physiol* **65**:531-542.
- Nagai Y, Hasegawa M, Shinmi K, Kishi C, Tsushima Y, Endo K, Okabe K, Suzuki K and Ishikawa O (2008) Nephrogenic systemic fibrosis with multiple calcification and osseous metaplasia. *Acta Derm Venereol* **88**(6):597-600.
- Nemeth EF (1990) Regulation of cytosolic calcium by extracellular divalent cations in C-cells and parathyroid cells. *Cell Calcium* **11**(5):323-327.
- Nemeth EF, Steffey ME, Hammerland LG, Hung BC, Van Wagenen BC, DelMar EG and Balandrin MF (1998) Calcimimetics with potent and selective activity on the parathyroid calcium receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(7):4040-4045.
- Neven E, Dams G, Postnov A, Chen B, De Clerck N, De Broe ME, D'Haese PC and Persy V (2009) Adequate phosphate binding with lanthanum carbonate

- attenuates arterial calcification in chronic renal failure rats. *Nephrol Dial Transplant*.
- Nikolov IG, Joki N, Nguyen-Khoa T, Guerrera IC, Maizel J, Benchitrit J, Machado Dos Reis L, Edelman A, Lacour B, Jorgetti V, Druke TB and Massy ZA Lanthanum carbonate, like sevelamer-HCl, retards the progression of vascular calcification and atherosclerosis in uremic apolipoprotein E-deficient mice. *Nephrol Dial Transplant*.
- O'Brien KD, Kuusisto J, Reichenbach DD, Ferguson M, Giachelli C, Alpers CE and Otto CM (1995) Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions. *Circulation* **92**(8):2163-2168.
- O'Neill WC, Sigrist MK and McIntyre CW Plasma pyrophosphate and vascular calcification in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* **25**(1):187-191.
- Okada E, Yamanaka M and Ishikawa O New insights into the mechanism of abnormal calcification in nephrogenic systemic fibrosis - gadolinium promotes calcium deposition of mesenchymal stem cells and dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci* **62**(1):58-63.
- Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G and Downing JR (1996) AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* **84**(2):321-330.
- Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB and Owen MJ (1997) Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* **89**(5):765-771.
- Padh H (1991) Vitamin C: newer insights into its biochemical functions. *Nutr Rev* **49**(3):65-70.
- Panizo S, Cardus A, Encinas M, Parisi E, Valcheva P, Lopez-Ongil S, Coll B, Fernandez E and Valdivielso JM (2009) RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. *Circ Res* **104**(9):1041-1048.
- Parhami F, Morrow AD, Balucan J, Leitinger N, Watson AD, Tintut Y, Berliner JA and Demer LL (1997) Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**(4):680-687.

- Pennick M, Dennis K and Damment SJ (2006) Absolute bioavailability and disposition of lanthanum in healthy human subjects administered lanthanum carbonate. *J Clin Pharmacol* **46**(7):738-746.
- Petrel C, Kessler A, Dauban P, Dodd RH, Rognan D and Ruat M (2004) Positive and negative allosteric modulators of the Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor interact within overlapping but not identical binding sites in the transmembrane domain. *J Biol Chem* **279**(18):18990-18997.
- Price PA, Otsuka AA, Poser JW, Kristaponis J and Raman N (1976) Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(5):1447-1451.
- Price PA, Parthemore JG and Deftos LJ (1980) New biochemical marker for bone metabolism. Measurement by radioimmunoassay of bone GLA protein in the plasma of normal subjects and patients with bone disease. *J Clin Invest* **66**(5):878-883.
- Price PA, Roublick AM and Williamson MK (2006) Artery calcification in uremic rats is increased by a low protein diet and prevented by treatment with ibandronate. *Kidney Int* **70**(9):1577-1583.
- Price PA, Thomas GR, Pardini AW, Figueira WF, Caputo JM and Williamson MK (2002) Discovery of a high molecular weight complex of calcium, phosphate, fetuin, and matrix gamma-carboxyglutamic acid protein in the serum of etidronate-treated rats. *J Biol Chem* **277**(6):3926-3934.
- Prosdocimo DA, Wyler SC, Romani AM, O'Neill WC and Dubyak GR Regulation of vascular smooth muscle cell calcification by extracellular pyrophosphate homeostasis: synergistic modulation by cyclic AMP and hyperphosphatemia. *Am J Physiol Cell Physiol* **298**(3):C702-713.
- Proudfoot D and Shanahan CM (2006) Molecular mechanisms mediating vascular calcification: role of matrix Gla protein. *Nephrology (Carlton)* **11**(5):455-461.
- Proudfoot D, Skepper JN, Shanahan CM and Weissberg PL (1998) Calcification of human vascular cells in vitro is correlated with high levels of matrix Gla protein and low levels of osteopontin expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**(3):379-388.
- Qiao H, Bell J, Juliao S, Li L and May JM (2009) Ascorbic acid uptake and regulation of type I collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res* **46**(1):15-24.
- Quarles LD, Sherrard DJ, Adler S, Rosansky SJ, McCary LC, Liu W, Turner SA and Bushinsky DA (2003) The calcimimetic AMG 073 as a potential treatment for

- secondary hyperparathyroidism of end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* **14**(3):575-583.
- Quinn SJ, Ye CP, Diaz R, Kifor O, Bai M, Vassilev P and Brown E (1997) The Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor: a target for polyamines. *Am J Physiol* **273**(4 Pt 1):C1315-1323.
- Raggi P, Chertow GM, Torres PU, Csiky B, Naso A, Nossuli K, Moustafa M, Goodman WG, Lopez N, Downey G, Dehmel B and Floege J The ADVANCE study: a randomized study to evaluate the effects of cinacalcet plus low-dose vitamin D on vascular calcification in patients on hemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* **26**(4):1327-1339.
- Raines EW and Ross R (1993) Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J* **69**(1 Suppl):S30-37.
- Razzaque MS Osteocalcin: a pivotal mediator or an innocent bystander in energy metabolism? *Nephrol Dial Transplant* **26**(1):42-45.
- Reyes-Cruz G, Hu J, Goldsmith PK, Steinbach PJ and Spiegel AM (2001) Human Ca<sup>2+</sup> receptor extracellular domain. Analysis of function of lobe I loop deletion mutants. *J Biol Chem* **276**(34):32145-32151.
- Riccardi D (2002) Wellcome Prize Lecture. Cell surface, ion-sensing receptors. *Exp Physiol* **87**(4):403-411.
- Riccardi D, Park J, Lee WS, Gamba G, Brown EM and Hebert SC (1995) Cloning and functional expression of a rat kidney extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(1):131-135.
- Ringer S (1883) A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *J Physiol* **4**(1):29-42 23.
- Ritter CS, Pande S, Krits I, Slatopolsky E and Brown AJ (2008) Destabilization of parathyroid hormone mRNA by extracellular Ca<sup>2+</sup> and the calcimimetic R-568 in parathyroid cells: role of cytosolic Ca and requirement for gene transcription. *J Mol Endocrinol* **40**(1):13-21.
- Ross R (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**(6423):801-809.
- Ross R (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**(2):115-126.



- Ross R and Glomset JA (1973) Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* **180**(93):1332-1339.
- Roy ME and Nishimoto SK (2002) Matrix Gla protein binding to hydroxyapatite is dependent on the ionic environment: calcium enhances binding affinity but phosphate and magnesium decrease affinity. *Bone* **31**(2):296-302.
- Ruat M, Molliver ME, Snowman AM and Snyder SH (1995) Calcium sensing receptor: molecular cloning in rat and localization to nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(8):3161-3165.
- Rutsch F, Ruf N, Vaingankar S, Toliat MR, Suk A, Hohne W, Schauer G, Lehmann M, Roscioli T, Schnabel D, Epplen JT, Knisely A, Superti-Furga A, McGill J, Filippone M, Sinaiko AR, Vallance H, Hinrichs B, Smith W, Ferre M, Terkeltaub R and Nurnberg P (2003) Mutations in ENPP1 are associated with 'idiopathic' infantile arterial calcification. *Nat Genet* **34**(4):379-381.
- Saidak Z, Brazier M, Kamel S and Mentaverri R (2009) Agonists and allosteric modulators of the calcium-sensing receptor and their therapeutic applications. *Mol Pharmacol* **76**(6):1131-1144.
- Schafer C, Heiss A, Schwarz A, Westenfeld R, Ketteler M, Floege J, Muller-Esterl W, Schinke T and Jahn-Dechent W (2003) The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest* **112**(3):357-366.
- Schwartz SM, Campbell GR and Campbell JH (1986) Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ Res* **58**(4):427-444.
- Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL and 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**(21):2168-2176.
- Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A and Giachelli CM Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circ Res* **109**(6):697-711.
- Shanahan CM and Weissberg PL (1998) Smooth muscle cell heterogeneity: patterns of gene expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**(3):333-338.
- Shankar VS, Alam AS, Bax CM, Bax BE, Pazianas M, Huang CL and Zaidi M (1992) Activation and inactivation of the osteoclast Ca<sup>2+</sup> receptor by the trivalent cation, La<sup>3+</sup>. *Biochem Biophys Res Commun* **187**(2):907-912.

- Sheinin Y, Kallay E, Wrba F, Kriwanek S, Peterlik M and Cross HS (2000) Immunocytochemical localization of the extracellular calcium-sensing receptor in normal and malignant human large intestinal mucosa. *J Histochem Cytochem* **48**(5):595-602.
- Shi Y, Gou BD, Shi YL, Zhang TL and Wang K (2009) Lanthanum chloride suppresses hydrogen peroxide-enhanced calcification in rat calcifying vascular cells. *Biometals* **22**(2):317-327.
- Shi YL, Wang LW, Huang J, Gou BD, Zhang TL and Wang K (2009) Lanthanum suppresses osteoblastic differentiation via pertussis toxin-sensitive G protein signaling in rat vascular smooth muscle cells. *J Cell Biochem* **108**(5):1184-1191.
- Shioi A, Nishizawa Y, Jono S, Koyama H, Hosoi M and Morii H (1995) Beta-glycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**(11):2003-2009.
- Shioi A, Taniwaki H, Jono S, Okuno Y, Koyama H, Mori K and Nishizawa Y (2001) Monckeberg's medial sclerosis and inorganic phosphate in uremia. *Am J Kidney Dis* **38**(4 Suppl 1):S47-49.
- Shoback DM, Thatcher J, Leombruno R and Brown EM (1984) Relationship between parathyroid hormone secretion and cytosolic calcium concentration in dispersed bovine parathyroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(10):3113-3117.
- Smajilovic S, Hansen JL, Christoffersen TE, Lewin E, Sheikh SP, Terwilliger EF, Brown EM, Haunso S and Tfelt-Hansen J (2006) Extracellular calcium sensing in rat aortic vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **348**(4):1215-1223.
- Solway J, Seltzer J, Samaha FF, Kim S, Alger LE, Niu Q, Morrissey EE, Ip HS and Parmacek MS (1995) Structure and expression of a smooth muscle cell-specific gene, SM22 alpha. *J Biol Chem* **270**(22):13460-13469.
- Speer MY, Yang HY, Brabb T, Leaf E, Look A, Lin WL, Frutkin A, Dichek D and Giachelli CM (2009) Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. *Circ Res* **104**(6):733-741.
- Squires PE, Harris TE, Persaud SJ, Curtis SB, Buchan AM and Jones PM (2000) The extracellular calcium-sensing receptor on human beta-cells negatively modulates insulin secretion. *Diabetes* **49**(3):409-417.
- Steinberg D and Witztum JL (1990) Lipoproteins and atherogenesis. Current concepts. *Jama* **264**(23):3047-3052.

- Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebersold R, Schinke T, Karsenty G and Giachelli CM (2001) Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res* **89**(12):1147-1154.
- Steitz SA, Speer MY, McKee MD, Liaw L, Almeida M, Yang H and Giachelli CM (2002) Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol* **161**(6):2035-2046.
- Takanaga H, Mackenzie B and Hediger MA (2004) Sodium-dependent ascorbic acid transporter family SLC23. *Pflugers Arch* **447**(5):677-682.
- Takeda E, Taketani Y, Morita K and Miyamoto K (1999) Sodium-dependent phosphate co-transporters. *Int J Biochem Cell Biol* **31**(3-4):377-381.
- Tamagaki K, Yuan Q, Ohkawa H, Imazeki I, Moriguchi Y, Imai N, Sasaki S, Takeda K and Fukagawa M (2006) Severe hyperparathyroidism with bone abnormalities and metastatic calcification in rats with adenine-induced uraemia. *Nephrol Dial Transplant* **21**(3):651-659.
- Tfelt-Hansen J, Hansen JL, Smajilovic S, Terwilliger EF, Haunso S and Sheikh SP (2006) Calcium receptor is functionally expressed in rat neonatal ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**(3):H1165-1171.
- Thirunavukkarasu K, Halladay DL, Miles RR, Yang X, Galvin RJ, Chandrasekhar S, Martin TJ and Onyia JE (2000) The osteoblast-specific transcription factor Cbfa1 contributes to the expression of osteoprotegerin, a potent inhibitor of osteoclast differentiation and function. *J Biol Chem* **275**(33):25163-25172.
- Toussaint ND, Lau KK, Polkinghorne KR and Kerr PG Attenuation of aortic calcification with lanthanum carbonate versus calcium-based phosphate binders in haemodialysis: A pilot randomized controlled trial. *Nephrology (Carlton)* **16**(3):290-298.
- Trion A, Schutte-Bart C, Bax WH, Jukema JW and van der Laarse A (2008) Modulation of calcification of vascular smooth muscle cells in culture by calcium antagonists, statins, and their combination. *Mol Cell Biochem* **308**(1-2):25-33.
- Vera JC, Rivas CI, Fischbarg J and Golde DW (1993) Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid. *Nature* **364**(6432):79-82.
- Vezzoli G, Terranegra A, Rainone F, Arcidiacono T, Cozzolino M, Aloia A, Dogliotti E, Mingione A, Cusi D and Soldati L Calcium-sensing receptor and calcium kidney stones. *J Transl Med* **9**(1):201.

- Wada T, McKee MD, Steitz S and Giachelli CM (1999) Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by osteopontin. *Circ Res* **84**(2):166-178.
- Wang X, Yuan L, Huang J, Zhang TL and Wang K (2008) Lanthanum enhances in vitro osteoblast differentiation via pertussis toxin-sensitive G protein and ERK signaling pathway. *J Cell Biochem* **105**(5):1307-1315.
- Ward DT (2004) Calcium receptor-mediated intracellular signalling. *Cell Calcium* **35**(3):217-228.
- Weston AH, Absi M, Ward DT, Ohanian J, Dodd RH, Dauban P, Petrel C, Ruat M and Edwards G (2005) Evidence in favor of a calcium-sensing receptor in arterial endothelial cells: studies with calindol and Calhex 231. *Circ Res* **97**(4):391-398.
- Wiginton CD, Kelly B, Oto A, Jesse M, Aristimuno P, Ernst R and Chaljub G (2008) Gadolinium-based contrast exposure, nephrogenic systemic fibrosis, and gadolinium detection in tissue. *AJR Am J Roentgenol* **190**(4):1060-1068.
- Wissler RW (1991) Update on the pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Med* **91**(1B):3S-9S.
- Woolf E, Xiao C, Fainaru O, Lotem J, Rosen D, Negreanu V, Bernstein Y, Goldenberg D, Brenner O, Berke G, Levanon D and Groner Y (2003) Runx3 and Runx1 are required for CD8 T cell development during thymopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(13):7731-7736.
- Zhang Z, Sun S, Quinn SJ, Brown EM and Bai M (2001) The extracellular calcium-sensing receptor dimerizes through multiple types of intermolecular interactions. *J Biol Chem* **276**(7):5316-5322.
- Zhao WH, Gou BD, Zhang TL and Wang K Lanthanum chloride bidirectionally influences calcification in bovine vascular muscle smooth cells. *J Cell Biochem*.
- Zhou YB, Jin SJ, Cai Y, Teng X, Chen L, Tang CS and Qi YF (2009) Lanthanum Acetate Inhibits Vascular Calcification Induced by Vitamin D3 and Nicotine in Rats. *Exp Biol Med (Maywood)*.
- Ziegelstein RC, Xiong Y, He C and Hu Q (2006) Expression of a functional extracellular calcium-sensing receptor in human aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **342**(1):153-163.