



Universitat de Lleida

**Mecanismos de calcificación vascular
asociados a la uremia y al tratamiento con
Calcitriol.**

Sara Panizo García

Codirectores:

Elvira Fernández Giráldez

Jose Manuel Valdivielso Revilla

Lleida, Noviembre de 2009

“No hay gen para el espíritu humano”

GATTACA

Parece increíble, pero por fin ha llegado ese momento, que, no hace tanto tiempo, parecía que no llegaría nunca. Hoy por fin estoy escribiendo las últimas páginas de esta tesis, que, aunque diga mi tesis, no es solo mía, es de mucha gente, sin los cuales yo no podría estar aquí sentada pensando en no olvidarme de nadie a quien dar las gracias. Ahora mismo pienso en toda la gente que me ha echado una mano, pero tampoco se me quitan de la cabeza todas las veces que pensé en tirar la toalla, que quise dejar la investigación porque las cosas no salían y parecía que nunca iban a salir. Fueron tantas, tantísimas, las veces que pensé en irme de Lleida y volverme para mi casa porque creía yo no valía para estar tan lejos de mi gente. Y ahora he comprendido que mi gente sigue en su sitio, pero que además esta experiencia me ha permitido incluir en esas palabras, mi gente, a nuevas personas que ya son una parte importante de lo que soy. Y si hay un sentimiento que quisiera destacar de este momento es lo orgullosa que me siento por lo que he conseguido y por lo que estoy a punto de conseguir, me llena de satisfacción que tanto esfuerzo tenga al fin su recompensa. Y todo esto es gracias a vosotros.

Gracias a las entidades que han dado soporte económico para la realización de esta tesis doctoral, en especial a la fundación Dr Pifarré (actualmente IRB_Lleida) y al AGAUR por concederme las becas, que al fin y al cabo son el sustento para que los investigadores podamos trabajar en lo que nos gusta.

Gracias a Elvira y a Jose, por darme la oportunidad, hace ya 5 años, de incluirme en vuestro proyecto. Elvira, sabes como contagiar ese entusiasmo por la investigación. Cada uno de nuestros pequeños avances, al contartelo a ti, parecía un gran logro y nos trasmitias la energía para seguir dedicándonos a esto. Jose, ¿cuántas veces habremos discutido por no ponernos de acuerdo? No se puede negar que tuviste paciencia. Bueno, parece que al final no fue tan mal y aquí están los resultados.

Agradecer a todo el servicio de Nefrología del Hospital Arnau de Vilanova de Lleida.

Niñas, en esta tesis hay tanto de vuestro trabajo, de vuestros ánimos, de las risas a la hora de la comida...Creo que será muy difícil encontrar unas compañeras de grupo como vosotras. Cardús, eres un ejemplo a seguir, es un placer trabajar contigo, irradias positividad, y te mereces que todo te vaya bien. Siempre me has ayudado y creo que sin tus consejos no habría llegado hasta aquí. Se notó muchísimo cuando te fuiste. Eva, cuanta razón tenías al decirme eso de “la adversidad une”, cuantas cosas hemos pasado juntas (¿Cuántas ratas habremos matado juntas?). No sabes cuanto he aprendido de ti, no solo en el laboratorio donde me has enseñado infinidad de cosas, si no también de todas esas curiosidades con las que tu siempre nos sorprendes. Siempre me decias en broma, o eso espero, que en otras circunstancias de la vida tu y yo no hubiesemos sido amigas... pues en estas tu para mi eres una amiga muy especial. Admiro tu forma de trabajar, tu constancia y tus ganas. Mucha suerte en esta etapa que tú has empezado un poco antes que yo. Martínez, nuestras salvadora, ¿cuántas veces te habre llamado para decirte que metí la pata y siempre me has dado alguna solución? Siempre has estado ahí cuando las niñas te hemos necesitado o, simplemente, si queríamos descargar. Siempre dándonos buenos consejos. Petrusky, espero que nunca pierdas esa paciencia. Siempre tranquila, Eva y yo tomándote el pelo con los minutos Petriarcales. Nunca te has enfadado conmigo aunque yo gruñera. Has tenido mucha paciencia conmigo. Milika, no puedo escribir esto sin decirte de todo corazón que lo siento. Siento haberme portado al principio como lo hice, fui muy egoísta, porque aunque estuvieramos enfadadas yo sabía lo duro que era estar sola y lejos de tu casa y aun así tarde mucho en acercarme a ti. Me alegro de que al final las cosas cambiaran. Te deseo mucha suerte porque te la mereces. Montse, niña eres nervio puro. Me encantas, nunca parada, siempre buscando cosas que hacer. Ya sabes que me encanta trabajar contigo, y que no soy la única que lo piensa. Eres de esas personas especiales, no creo que haya muchas como tú. No cambies nunca nada. Noelia, peque, empiezas una etapa dura, con momentos difíciles (sobre todo si tienes que buscar algo entre mis cosas, siempre tan ordenadas, es broma) pero cuando las cosas salen es realmente reconfortante. Ten paciencia, al menos un poco más que yo. Has tenido la suerte de caer en un grupo estupendo y estoy segura que todas te ayudaran tanto como me ayudaron a mí. Niñas, me da muchísima rabía pensar que

es muy difícil que volvamos a trabajar todas juntas, porque somos “el equipo perfecto”... aunque ya sabeis que si yo diseñara el vestuario de trabajo iríamos con batas rosas (no Montse, no me mates).

Ahora que he vuelto a casa hay un momento del día que os hecho infinito de menos, a la hora de la comida, aunque siempre os metierais conmigo por comer poco. Echo en falta las conversaciones en las que arreglabamos el mundo, al menos el nuestro. Nuria, se que te quedas con las ganas de hacerme un regalo del amigo invisible. Para mí siempre serás el fichaje estrella. Echaré mucho de menos acompañarte al cigarro de las 5. Manu, he intentado jugar aquí a “por cuanto” pero no triunfa de la misma manera. Gracias por tus consejos y tu amistad, cuantas veces habré cruzado la puerta de tu labo para contarte mis penas. Maçia eres la sonrisa del labo, siempre de buen humor. Rosa, que no te vuelvan loca estas fieras. A Deivid, aunque nos hayas abandonado a la hora de la comida, se que si volvemos a comer juntos nunca dejaré que calientes la comida antes que yo. He aprendido muchas cosas contigo. Gracias por no tener prisa cuando me las enseñabas. Madris, ahora nadie me llama princesa, cuidate y preocupate de ti como lo haces de los demás. Ya sabeis que *os estimo molt y os trobo a faltar*.

A Carme, Maria, Teresa, Montse y Silvia , las chicas de la 4ª planta, por la ayuda, sobre todo con los asuntos de papeleo que siempre resultan pesados y vuestra compañía.

A Roser, Manolo y Emiliá, por hacer un poco más agradables los momentos del estabulario, que a veces se hacen difíciles.

Al Dr Pérez por enseñarnos tanto sobre como operar a los animales.

A Xavi y a Mario, porque me han enseñado muchísimas cosas y han tenido una gran paciencia conmigo. Ya sabeis que en este trabajo tambien hay un gran esfuerzo vuestro.

Al resto de compañeros del labo: Nuria, Jiseng, Esteban, Monica, Maia, Anabel, Andree, Aridam los demas jefes y los que ya están lejos. Os doy las gracias primero por aguantar mi carácter, segundo porque siempre que he tenido una duda habeis hecho todo por ayudarme y tercero por todos los buenos momentos no solo en el labo, sino también en la chocolatera y sobre todo en las cenas.

A toda la gente de ciencias medicas que son siempre un apoyo importante y gente de la que se puede aprender un monton.

A Rita, para mi eres más que una compañera de piso, eres una amiga. Gracias por todo, pero sobre todo por escucharme cuando en casa se me caia el mundo encima.

Silvi! ¿Con quien voy a ir yo de tiendas? ¿Quién me va a decir que compre? Y lo más importante ¿con quien voy a discutir la importancia de una camiseta blanca? No sabes como has transformado mis aburridas tardes de Lleida. Me lo he pasado genial contigo. Eres una gran amiga y espero que aunque vivamos en casi los extremos del pais nos podamos seguir viendo (aunque sea para ir de rebajas, es broma). Te voy a echar mucho de menos.

A Maria y Enrique, mis “jefes” de cada día. Este ya es el último tirón como decia papá cada vez que tenía que coger el avión. Se que vosotros lo habeis pasado tan mal como yo el haber estado lejos. Gracias por apoyarme siempre en todas las decisiones. No os voy a decir que os quiero con locura, porque ya lo sabeis, pero que me siento orgullosa de teneros como padres. Esto es gracias a vosotros.

Ana, ya me puedes dejar un sitio en la terraza para que tomemos el sol juntas. Que te quiero mucho aunque no seamos de esas hermanas que se lo dicen a diario.

A mis abuelos Amaro, Feli y Enrique. Ita Manuela, te imagino acompañandome el dia de mi tesis, superguapa como te ponías cuando ibas de boda,

y llorando sin parar como cuando ibas a ver bailar ballet a Ana. Siempre estas a mi lado y más en días especiales.

A mis primos y mis tios. Marina y Marco os quiero muchísimo.

A Irene G, Susana, Irene R y Patricia por buscar siempre un momento para vernos y contarnos las penas. Aunque siempre sea yo la que más habla.

Y a Samuel. Para ti si que no tengo palabras. Tú mejor que nadie sabes como han sido estos años. Has aguantado mis lloros y has venido a consolarme. Casi 800Km de distancia, y nos intentabamos ver casi todos los fines de semana. Pero se que ha sido difícil. Sin ti no lo habria conseguido (y no voy a llorar mientras lo escribo). Te quiero y me llena de felicidad que lo hayamos logrado. Espero seguir compartiendo la vida contigo.

De nuevo gracias de corazón a todos. Y gracias tambien a los que seguramente se me olvidan.

Resúmenes

La calcificación vascular es un fenómeno frecuente en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC). Además, estos pacientes presentan una disminución de los niveles de vitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) responsables del desarrollo de hiperparatiroidismo secundario. Por esta razón, es una práctica común el tratar a estos pacientes con vitamina D (Calcitriol) o análogos, como el Paricalcitol. Los pacientes con ERC presentan además niveles de fósforo sérico elevados asociados con un incremento de la mortalidad y morbilidad.

Para comprobar la eficacia y efectos de ambos tratamientos y de la uremia se utilizó como modelo ratas sometidas a nefrectomía subtotal y tratadas con Calcitriol o Paricalcitol. Para analizar la influencia del fósforo sobre la calcificación vascular y otras afectaciones fisiológicas se emplearon ratas sanas alimentadas con dietas con diferente contenido en fósforo, con y sin la adicción de un quelante, el carbonato de lantano. En los experimentos *in vitro* se trabajó con células de músculo liso vascular (CMLV) procedentes de explantes de aortas de ratas sometidas a distintas condiciones.

Tanto el tratamiento con Calcitriol como con Paricalcitol presentan una eficacia similar a la hora de disminuir los niveles séricos de PTH, pero el Calcitriol, y no el Paricalcitol incrementa la calcificación de las CMLV, *in vitro* e *in vivo*, independientemente de los niveles de calcio y fósforo. Este aumento de la calcificación es paralelo al incremento de la expresión RANKL/ osteoprotegerina (OPG). La calcificación vascular es un proceso activo, en el cual se expresan marcadores osteogénicos, como RANKL. RANKL es el ligando de RANK (receptor activador de NF- κ B) que se expresa fundamentalmente en osteoblastos. Este ligando provoca la calcificación de las CMLV de manera dosis dependiente. Este efecto de RANKL en la calcificación vascular es bloqueado por OPG. Es la unión de RANKL a su RANK y la activación de la vía alternativa de NF- κ B la que desencadena el aumento en la expresión de *bone morphogenetic protein 4* (BMP4), responsable de la calcificación de las CMLV.

La uremia provoca un aumento de la calcificación vascular que está relacionada con la desregulación de los enzimas del metabolismo de la vitamina D. Se produce una elevación a nivel de la arteria de los niveles de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, que estimulan la expresión de RANKL en las CMLV induciendo su calcificación. El tratamiento con

Calcitriol potencia este efecto. Esta desregulación tiene lugar a nivel arterial, pero no se observa a nivel renal.

Una dieta alta en fósforo en animales con función renal normal no provoca un aumento significativo de las calcificaciones vasculares a corto plazo. Sin embargo produce un aumento de los niveles séricos de PTH, que implican una elevación de sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona con su consecuente aumento en la presión arterial.

Por lo tanto, la calcificación vascular es un proceso complejo afectado por múltiples factores que establecen entre si multitud de conexiones. El bloqueo de RANKL y el control de los niveles séricos de fósforo, parecen ser de gran importancia a la hora de actuar sobre las afectaciones cardiovasculares que sufren los pacientes con ERC.

La calcificació vascular és un fenomen freqüent en pacients amb malalties renals cròniques (MRC). A més a més, aquests pacients presenten una disminució dels nivells de vitamina D (1,25 (OH)₂D₃) responsables del desenvolupament del hiperparatiroidisme secundari. Per aquesta raó, és una pràctica comú el tractament d'aquests pacients amb vitamina D (Calcitriol) o anàlegs, com el Paricalcitol. Els pacients amb MRC presenten a més a més nivells de fòsfor sèric elevats associats amb un increment de la mortalitat i morbiditat.

Per a comprovar l'eficàcia i els efectes de ambdós tractaments i de la urèmia es va utilitzar com a model rates sotmeses a nefrectomia subtotal i tractades amb Calcitriol o Paricalcitol. Per analitzar l'influència del fòsfor sobre la calcificació vascular i altres afectacions fisiològiques es van utilitzar rates sanes alimentades amb dietes amb diferents continguts en fòsfor, amb i sense l'adició d'un quelant, el carbonat de lantà. En els experiments *in vitro* es va treballar amb cèl·lules de múscul llis vascular (CMLV) procedents d'explants d'aortes de rates sotmeses a diferents condicions.

Tant el tractament amb Calcitriol com el de Paricalcitol presenten una eficàcia similar a l'hora de disminuir els nivells sèrics de PTH, però el de Calcitriol i no el de Paricalcitol incrementa la calcificació de les cèl·lules de múscul llis vascular (CMLV), *in vitro* e *in vivo*, independentment dels nivells de calci i fòsfor. Aquest augment de la calcificació és paral·lel a l'increment de la expressió RANKL/ osteoprotegerina (OPG). La calcificació vascular és un procés actiu, en el qual s'expressen marcadors osteogènics, com RANKL. RANKL és un lligand de RANK (receptor activador de NF-κB) que s'expressa fonamentalment en osteoblasts. Aquest lligand provoca la calcificació de las CMLV de forma dosis dependent. Aquest efecte de RANKL en la calcificació vascular és bloquejat per OPG. És la unió de RANKL al seu RANK i l'activació de la via alternativa de NF-κB la que desencadena l'augment en l'expressió de *bone morphogenetic protein 4* (BMP4), responsable de la calcificació de las CMLV.

La urèmia provoca un augment de la calcificació vascular que està relacionada amb la desregulació dels enzims del metabolisme de la vitamina D. Es produeix un augment a nivell de l'arteria dels nivells de 1,25 (OH)₂D₃, que estimula l'expressió de RANKL en les CMLV induint la seva calcificació. El tractament amb Calcitriol potencia aquest efecte. Aquesta desregulació té lloc a nivell arterial, però no s'observa a nivell renal.

Una dieta alta en fòsfor en animals amb funció renal normal no provoca un augment significatiu de les calcificacions vasculars a curt plaç. Tot i així produeix un increment dels nivells sèrics de PTH, que impliquen un augment de sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona amb el seu conseqüent augment en la pressió arterial.

Per tant, la calcificació vascular és un procés complex afectat per múltiples factors que estableixen entre sí multitud de connexions. El bloqueig de RANKL i el control dels nivells sèrics de fòsfor, semblen ser de gran importància a l'hora d'actuar sobre les afectacions cardiovasculars que pateixen els pacients amb MRC.

Vascular calcification is a common process in patients with chronic kidney disease (CKD). Furthermore, these patients have reduced levels of vitamin D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) responsible for the development of secondary hyperparathyroidism. For this reason, it is common practice to treat these patients with vitamin D (Calcitriol) or analogues, as Paricalcitol. CKD patients also have elevated serum phosphorus levels associated with increased mortality and morbidity.

To check the effects of the treatments and the uraemia, we used uremic rats (subjected to subtotal nephrectomy) and treated them with Paricalcitol or Calcitriol. To analyze the influence of phosphorus on vascular calcification and other physiological affectations we used healthy rats fed with diets with different phosphorus content, with and without the addition of a phosphate binder, lanthanum carbonate. In vitro experiments we used vascular smooth muscle cells (VSMC) obtained from explants of aortas of rats subjected to various conditions.

Calcitriol and Paricalcitol treatments present similar efficacy to decrease serum PTH, but Calcitriol, and not Paricalcitol, increase the calcification of VSMC in vitro and in vivo independently of the calcium and phosphorus levels. This increase in calcification is parallel to increased expression RANKL / osteoprotegerin (OPG). Vascular calcification is an active process, which are expressed osteogenic markers, such as RANKL. RANKL is the ligand of RANK (receptor activator of NF- κ B) which is expressed primarily in osteoblasts. This ligand causes calcification of VSMC in a dose-dependent manner. This effect of RANKL in vascular calcification is blocked by OPG. The bind of RANKL to RANK and its activation of the alternative pathway of NF- κ B triggers the increased expression of bone morphogenetic protein 4 (BMP4), that is the responsible for VSMC calcification.

Uraemia promotes an increased in vascular calcification that is associated with deregulation of the enzymes of metabolism of vitamin D. The elevation of arterial levels of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimulates the expression of RANKL inducing VSMC calcification. Calcitriol treatment enhances this effect. This deregulation happens in arteries, but is not observed in the kidneys.

Diets with high phosphorus content do not cause a significant increase in vascular calcifications in short-term in animals with normal renal function. But it

produces an increase in serum PTH, resulting in an elevation of renin-angiotensin-aldosterone system with the consequent increase in blood pressure.

Thus, vascular calcification is a complex process affected by multiple factors that establish many connections between them. The blockade of RANKL and the control of serum phosphorus levels could be very important to minimized cardiovascular damages in patients with CKD.

Índice

ABREVIATURAS..... XIX

INTRODUCCIÓN..... 1

1. ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA 3

1.1. **DEFINICIÓN**..... 3

1.2. **FILTRACIÓN GLOMERULAR** 3

1.3. **FACTORES DE RIESGO** 4

1.4. **ESTADIOS DE LA ERC** 5

1.5. **CONSECUENCIAS DE LA ERC** 5

1.5.1. **SÍNDROME URÉMICO** 5

1.5.2. **HIPERFOSFATEMIA** 6

1.5.2.1. **Control de la hiperfosfatemia en la ERC**..... 8

1.5.3. **HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO** 9

1.5.3.1. **Las glándulas paratiroides** 9

1.5.3.2. **Síntesis y secreción de PTH** 9

1.5.3.3. **Control de la síntesis y secreción de PTH**..... 12

1.5.3.3.1. **Calcio**..... 12

1.5.3.3.2. **Fósforo**..... 12

1.5.3.3.3. **FGF23**..... 13

1.5.3.3.4. **Vitamina D** 13

1.5.3.4 **El HPT2 asociado a ERC** 13

1.5.4. **ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR** 15

2. CALCIFICACIÓN VASCULAR 17

2.1. **ESTRUCTURA DE LA PARED ARTERIAL**..... 17

2.2. **LA CMLV** 18

2.3. **TIPOS DE CALCIFICACIÓN VASCULAR** 18

2.4. **MECANISMOS DE CALCIFICACIÓN VASCULAR** 20

2.5. **ESTADIOS DE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR**..... 25

2.6. **SISTEMA RANK RANKL OPG** 26

3. LA VITAMINA D Y SU RECEPTOR EL VDR 31

3.1. **BREVE HISTORIA DE LA VITAMINA D**..... 31

3.2. **BIOSÍNTESIS DE LA VITAMINA D** 32

3.3. **RECEPTOR DE LA VITAMINA D: VDR** 34

3.4. **ACCIONES DE LA VITAMINA D** 36

3.4.1. **ACCIÓN GENÓMICA DE LA VITAMINA D A TRAVÉS DEL VDR** 36

3.4.2 **ACCIÓN NO GENÓMICA DE LA VITAMINA D** 38

3.5. **FUNCIONES DE LA VITAMINA D** 39

3.6. **ANÁLOGOS DE LA VITAMINA D** 40

3.7. **PAPEL DE LA VITAMINA D EN LA CALCIFICACIÓN VASCULAR** 44

<u>OBJETIVOS</u>	47
<u>RESULTADOS</u>	51
1. Differential effects of Vitamin D analogs on vascular calcification.	55
2. RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4–dependent pathway.	67
3. Influence of uremia, and Calcitriol and Paricalcitol treatment in Vitamin D metabolism and in vascular calcification.	79
4. High phosphorus diet increases blood pressure by PTH-renin stimulation <i>in vivo</i>	109
<u>ANEXO:</u>	
<u>RESULTADOS COMPLEMENTARIOS</u>	141
<u>DISCUSIÓN</u>	153
<u>CONCLUSIONES</u>	169
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	173

Abreviaturas

1,25(OH)₂D₃	Calcitriol (1,25-dihidroxitamina D3)
19-nor-1,25(OH)2D₂	Paricalcitol (19-nor-1,25-dihidroxitamina D2)
ACE	Enzima convertidora de Angiotensina
AF2	Dominio de activación de la función-2
ALP	Fosfatasa alcalina
BMP	Proteína morfogenéticas ósea
Ca	Calcio
CaSR	Receptor sensible a calcio
CaXP	Producto calcio-fósforo
Cbaf-1	<i>Core binding facto alfa 1</i>
CMLV	Célula de músculo liso vascular
DBD	Dominio de unión al DNA
DBP	Proteína ligadora de la vitamina D
ECV	Enfermedad cardiovascular
ERC	Enfermedad renal crónica
EU	Excreción urinaria
FG	Filtración glomerular
FGF23	Factor de crecimiento fibroblástico 23
HPT2	Hiperparatiroidismo secundario
HTA	Hipertensión arterial
HVI	Hipertrofia ventricular izquierda
KO	<i>Knock out</i>
LBD	Dominio de unión al ligando
LDL	Lipoproteínas de baja densidad.
MGP	Proteína de matriz Gla
Na	Sodio
NF-κB	Factor nuclear κB
OPN	Osteopontina
OPG	Osteoprotegerina
P	Fósforo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PTH	Hormona paratiroides
RANK	Receptor activador del factor nuclear κB
RANKL	Ligando del receptor activador del factor nuclear κB
RNA_m	Acido ribonucleico mensajero
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.
RXR	Receptor del ácido cis- retinoico
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
VDR	Receptor de la vitamina D

VDRE

Elemento de respuesta de la vitamina D.

WT

Wild Type

Introducción

1. ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

1.1 DEFINICIÓN

La enfermedad renal crónica (ERC) es un problema de salud pública, que presenta una incidencia y una prevalencia crecientes desde hace dos décadas. Estos pacientes tienen un riesgo cardiovascular elevado y sufren una morbilidad por eventos cardiovasculares que, probablemente, tiene un impacto para la salud mayor que la evolución hacia la necesidad del tratamiento renal sustitutivo.

La National Kidney Foundation estadounidense propuso a través de las guías de práctica clínica K/DOQI (*Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*) una definición y una clasificación de la ERC con el objetivo de aunar criterios y facilitar el diagnóstico precoz de la enfermedad independientemente de la causa original.

La ERC se define como una disminución de la función renal, expresada por un filtrado glomerular (FG) o por un aclaramiento de creatinina estimados $<60\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$, o como la presencia de daño renal de forma persistente durante al menos 3 meses.

1.2. FILTRACIÓN GLOMERULAR

El FG es el parámetro más importante para determinar la función renal. Representa el volumen de plasma filtrado por unidad de tiempo desde los capilares glomerulares renales hacia el interior de la cápsula de Bowman, y es indicativo de la función de la masa renal. Su determinación se realiza mediante el empleo de compuestos sintetizados de manera endógena o administrados de manera exógena que no se unen a las proteínas del suero, son permeables a través de los capilares del glomérulo, no se reabsorben ni metabolizan, sintetizan o secretan por los túbulos renales. Se expresa matemáticamente como:

$$FG=UV/P$$

Donde U es la concentración en orina del compuesto, V es el grado del flujo urinario y P es la concentración plasmática del mismo compuesto.

Clínicamente se usa como marcador para determinar la tasa o índice de FG, el aclaramiento de creatinina. La creatinina es una sustancia endógena producida en células musculares a partir de la degradación de la creatina y la fosfocreatina (que los músculos utilizan para obtener energía). La creatinina tiene un peso molecular bajo, no se une a proteínas plasmáticas, se filtra libremente a nivel de glomérulos y no sufre procesos de secreción/absorción tubulares significativos, por lo que es un excelente marcador para estimar la tasa de FG.

1.3. FACTORES DE RIESGO DE ERC

Las guías de práctica clínica K/DOQI de la Nacional Kidney Foundation estadounidense establecen una serie de características de los individuos que los hacen más susceptibles al desarrollo y progresión de enfermedades crónicas de riñón. Estos factores de riesgo se clasifican en dos grupos: clínicos y sociodemográficos (Tabla1).

Factores clínicos	Factores sociodemográficos
Diabetes	Edad avanzada
Hipertensión arterial	Etnia: afroamericanos.
Enfermedades autoinmunes y sistémicas	Exposición a ciertas condiciones ambientales o químicas
Litiasis	Fumar
Enfermedades obstructivas de las vías urinarias bajas	Bajo peso al nacer
Infecciones urinarias.	Bajo nivel educativo y social
Exposición a medicinas o drogas nefrotóxicas.	Otras
Procedimientos asociados a la disminución de la función o de la masa renal	
Historia familiar de ERC	

Tabla 1. Factores de riesgo de las enfermedades renales crónicas: clasificación de acuerdo con las guías K/DOQI¹⁴⁸

1.4. ESTADIOS DE LA ERC

La progresión de la ERC se clasifica en cinco etapas según el grado de la función renal. Además las guías K/DOQI proponen las acciones a llevar a cabo ante cada situación (Tabla 2).

Estadio	Descripción	FG	Plan de actuación
--	Riesgo aumentado de ERC	>60*	Control y prevención de la ERC
1	Daño renal con FG normal	>90	Diagnostico y tratamiento adecuado a cada causa, prevención de la enfermedad cardiovascular.
2	Daño renal con ligera disminución del FG	60-89	Igual que el anterior y estimación de la progresión de la enfermedad
3	FG moderadamente disminuido	30-59	Igual que el anterior y evaluación y tratamiento de complicaciones de la ERC
4	FG gravemente disminuido	15-29	Igual que el anterior, y preparación, si procede de tratamiento renal sustitutivo.
5	Fallo renal	<15 ó diálisis	Tratamiento renal sustitutivo si procede y prevención cardiovascular.

*Con factores de riesgo de ERC

FG: Filtrado glomerular (ml/min/1,73m²)

Tabla 2. Clasificación de las etapas de la ERC y plan de actuación de acuerdo con las guías K/DOQI. Daño renal: alteraciones patológicas o marcadores de daño, fundamentalmente una proteinuria/albuminuria persistente; otros marcadores pueden ser las alteraciones en el sedimento urinario y alteraciones morfológicas en las pruebas de imagen¹⁴⁸.

1.5. CONSECUENCIAS DE LA ERC

1.5.1. SÍNDROME URÉMICO

El termino uremia significa literalmente “orina dentro de la sangre”. Piorry en el año 1840 lo utilizó para definir las consecuencias de la acumulación de los compuestos

que en situación normal son eliminados por el riñón. Actualmente se denomina así una compleja asociación de anomalías bioquímicas y fisiopatológicas debida a la retención del exceso de productos del desdoblamiento metabólico de las proteínas en la sangre por la incapacidad de las nefronas para secretar adecuadamente la urea y otros productos del metabolismo proteico. Es resultado de la disminución de la filtración glomerular. Este síndrome cursa con una sintomatología compleja y variable, anemia, alteración del metabolismo del calcio y del fósforo, acidosis, sobrecarga de fluidos, acumulación de productos del metabolismo proteico, malnutrición, acumulación de la carga de aluminio, y de las conocidas como toxinas urémicas y un desequilibrio hormonal (como son la menopausia precoz y el hiperparatiroidismo secundario).

1.5.2. HIPERFOSFATEMIA.

Los riñones juegan un papel fundamental en mantenimiento de la homeostasis del calcio y del fósforo, en colaboración con otros órganos como son las glándulas paratiroides, el intestino y el hueso. Los riñones no son solo los órganos diana para varias hormonas, como la PTH, sino que también son el sitio principal de producción de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. En la progresión de la enfermedad renal crónica (ERC) varios desordenes del metabolismo mineral tienen consecuencias fatales¹⁹³ como las calcificaciones extraesqueléticas, incluyendo en la vasculatura y dando como resultado complicaciones cardiovasculares y un aumento de la mortalidad.

Tanto el fósforo como el calcio ingeridos se absorben en el intestino y llegan al torrente sanguíneo, para excretarse por los riñones o almacenarse en el tejido óseo (reservorio óseo). En las personas con función renal normal, la homeostasis del calcio y del fósforo se mantiene mediante la interacción de la hormona paratiroidea (PTH) producida por la glándula paratiroides y la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ producida por los riñones, a pesar de las variaciones de la ingesta de fósforo y calcio (Figura1).

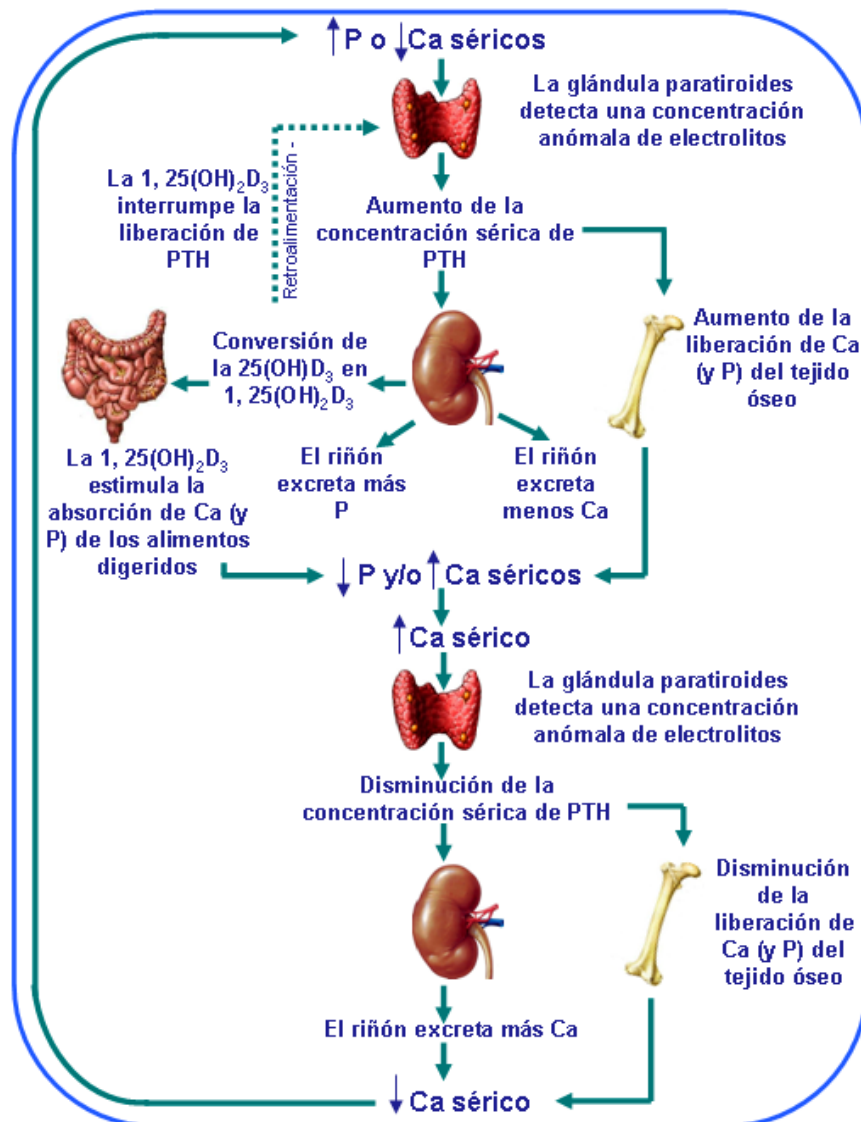


Figura1: Regulación de los niveles de calcio y fósforo en personas con función renal normal. El calcio y el fósforo ingeridos se absorben en el intestino y llegan al torrente sanguíneo para excretarse por los riñones o almacenarse en el tejido óseo (reservorio óseo). La homeostasis del calcio y del fósforo se mantiene mediante la interacción de la PTH producida por las glándulas paratiroides y la 1,25 (OH)₂D₃ producida por los riñones, a pesar de las variaciones en la ingesta de calcio y fósforo. El esqueleto no solo proporciona un soporte estructural, si no que también desempeña un papel esencial en el metabolismo mineral. Supone un depósito del 80% del fosfato corporal y del 99% de calcio. Un complejo mecanismo de retroalimentación origina una liberación inmediata de calcio a la sangre a través del recambio dinámico del tejido óseo cuando la concentración de calcio es baja. El fósforo sérico desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis cálcica: una concentración elevada de fosfato estimula la secreción de PTH, que incrementa la liberación de calcio a partir del tejido óseo y reduce su excreción renal

1.5.2.1 Control de la hiperfosfatemia en la ERC.

El fósforo es un elemento que se encuentra en casi todos los alimentos, se absorbe desde el aparato digestivo y pasa al torrente sanguíneo hasta llegar a los riñones donde será excretado. Cuando se produce insuficiencia renal los riñones ya no pueden eliminar bien el fósforo, ni siquiera con la diálisis. Mientras que los niveles normales de fósforo en adultos oscilan entre 2,5 mg/dl y 4,5 mg/dl, los niveles de fósforo en sangre de muchos pacientes en diálisis exceden con frecuencia de 6,5 mg/dl¹⁷. Estos niveles se han asociado a una significativa progresión de la enfermedad y a riesgo de muerte en pacientes sometidos al menos a un año de diálisis¹⁷. La retención de fósforo en la ERC estimula la secreción de PTH e induce la hiperplasia de la glándula paratiroides (hiperparatiroidismo secundario, HPT2) de manera directa e indirecta^{3,3,240}. Además de los altos niveles séricos del fósforo y del producto $CaxP$, se asocian con la progresión de la ERC²⁷⁰, por ello es tan importante el control de los niveles séricos de fósforo en los pacientes con ERC. La restricción de P en la dieta y la diálisis convencional generalmente no son efectivas en el control de la hiperfosfatemia, lo que hace que muchos pacientes en diálisis precisen el uso de quelantes de fósforo, que actúan como “esponjas” absorbiendo o uniéndose con este mientras todavía está en el estómago. El fósforo unido al medicamento es eliminado por las deposiciones. Los quelantes basados en aluminio estaban ampliamente extendidos, pero su empleo se ha abandonado al comprobarse que su uso prolongado tiene un alto riesgo de intoxicación por aluminio que provocaba anemia, miopatías, demencia y alteraciones del remodelado óseo³²⁵. Fueron sustituidos por el uso de los quelantes con sales de calcio, pero además de su mala tolerancia digestiva, se les ha relacionado con la calcificación observada en pacientes en diálisis¹⁰². Actualmente los quelantes que no aportan ni calcio ni aluminio se están introduciendo en la práctica clínica. Entre ellos destaca el uso del clorhidrato de Sevelamer y más recientemente del carbonato de lantano. El clorhidrato de Sevelamer es un polímero que posee múltiples aminas separadas por un carbono, lo que forma el esqueleto del polímero. Una porción de la amina esta presente como sal de clorhidrato, estando el polímero final compuesto de un 40% de amina clorhidrato y 60% como amina libre. En el intestino, especialmente en el duodeno, estas aminas se vuelven parcialmente protonadas y se unen preferentemente al fosfato a través de intercambio iónico y por puentes de hidrógeno a los grupos amino que están en la cadena del polímero de Sevelamer. La unión del fosfato al Sevelamer no resulta en la formación de subproductos residuales. El carbonato de lantano (Fosrenol®) debe su eficacia como quelante de fósforo a sus

características de solubilidad y a la elevada afinidad del La^{3+} por los iones fosfato (PO_4^{3-}). En conjunto forman fosfato de lantano, que es muy insoluble, lo que disminuye de forma significativa la absorción de fosfato⁸⁰. Además esta alta afinidad se mantiene en todo el rango de pH que se encuentra en el aparato digestivo⁹. Por tanto, a diferencia de otros quelantes, el lantano quela el fosfato con eficacia en el medio ácido del estómago y de la parte superior del intestino delgado antes de que comience su absorción. La máxima capacidad de quelación de fosfato por parte del clorhidrato de Sevelamer se produce a pH 7²⁵². La afinidad de quelación *in vitro* del carbonato de lantano por el fosfato es 200 veces superior a pH gástrico (pH 3) y 4 veces superior a pH intestinal (pH 5-7) comparada con el clorhidrato de Sevelamer⁹. También se ha demostrado que el complejo lantano-fosfato tiene mayor estabilidad que el complejo Sevelamer-fosfato en un modelo *in vitro* de duodeno (es decir pH 6, 30mM de ácidos biliares)⁹. Además es eficaz manteniendo bajas las concentraciones de fósforo sérico y del producto CaxP en pacientes¹³².

1.5.3 HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO

1.5.3.1 Las glándulas paratiroides

La parathormona (PTH) es una hormona que se sintetiza en las células de las glándulas paratiroides. Estas son glándulas endocrinas situadas en el cuello. En el humano existen, generalmente, cuatro glándulas paratiroides que se encuentran inmediatamente detrás de cada uno de los polos superior e inferior de la glándula tiroidea. Cada glándula paratiroides mide unos 3mm de largo, 3mm de ancho y 2mm de grosor; su aspecto macroscópico es el de un tejido graso de color castaño. En la rata solo hay dos glándulas paratiroides. En el humano adulto la paratiroides contiene células principales y células oxífilas, pero en muchos animales y en los niños no existen estas células oxífilas. Las células principales producen la hormona paratiroidea. La función de las células oxífilas no está clara, aunque se cree que son células principales modificadas o vacías que no secretan más hormona¹⁰⁸.

1.5.3.2. Síntesis y secreción de PTH.

La PTH de los mamíferos es una cadena polipeptídica de 84 aminoácidos cuya secuencia se estableció por primera vez en 1970 en la hormona bovina altamente

purificada²²⁵. La PTH intacta, que posteriormente es secretada, se sintetiza como un precursor de corta vida media, la preproPTH (figura 2). Este precursor contiene una secuencia N-terminal de 25 residuos, rica en aminoácidos hidrofóbicos, que es cortada durante la traducción liberándose la proPTH a la luz del retículo endoplasmático rugoso. La proPTH es posteriormente procesada en el aparato de Golgi (donde se eliminan 6 aminoácidos más) dando lugar a la forma madura de la hormona (con los aminoácidos 1-84): la PTH o PTH intacta.

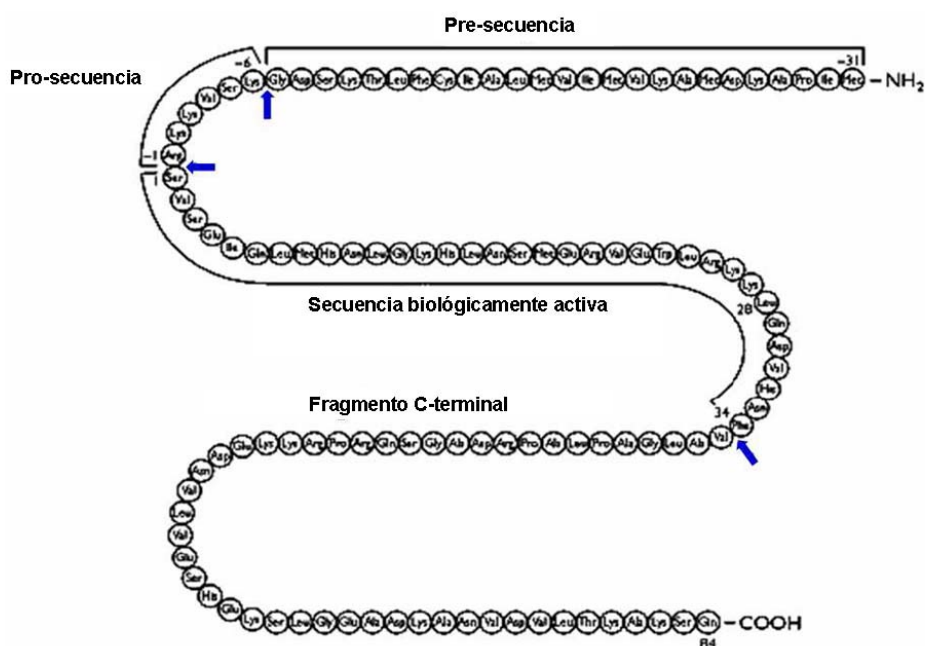


Figura2: Estructura de la preproPTH: Una vez sintetizada la hormona sufre una serie de cortes proteolíticos (25 y 6 residuos respectivamente) que la transforman en la forma biológicamente activa de la hormona. Adaptada de Nussey et al²³⁰.

Estas dos secuencias que se eliminan son necesarias para el transporte específico al retículo endoplasmático y para la correcta obtención de la forma madura de la hormona. La secuencia contiene además un extremo C-terminal que tiene un posible papel en asegurar el procesamiento y el transporte de la hormona al aparato secretor de la paratiroides²¹⁵. La PTH se almacena dentro de unos gránulos secretores del citoplasma hasta su liberación. Una vez en la circulación sufre más cortes proteolíticos. Por lo tanto existen, diversos péptidos paratiroides circulantes⁶¹, con diferente función e incluso que actúan a través de diferente receptor: Son:

- La PTH intacta (PTH 1-84), constituida por un péptido de 84 aminoácidos, que se obtiene por proteólisis consecutiva de 2 péptidos más largos de 115 aminoácidos y 90 aminoácidos respectivamente.
- Los fragmentos carboxi-terminales, son todos aquellos que conservan la porción C-terminal y les falta una serie de aminoácidos en la porción N-terminal. Se diferencian dos grupos:
 1. Los que han perdido una serie de aminoácidos en cualquier lugar del segmento comprendido entre los aminoácidos 1 a 34. Se han denominado "PTH no 1-84"
 2. Los que carecen de un segmento que va más allá del aminoácido 34 y empiezan su N estructura en la posición 34, 37, 41 y 43. Estos fragmentos son los denominados clásicamente "C-terminales".
- Otro fragmento recientemente descubierto se denomina "amino PTH" y tiene una secuencia de aminoácidos similar a la molécula intacta (1-84) pero presenta una fosforilización en el aminoácidos 17⁵⁸. Se desconoce su función. Recientemente se ha observado que existe en mayor proporción en pacientes con carcinoma paratiroideo y en pacientes con hiperparatiroidismo primario y secundario severo⁵⁷.

Estos péptidos paratiroideos tienen diferentes acciones y mecanismos de regulación y metabolismo: La PTH intacta o fragmento 1-84 es la responsable de las funciones clásicas sobre hueso y riñón y sobre la enzima 1α hidroxilasa induciendo la síntesis de $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$. El objetivo de estas acciones es elevar el calcio plasmático. Las acciones clásicas de la PTH 1-84 están mediadas por un receptor (PTHr1) común para la PTH y la proteína relacionada con la PTH (PTH rP), presente en muchos tejidos. Es necesaria para su activación la secuencia amino-terminal, constituida por los 34 primeros aminoácidos.

En estudios experimentales se ha observado que los fragmentos denominados «no-1-84», entre los que el fragmento 7-84 es el más abundante, tienen efectos biológicos antagónicos a los de la molécula intacta, poseen efectos hipocalcémiantes, hiperfosfatémicos e hipofosfatúricos. Todos los fragmentos de tipo carboxiterminal de la molécula de PTH se unen a un nuevo tipo de receptor de la hormona en las células óseas (CPTHr), distinto del receptor PTHr1 que necesita la zona aminoterminal 1-34

de la PTH intacta para su activación. Este receptor aún no está bien definido ni clonado.

La glándula paratiroidea libera PTH 1-84 y fragmentos en cantidades proporcionales al calcio sérico: en situación de hipocalcemia la proporción de PTH 1-84 secretada es mayor y por el contrario la hipocalcemia incrementa la cantidad de fragmentos “no 1-84” secretados.

1.5.3.3. Control de la síntesis y secreción de PTH.

Los niveles de PTH están regulados por el Ca^{2+} (a través del receptor sensible al calcio, el CaSR), el fósforo (que activa su secreción), la vitamina D (a través de su receptor el VDR-*Vitamin D Receptor*-) y el FGF 23 –*fibroblast growth factor*- que junto con su cofactor klotho inhibe la síntesis y secreción de la PTH.

1.5.3.3.1. Calcio.

La hipocalcemia incrementa la secreción de PTH a corto plazo, sus niveles de mRNA en horas y días, y el número de células paratiroides si la estimulación es prolongada^{205;220}. La célula paratiroides reconoce cambios en los niveles de Ca^{2+} a través de un receptor de calcio de membrana, el CaSR. El CaSR es un receptor asociado a proteína G que es sensible a diferentes iones como el ion Ca^{2+} ³². Cuando los niveles de Ca^{2+} en el suero son elevados se activa el CaSR y se desencadena su cascada de señalización, dando lugar a la inhibición de la secreción de PTH²⁷⁹.

1.5.3.3.2. Fósforo.

El aumento del fósforo plasmático actúa potenciando la secreción de PTH, su expresión génica y la proliferación celular de la glándula paratiroides^{3;157;284}. Además se ha clonado un cotransportador de membrana de fosfato en la célula paratiroidea³⁰⁰ que ha sido considerado como un posible sensor de fosfato de esta célula²⁰⁴. Además de la acción directa que puede tener el fósforo sobre la glándula paratiroides también inhibe la síntesis de la forma activa de la vitamina D, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, a través del FGF23^{13;166} estimulando así la síntesis y secreción de PTH.

1.5.3.3.3. FGF23.

El FGF23 es una proteína de aproximadamente 26KDa miembro de la familia de los FGF (*fibroblast growth factors*). El FGF23 actúa sobre sus células diana conjuntamente con su cofactor klotho, una proteína de membrana de la familia de las glicosidasas que se expresa en las células del riñón, en el plexo coroideo del cerebro y en las células principales de la glándula paratiroides³⁰⁵. El FGF23 es una de las moléculas más importantes en la regulación de la reabsorción del fósforo a nivel renal, ya que promueve la fosfaturia²⁷⁵. También se ha observado su efecto de inhibición de la síntesis de la vitamina D^{13;166;249}. Además de esta acción del FGF23 sobre el fósforo y la vitamina D, también se ha observado un efecto directo en la regulación de la síntesis y secreción de PTH¹⁷⁹ con un posible papel inhibitorio.

1.5.3.3.4 Vitamina D.

La vitamina D, concretamente su forma biológicamente activa la 1,25(OH)₂D₃, actúa a través de su receptor el VDR, inhibiendo la síntesis de PTH. El VDR actúa como un factor de transcripción activado por ligando, así cuando aumentan los niveles séricos de vitamina D, esta se une a su receptor que se transloca al núcleo e inhibe la síntesis de PTH⁷⁴.

1.5.3.4. El hiperparatiroidismo secundario asociado a la ERC.

Resumiendo podemos decir que la PTH regula los niveles de calcio y fósforo en la sangre y juega un papel importante en el remodelado óseo. La acción de la PTH en el hueso es compleja pero en general estimula la liberación de calcio y fósforo de los huesos a través del proceso de resorción. Además actúa sobre los túbulos renales incrementando la reabsorción tubular del calcio e inhibiendo la del fósforo. La PTH también actúa favoreciendo la hidroxilación de la 25(OH) D₃ para conseguir la forma activa de la vitamina D, la 1,25(OH)₂D₃, que actúa incrementando la absorción de calcio y fósforo en el intestino y en los túbulos renales. Por tanto, el incremento de calcio y de 1,25(OH)₂D₃ en el suero, causa retroalimentación negativa en el proceso de liberación de PTH en las glándulas paratiroides, mientras que tanto la PTH como la 1,25(OH)₂D₃ causan un incremento de calcio en el suero. En la ERC este balance se encuentra alterado de manera que los niveles de síntesis de 1,25(OH)₂D₃ y Ca²⁺ en el suero disminuyen. Esto favorece un incremento de la secreción de PTH que también

influye en la hiperplasia de la glándula paratiroides conduciendo al hiperparatiroidismo secundario. Está ampliamente demostrado que los pacientes con ERC sufren hiperparatiroidismo secundario (HPT2), que se caracteriza por un desorden funcional de las glándulas paratiroides, con la consiguiente hipersecreción de PTH e hiperplasia de las glándulas⁵³. Los pacientes con ERC sufren esta enfermedad por diferentes causas: la eliminación de fosfato se encuentra deteriorada, no se produce vitamina D a causa de la desaparición del parénquima renal, la absorción intestinal de calcio es baja y los niveles sanguíneos de calcio disminuyen⁵³. Por ello el HPT2 en la ERC se trata con suplementos de calcio, restricción de fosfatos y vitamina D. Se ha demostrado la eficacia de la administración intravenosa y oral de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ para suprimir los niveles de PTH en pacientes con HPT2^{8;90;286}. Sin embargo el potente efecto de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre la absorción de calcio y fósforo a nivel de intestino y sobre la movilización de los mismos en el hueso provoca que el tratamiento con vitamina D activa tenga como complicaciones la hipercalcemia y la hiperfosfatemia a dosis terapéuticas^{63;244}. Por ello se están estudiando análogos de la vitamina D para el tratamiento del HPT2 los cuales disminuyen las concentraciones séricas de PTH al tiempo que elevan mínimamente la calcemia y la fosfatemia. Uno de los análogos más estudiados y actualmente más usado es el Paricalcitol (19-nor-1,25-dihidroxitamin D_2). Estudios de Slatopolsky *et al*²⁸⁵ demuestran que el 19-nor-1,25(OH) $_2\text{D}_2$ suprime los niveles de PTH en ratas urémicas a una concentración que no afecta a los niveles de calcio en el plasma. No se conocen los motivos de este efecto diferencial entre la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y el 19-nor-1,25(OH) $_2\text{D}_2$, pero existen diversos estudios donde se detectan diferentes efectos de los análogos comparados con la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Finch *et al*⁸⁴ observaron que el 19-nor-1,25(OH) $_2\text{D}_2$ es unas 10 veces menos activo en el incremento de calcio y fósforo en suero cuando estos dos elementos han sido eliminados de la dieta de ratas paratiroidectomizadas, sugiriendo que esto podría ser debido, en parte, a la disminución de la movilización mineral en el hueso. Takahashi *et al*²⁹⁸ observaron que la administración durante 8 semanas de 19-nor-1,25(OH) $_2\text{D}_2$ a ratas urémicas no incrementa de igual manera los niveles de VDR en la pared intestinal comparado con animales tratados con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Tanto el efecto de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ como el de 19-nor-1,25(OH) $_2\text{D}_2$ en la pared vascular (donde se ha visto la presencia de VDR) no está del todo clara.

1.5.4. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES.

La enfermedad cardiovascular (ECV) es muy común en adultos con ERC y sometidos regularmente a diálisis. Es menos conocida su prevalencia en niños y jóvenes con ERC. El porcentaje de muertes por causas cardíacas en estos pacientes es de 40-50%, y es 20 veces más común la muerte por ECV en pacientes urémicos que en la población general³¹⁰. La ECV en la ERC tiene un componente de cardiomiopatía y otro de arteriopatía urémica.

La miopatía implica hipertrofia ventricular izquierda (HVI). La HVI es un factor de riesgo cardiovascular bien reconocido en la población general⁵⁶. En el curso de la enfermedad renal la HVI se desarrolla precozmente y su prevalencia aumenta de forma inversa al nivel de función renal^{173;200;324}. Los mecanismos implicados en el desarrollo de esta complicación son la sobrecarga de presión y la sobrecarga de volumen. La sobrecarga de presión es inducida por la hipertensión arterial (HTA), la rigidez de las grandes arterias (arteriosclerosis) o la estenosis aórtica. La sobrecarga de volumen es inducida por la hipervolemia crónica, la anemia o la circulación hiperdinámica generada por el acceso vascular (fístula arteriovenosa), que se asocian con un aumento del gasto cardíaco. Para un mismo nivel de presión arterial, los pacientes renales presentan un índice de masa del ventrículo izquierdo (VI) superior al de pacientes no renales, indicando que otros factores contribuyen a su desarrollo²⁴. Por ejemplo, se ha implicado en su desarrollo al hiperparatiroidismo secundario (la hormona paratiroidea es un factor facilitador del crecimiento de los miocardiocitos), la activación del sistema renina-angiotensina y de la endotelina-1 locales, la hiperactividad simpática, la apnea del sueño, la inflamación, la hiperhomocisteinemia, o las calcificaciones vasculares, entre otros^{181;314;81;226;337}. La HVI comienza siendo un fenómeno adaptativo a la sobrecarga de presión y/o volumen, pero a largo plazo se convierte en un fenómeno de mala adaptación. En estudios prospectivos de pacientes en diálisis la HVI se asocia con un mayor riesgo de disfunción diastólica, fallo cardíaco recurrente y muerte^{237;278}.

La arteriopatía urémica abarca la ateromatosis y aterosclerosis. La ateromatosis está asociada con la fibrosis y calcificación de la capa íntima y por tanto con la disminución del diámetro de la luz del vaso por formación de placas de ateroma calcificadas. Sin embargo, en la arteriosclerosis se observa la calcificación y el aumento de grosor de la capa media de la pared de los vasos con el consiguiente incremento de la rigidez arterial.

2. CALCIFICACIÓN VASCULAR.

Clásicamente se consideraba que la calcificación vascular era un proceso pasivo y degenerativo que frecuentemente ocurría con la edad avanzada, aterosclerosis, varios desordenes metabólicos (como diabetes mellitus y estados finales de enfermedad renal) y en raras enfermedades genéticas^{110;236}. Sin embargo, desde hace unos años, la calcificación vascular es considerada como un proceso activo y regulado de manera semejante a la mineralización y metabolismo del hueso, en el se encuentran implicadas diversas proteínas óseas^{19;96;273}. Mecanismos pro y anticalcificantes juegan un papel activo en la deposición de calcio en las células vasculares.

2.1. ESTRUCTURA DE LA PARED ARTERIAL.

La pared de una arteria normal consta de las tres capas concéntricas con diferentes estructuras y propiedades (figura 3). La capa o túnica íntima está en contacto con la sangre y la forman una monocapa de células endoteliales y el tejido conjuntivo subyacente, constituido por colágeno, proteoglicanos, elastina y otras glicoproteínas. La media, es la capa más gruesa y está constituida principalmente por células de músculo liso vascular (CMLV) que le confieren sus propiedades de elasticidad y contractilidad. La capa más externa es la adventicia y está formada por tejido conjuntivo con colágeno, fibroblastos y CMLV.

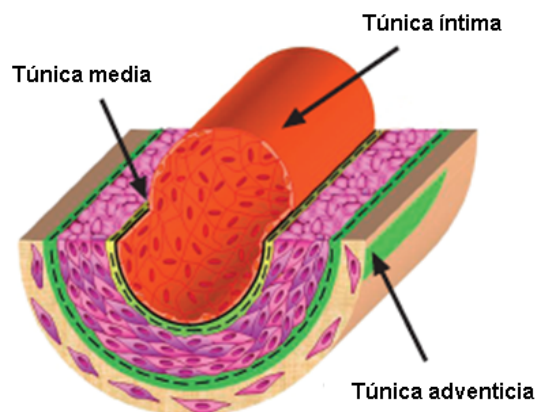


Figura 3. Estructura de la pared arterial. Es compuesta básicamente de tres capas concéntricas: íntima, media y adventicia.

2.2. LA CÉLULA DE MÚSCULO LISO VASCULAR.

Las células de músculo liso vascular (CMLV) provienen del linaje mesodérmico. Su función principal en los animales maduros es la contracción. Para llevar a cabo esta especializada función las CMLV expresan proteínas contráctiles, conductos iónicos, moléculas transportadoras de señales, etc. Además de su función contráctil, también intervienen en los procesos de reparación y enfermedad vascular. Para adaptarse a ello la CMLV puede presentar un amplio espectro de fenotipos distintos, en respuesta a diferentes estímulos fisiológicos y patológicos.

Entre las proteínas contráctiles que expresa destaca la α -actina, que representa el 40% de la proteína celular total y que es necesaria para las altas capacidades generadoras de fuerza de las CMLV. Es un marcador útil de CMLV diferenciada, que se pierde cuando sufre modulación fenotípica. Cuando cambia de fenotipo la CMLV expresa proteínas marcadoras diferentes de las originales y características de su nuevo estado de diferenciación⁸⁹.

2.3. TIPOS DE CALCIFICACIÓN VASCULAR.

En la calcificación vascular la deposición de fosfato cálcico, en forma de cristales de bioapatita (similar al hueso), puede ocurrir en los vasos sanguíneos y las válvulas cardíacas^{83;95}. Existe otro tipo de calcificación vascular, conocido como arteriopatía urémica calcificante, o calcifilaxis, un síndrome raro caracterizado por la aparición y rápida progresión de necrosis isquémica y úlceras cutáneas por las calcificaciones de las arteriolas dermoepidérmicas^{2;195}. En los vasos sanguíneos los depósitos de calcio se encuentran en las diferentes capas y están asociadas a distintas patologías, así, la calcificación de la íntima ocurre en los vasos sanguíneos los depósitos de calcio se localizan en las lesiones ateroscleróticas^{38;131}, mientras que la calcificación de la media (que se conoce como esclerosis de Mönckeberg) está ligada a la rigidez vascular por mineralización de las fibras elásticas y la aterosclerosis observada con la edad, diabetes y ERC⁷⁶. La calcificación de la íntima puede ocurrir independientemente de la calcificación de la media y viceversa. En pacientes con ERC se observa una mezcla de ambas calcificaciones^{133;271}.

En resumen, podría decirse que existen 4 tipos de calcificación vascular según su localización y cuyas características principales son:

a) Calcificación de la íntima: La calcificación de la íntima está asociada a zonas de placas ateroscleróticas, donde tiene lugar una combinación de necrosis celular, inflamación y deposición de colesterol, fosfolípidos y lipoproteínas^{19;65}. La oxidación del LDL sirve como señal para el reclutamiento de células T y macrófagos a la zona de la lesión. La calcificación comienza en primer lugar en el corazón de lípidos junto con las células inflamatorias infiltradas y la necrosis celular. El siguiente paso se asemeja a la osificación endocondral (con intermediario de cartílago)^{131;208}. La condrogénesis precede a la inducción osteoblástica y la formación de hueso. Ya en estadios tempranos las células musculares de la íntima empiezan a expresar proteínas características del hueso²⁹².

b) Calcificación de la media: Es responsable del aumento de rigidez y con ello el descenso de la capacidad amortiguadora de los vasos, lo que provoca un aumento de la presión de pulso⁶⁰ (desciende la presión diastólica y aumenta la sistólica) y favoreciendo la hipertrofia del ventrículo izquierdo comprometiendo así la perfusión coronaria^{105;190}. Todos ellos son factores altamente asociados con alta mortalidad en pacientes con enfermedad cardiovascular.

A diferencia de la calcificación de la íntima, la calcificación de la media arterial ocurre por un proceso que conlleva la formación de vesículas de matriz (como sucede con la formación de hueso intramembranoso, donde no se requiere de un intermediario de cartílago²⁶²).

c) Calcificación de las válvulas cardiacas: La calcificación de las válvulas cardiacas es un proceso más amorfo, desorganizado y que se asemeja tanto a la calcificación de la media como a la de la íntima. Ocurre en respuesta a un estrés mecánico e inflamación, que provoca un daño y una disfunción del endotelio, que acompañada de la acumulación de lípidos, desencadenan la infiltración de macrófagos y células T en respuesta al daño del endotelio²⁰⁸. En las válvulas cardiacas se empiezan a expresar marcadores de diferenciación osteoblástica (*Bone Morphogenic Proteins* –BMPs-, *Core binding factor alpha 1* –Cbfa1- y osteocalcina²⁴⁷). Las células musculares de la válvula cardiaca, se diferencian en osteoblastos, que promueven la acumulación de calcio, por lo que el proceso en este caso se asemeja al de formación endocondral^{208;247}.

d) Calcifilaxis: en contraste con los otros tipos de calcificación vascular la calcifilaxis vascular o arteriopatía urémica calcificante es un proceso más sistémico caracterizado por la calcificación difusa de la media de las arterias pequeñas y arteriolas, con proliferación de la íntima provocando una necrosis del tejido. Esto provoca la extensión de la calcificación en el tejido blando subcutáneo, que ocurre cuando la solubilidad del fosfato cálcico fisiológico excede un determinado umbral ($>60 \text{ mg}^2/\text{dL}^2$) y no es dependiente de un proceso osteogénico activo. Es una rara complicación de la ERC (supone aproximadamente el 1%) y el HPT2, que también se ha asociado con el uso de drogas inmunosupresoras, diabetes, obesidad o estados de hipercoagulación^{49;198}

2.4. MECANISMOS DE CALCIFICACIÓN VASCULAR.

La calcificación vascular es un proceso activo y regulado en el que intervienen diferentes mecanismos no excluyentes entre sí²⁸⁹:

a) Calcio y Fósforo. Algunos autores se refieren a ellos como los “mecanismos pasivos de la calcificación”. Los niveles elevados de Ca, P y CaxP (prevalentes en pacientes con ERC y significativamente ligados a muerte por ECV en estos pacientes¹⁷) promueven la formación de núcleos de cristales de bioapatita y su crecimiento¹⁸. La bioapatita es el principal componente mineral de huesos, espinas y conchas. En estudios *in vitro* se ha observado que al exponer las CMLV a altas concentraciones de calcio o fósforo se produce la deposición de bioapatita en la matriz extracelular. Cuando se incuba con ambos elementos a la vez se puede observar un efecto sinérgico de la calcificación^{251;329}. Pero no se trata simplemente de un proceso pasivo de precipitación de los iones bivalentes, sino que implica un cambio fenotípico de las CMLV y la up-regulación de genes comúnmente asociados a la diferenciación ósea^{206;207;293}. Parece que los efectos de la hiperfosfatemia e hipercalcemia están mediados por el contrantransportador de fosfato dependiente de sodio, el NPC, cuyo subtipo Pit-1 se ha encontrado en las CMLV. El alto fósforo estimula la actividad del cotransportador y la carga, mientras el elevado calcio induce la expresión de mRNA de Pit-1. Este transportador permite la acumulación de fósforo dentro de la célula, que sirve como señal para la expresión de genes osteogénicos. Esto provoca la secreción de moléculas minerales (vesículas de matriz, proteínas ligadoras de calcio, fosfatasa

alcalina y matriz extracelular rica en colágeno) (figura 4). La combinación de estos factores conlleva la transformación de la célula para ser susceptible de calcificación.

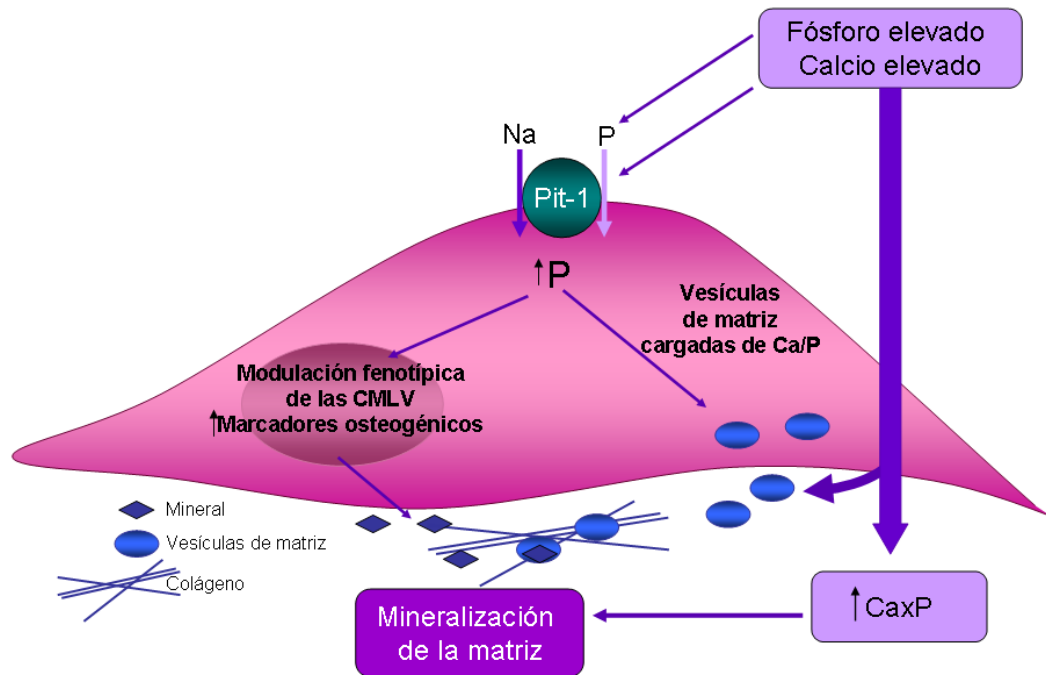


Figura 4 Modelo de los efectos del calcio y el fósforo sobre la mineralización de las CMLV.

Adaptado de Giachelli C.M.⁹⁵

b) Muerte celular y apoptosis. La calcificación vascular está relacionada con la aparición de pequeñas vesículas de matriz con contenido citoplásmico y membrana celular intacta (al igual que sucede en el desarrollo óseo); estas vesículas se forman a partir de células donde se origina mineralización o son el resultado del proceso de apoptosis celular (cuerpos apoptóticos). La pared de los vasos del paciente urémico está lesionada por procesos de inflamación y estrés oxidativo, por lo tanto es razonable pensar que exista apoptosis celular. Proudfoot y cols²⁴³ muestran que la apoptosis regula la calcificación vascular *in vitro*. De acuerdo a estos autores, las vesículas de matriz son capaces de concentrar calcio en su interior y son el origen de los cristales de bioapatita.

c) Inhibidores de la calcificación. Las células de los vasos expresan en condiciones normales moléculas inhibitorias de la mineralización. La pérdida de su expresión, como sucede en la ERC, provoca lo que se denomina “pérdida de la inhibición natural”, dando lugar a una calcificación espontánea y a un aumento de la

mortalidad^{184;256}. Mediante análisis mutacionales en ratones se ha elaborado una lista con estas moléculas inhibitoras de la calcificación, entre las que se incluyen a:

- Matrix Gla Protein (MGP). La MGP fue el primer inhibidor de la calcificación identificado. Es una proteína dependiente de vitamina K que se expresa constitutivamente en CMLV, y también en endoteliales, de vasos normales pero está downregulada en arterias calcificadas³⁰⁸. Se ha observado que su expresión disminuye en modelos *in vitro* de calcificación²¹². Los niveles séricos de MGP son menores en pacientes con calcificaciones que en los que no tienen¹⁴³. Además, los ratones knock out para MGP desarrollan severas calcificaciones de la media y mueren por ruptura aórtica.¹⁸⁴

- Fetuina A. Es una glicoproteína sérica que inhibe la calcificación vascular ectópica. Es un potente inhibidor de la formación de hidroxapatita, reduciendo la formación de cristales en soluciones que contienen calcio y fósforo *in vitro*. Inhibe la formación de estos cristales pero no afecta a los ya formados¹¹³. Los ratones deficientes en esta proteína desarrollan extensas calcificaciones de los tejidos blandos como miocardio, riñón, lengua y piel^{153;154}.

- Osteopontina (OPN). La OPN es una fosfoproteína que se encuentra normalmente en los tejidos mineralizados como hueso y dientes, y está implicada en la regulación de la mineralización al actuar como inhibidor del crecimiento de los cristales de apatita⁹⁸. Aunque no se encuentra en arterias normales, algunos autores^{85;96;115;137;232} han detectado su expresión en placas ateroscleróticas y válvulas aórticas calcificadas. Giachelli y colaboradores²⁹⁰ para examinar el papel de OPN en la calcificación vascular cruzaron ratones OPN^{-/-} (que no muestran manifestaciones vasculares) con ratones MGP^{-/-} (que si desarrollan calcificaciones vasculares). Los ratones OPN^{-/-} MGP^{-/-} muestran una calcificación más acelerada que los que solo son deficientes en MGP (MGP^{-/-} OPN^{+/+}). Por lo que estos estudios indican que OPN es un inhibidor inducible de la calcificación vascular *in vivo*.

- Osteoprotegerina (OPG). Es un miembro de la familia de receptores de los factores de necrosis tumoral (TNFR), que ha sido identificado como regulador de la resorción ósea²⁸¹. OPG es producido por una gran cantidad de tejidos, incluidos el sistema cardiovascular, pulmón, riñón, sistema inmune y el hueso⁵⁰. En las lesiones

calcificadas avanzadas OPG se presenta alrededor del área calcificada. Se ha observado que los ratones deficientes en OPG desarrollan osteoporosis severa y calcificación de la media³⁴, dejando clara su función como inhibidor de la calcificación vascular. Se ha estudiado el potencial de OPG como marcador de la enfermedad cardiovascular. Su nivel en suero se incrementa con la severidad de la calcificación vascular^{142;156;266}. OPG funciona como un receptor soluble, señuelo de ligando (RANKL) del receptor activador del factor nuclear – κ B (RANK)⁵⁰. RANKL es producido por las células T activadas y estimula RANK, y esta activación permite, entre otras, la up-regulación de los mediadores de inflamación. OPG es además receptor del ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de la necrosis tumoral (TRAIL), que es un potente inductor de apoptosis. TRAIL se encuentra en gran variedad de tejidos, incluyendo la CMLV y las endoteliales. En las lesiones ateroscleróticas humanas TRAIL se ha localizado en torno a las áreas calcificadas²⁶⁴

d) Activadores de la calcificación. Además de la hiperfosfatemía e hipercalcemia existen estudios que sugieren la presencia de sustancias en el suero de los pacientes con ERC capaces de estimular la calcificación²⁰⁶. CMLV bovinas en presencia de suero urémico incrementan la expresión de proteínas relacionadas con el proceso de calcificación. Se ha identificado un amplio número de factores de la uremia que son capaces de inducir genes osteogénicos, de transformación osteoblástica y de secreción de algunas proteínas de la matriz ósea en la pared de los vasos y tejidos blandos. Algunos de estos factores son: el factor de necrosis tumoral (TNF)³⁰³, citoquinas inflamatorias²⁹⁴, fibronectina³²³, colágeno tipo I³²³ y 25-hidrocolesterol³²². Estas sustancias del suero urémico promueven la expresión de moléculas fundamentales para la calcificación vascular como son entre otros:

- Fosfatasa alcalina (ALP). Es uno de los marcadores fenotípicos de los osteoblastos y se le considera esencial en el proceso de calcificación vascular. Se ha detectado su presencia en las calcificaciones vasculares de íntima, media, y de válvulas cardíacas. ALP expresada en la superficie celular puede actuar sobre los liberadores de fosfato, liberando fosfato inorgánico²⁷⁷. Las citoquinas inflamatorias y la vitamina D inducen su up-regulación y la mineralización^{146;277}.

- *Core binding factor alpha 1* (Cbfa1). Es el principal regulador de la diferenciación ósea. Los ratones deficientes en Cbfa1 tienen problemas en la formación de cartílago y mineralización del hueso^{71;235}. Actúa como un factor de transcripción que dispara la expresión de importantes genes de la línea osteoblástica como son la osteocalcina, la osteopontina, la ALP o el colágeno tipo I³⁰⁸. El fosfato¹⁴⁴ y las toxinas urémicas²⁰⁶ up-regulan su expresión.

- *Bone morphogenic proteins* (BMPs) Las BMPs son un grupo de al menos 30 proteínas que reciben este nombre por sus propiedades osteoinductivas. Las BMPs forman parte de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Actúan a través de la unión a un complejo heterodímero de receptores de transmembrana (receptor BMP I y II) que trimeriza después de la señal. La unión de una BMP a su receptor específico tipo II da como resultado la activación de los receptores tipo I. Esto provoca la fosforilación y la translocación nuclear de los factores de transcripción Smad (son factores de transcripción que una vez activados entran en el núcleo con el fin de formar complejos para el reconocimiento y regulación -activación o represión- de genes específicos) modificando así la tasa de transcripción de los genes diana^{44;45;139;197;301}. Se ha descrito que inducen la formación ectópica de hueso³²⁰.

BMP2 es un potente morfogénico óseo y su expresión desencadena programas de regulación transcripcional osteogénica en el árbol arterial. BMP2 induce tanto a Msx2 como a Cbfa1 en CMLV¹²⁵. Msx2 es requerido para la formación de hueso intermembranoso y Cbfa1 es crítico para la diferenciación de osteoblastos, la formación de hueso endocondrial y la neovascularización. El papel de BMP2 en la calcificación vascular esta modulado (inhibido) por Matrix Gla Protein (MGP)³³³. BMP4 también se expresa en aortas no sanas. Actúa como agonista del receptor de BMP2.

Desde hace algún tiempo se las reconoce como mediadores de la calcificación vascular: BMP2 y BMP4 están implicados en la mineralización y en la inducción de la inflamación local, mientras que BMP7 retrasa la calcificación vascular. Las BMPs se expresan en variedad de células en las lesiones ateroscleróticas como son las endoteliales y las CMLV^{19;55;67;276}.

2.5. ESTADIOS DE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR.

La calcificación vascular es un proceso que se desarrolla en una serie de etapas¹⁴⁷ (figura 5). Las células vasculares de origen mesenquimal (CMLV; miofibroblastos, pericitos microvasculares y células vasculares calcificantes -CVC-) se pueden diferenciar en células semejantes a osteoblastos (*osteoblasts-like cells*) en las lesiones ateroscleróticas (etapa1). Las CVC fueron descritas por Demer y colaboradores⁶⁴ como una subpoblación de CMLV que en cultivo forman nódulos y calcificaciones que se mantienen estables a lo largo del tiempo. Estos nódulos comparten múltiples propiedades con el hueso como son el incremento de la actividad fosfatasa alcalina (ALP) y la expresión de osteopontina, osteonectina y osteocalcina³²². Se estima que podrían suponer entre el 20-30% de la población total de CMLV^{19;251;329}. Estas diferentes células vasculares de origen mesenquimal pueden exhibir fenotipos intercambiables bajo ciertas condiciones patológicas, incluidas la aterosclerosis, la diabetes, el envejecimiento y la ERC. Estas células pueden contribuir a la diferenciación osteoblástica. Para ello pierden marcadores de músculo liso y desarrollan características osteoblásticas como la expresión de ALP, osteocalcina y osteopontina (estadio 2). Esta diferenciación osteoblástica desemboca en la mineralización de la matriz extracelular (estadio 3).

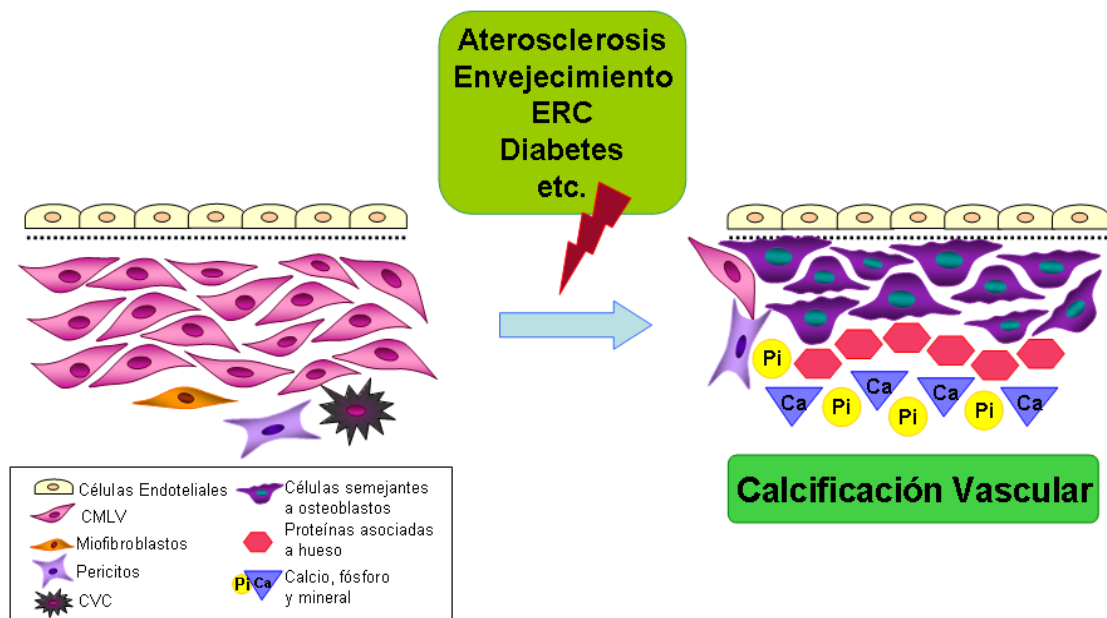


Figura 5: Hipótesis del mecanismo de calcificación vascular. Este proceso podría dividirse en tres etapas: Etapa 1 de diferenciación osteoblástica. Etapa 2 de expresión de proteínas asociadas a hueso. Etapa 3 de mineralización. Adaptado de Jono¹⁴⁷.

2.6. SISTEMA RANK-RANKL-OPG.

En la calcificación vascular las CMLV, y parece que también otras poblaciones de células con el mismo origen mesenquimal, empiezan a asemejarse a osteoblastos. Los osteoblastos son células, también de origen mesenquimal, responsables de la formación de hueso. Su principal función es la secreción de una compleja mezcla de proteína de la matriz ósea, conocida como osteoide. Por ello los osteoblastos activos tienen un prominente Aparato de Golgi y Retículo Endoplasmático Rugoso. Algunos osteoblastos quedan embebidos en la matriz ósea para formar osteocitos que gradualmente van dejando de secretar osteoide. La proliferación y diferenciación de células de la línea osteoblástica ocurre bajo la influencia de numerosos factores de transcripción. El factor de transcripción Cbfa1 es necesario para la expresión de genes específicos de osteoblastos. Algunos factores de crecimiento y proteínas morfogénicas son producidas por osteoblastos y secretadas a la matriz ósea. Además los osteoblastos regulan la actividad de los osteoclastos (células responsables de la reabsorción ósea), lo que indirectamente les hace jugar un papel importante en la homeostasis del calcio y del fósforo²³.

Los osteoclastos son células multinucleadas derivadas de la fusión de precursores mononucleares hematopoyéticos. Los osteoblastos secretan el ligando del receptor activador de NF- κ B (RANKL) que se une a su receptor (RANK) en los precursores osteoclásticos. Además los osteoblastos segregan OPG que actúa como un receptor soluble señuelo de RANKL e inhibe la diferenciación de osteoclastos al impedir la unión de este ligando a su receptor transmembrana RANK. Sin RANKL los osteoclastos no son capaces de desarrollarse²³. Algunos factores como la PTH promueven la diferenciación de osteoclastos elevando la expresión de RANKL en osteoblastos²³.

OPG es una glicoproteína, miembro de la superfamilia TNF, de unos 60 Kd que generalmente se secreta, aunque también se ha podido detectar asociada a la superficie de algunos tipos celulares³³¹. Consiste en 7 dominios estructurales¹⁰ (figura 6) y son los comprendidos entre el 1 y el 4, ambos incluidos, los que le confieren la actividad inhibidora de la osteoclastogénesis. Los dominios 5 y 6 se consideran dominios de muerte y median en la apoptosis. El dominio7 alberga a la región de unión de la heparina, un rasgo común de los factores de crecimiento y molécula

señalizadoras^{79;172;335}, y a un residuo desapareado de heparina para la formación y dimerización de puentes disulfuro^{10;306;328}

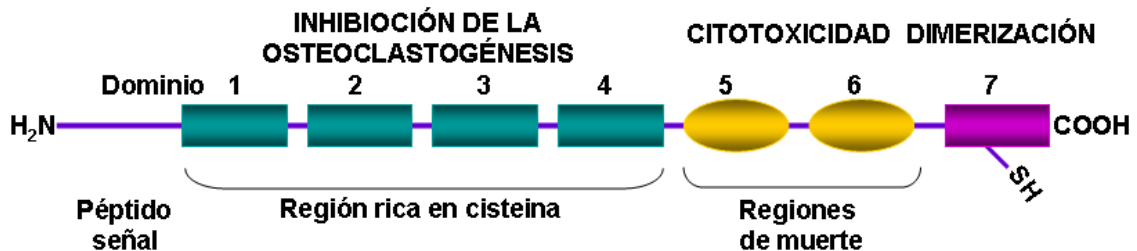


Figura 6: Estructura y función de la proteína OPG. Esquema en el que se muestran los dominios de OPG y sus propiedades bioquímicas y funcionales. Adaptado de Schoppet et al²⁶⁵.

OPG es producida en gran variedad de tejidos incluyendo el sistema cardiovascular (corazón, arterias y venas), pulmones, riñones, intestino y hueso, así como en células hematopoyéticas e inmunes^{51;118;257;281;299;319;331;335}. Su expresión y producción están reguladas por varias citoquinas, péptidos, hormonas y drogas. Las citoquinas, incluyendo TNF α , interleukinas 1 α y 18, factor de crecimiento transformante TGF β , BMPs, y hormonas esteroideas como el 17 β estradiol up-regulan los niveles de RNAm de OPG^{25;188;317}. Por el contrario, los glucocorticoides (que se sabe que promueven la resorción ósea), el inmunosupresor ciclosporina A (que causa osteoporosis y enfermedad vascular), la PTH, la prostaglandina E₂ y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) disminuyen la expresión de OPG^{26;116;121;218;233;316}.

RANKL (también denominado OPGL) es una proteína de 316 aminoácidos con un peso molecular de 38 Kd. Su expresión está también modulada por varias citoquinas, glucocorticoides y PTH¹⁶⁰. RANKL es producido por células de la línea osteoblástica y células T activadas. Promueve la formación, fusión, diferenciación, activación y supervivencia de osteoclastos permitiendo el aumento de la resorción y pérdida de hueso^{161;169}. RANKL estimula a su receptor específico RANK, que se expresa en un número más reducido de células como los progenitores y maduros osteoclastos, las células T activadas, las células dendríticas^{5;104;128;216;217}. La activación de RANK por RANKL inicia la cascada de señalización intracelular de NF- κ B^{141;253;326} (el factor nuclear kappa B es un complejo proteico que funciona como factor de transcripción y que está implicado en multitud de procesos de respuesta celular). El paso final de activación de RANK es la translocación al núcleo de NF- κ B, el cual

puede tener lugar por la vía clásica o por la vía alternativa. Ambas vías están reguladas por sus quinasas que son respectivamente $IKK\beta$ e $IKK\alpha$. La translocación al núcleo de NF- κ B modula la expresión de diferentes genes, como pueden ser algunas BMPs¹⁰³ como BMP4¹⁵¹. (Figura 7)

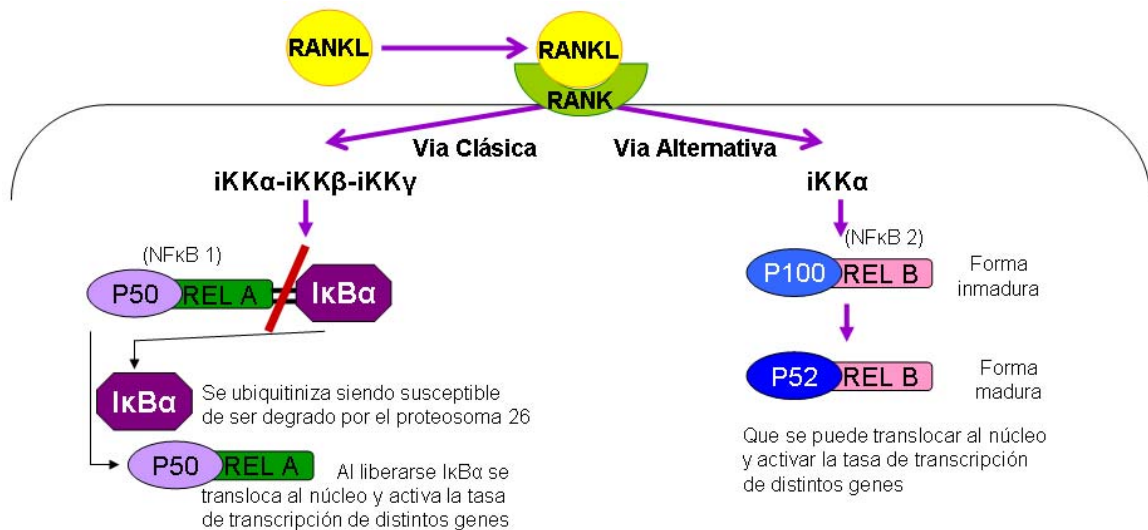


Figura 7: Esquema de la activación de RANK por RANKL. La unión de RANKL a su receptor RANK provoca la translocación al núcleo de NF- κ B. Esta translocación puede tener lugar por 2 vías: la clásica y la alternativa. En la vía clásica: $ik\kappa\alpha$, $ik\kappa\beta$ e $ik\kappa\gamma$ (que se encuentran formando un trímero) se activan. $ik\kappa\beta$ fosforila a $I\kappa B\alpha$ (un inhibidor constitutivo de NF- κ B o lo que es lo mismo de p50+REL A). Al fosforilar a $I\kappa B\alpha$, este se libera de p50+REL A. $I\kappa B\alpha$ se ubiquitina siendo susceptible de ser degradado por el proteosoma 26, y p50 + REL A al liberarse de $I\kappa B\alpha$ se transloca al núcleo y activa la tasa de transcripción de distintos genes. En la vía alternativa se activa $ik\kappa\alpha$ que fosforila a la forma inmadura de NF- κ B 2 (P100+REL B) dando lugar a su forma madura (p52 +REL B) que puede translocarse al núcleo y activar la tasa de transcripción de distintos genes. Por lo tanto estas 2 vías provocan la translocación al núcleo de NF- κ B, modulando la tasa de transcripción de distintos genes.

Los efectos biológicos de OPG son opuestos a los mediados por RANKL, ya que OPG actúa como un inhibidor soluble que previene la interacción de RANKL y subsiguiente estimulación de su receptor RANK³³⁰ (figura 8).

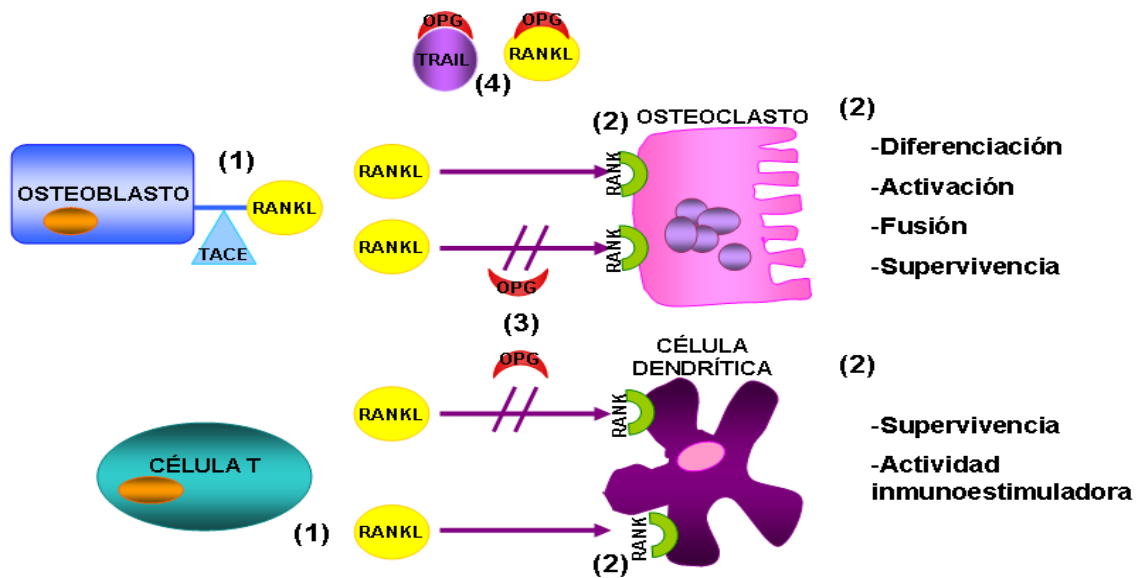


Figura 8: Modo de acción y efectos biológicos de RANKL, RANK y OPG en el metabolismo óseo y en el sistema inmune. (1) RANKL es expresado por células del linaje osteobástico (llevan el RANKL unido a ellas y precisan del enzima TACE¹⁸³ para liberar este RANK) y por linfocitos T activados (RANKL soluble) (2) RANKL estimula a su receptor específico RANK que se localiza en los osteoblastos y células dendríticas, modulando sus funciones biológicas. (3) OPG es secretado por células del linaje osteoblástico y actúa como un receptor soluble antagonista que neutraliza RANKL, previniendo las interacciones RANKL-RANK. (4) OPG también bloquea la citoquina proapoptótica TRAIL. Adaptado de Schoppet et al.²⁶⁵

La primera evidencia de que este sistema estaba implicado en la calcificación vascular derivó del estudio del ratón knock out para OPG., el cual presenta osteoporosis y calcificaciones de la aorta y arterias renales³⁴. La expresión de OPG se puede encontrar en la media de arterias grandes²⁸¹ y en varios tipos de células del vaso como son las CMLV y las endoteliales^{121;189}. En células endoteliales se ha demostrado que actúa como un factor autocrino de supervivencia¹⁸⁹. Por el contrario RANKL y RANK solo se han podido localizar en las áreas calcificadas de los ratones transgénicos, pero no en las arterias de ratones con el genotipo salvaje²⁰³, y hasta el momento no existían evidencias de su implicación directa en la enfermedad vascular. La hipótesis de que el sistema RANK-RANKL-OPG podría establecer un link entre osteoporosis y calcificación vascular, se basa en la alta prevalencia clínica y coincidencia de calcificaciones arteriales y enfermedad cardiovascular en mujeres posmenopáusicas y gente de edad avanzada con osteoporosis^{21;110;150}. Otros estudios han demostrado que OPG inhibe la calcificación vascular en ratas *in vivo* provocada tanto por vitamina D como por warfarina²⁴². Tanto el tratamiento con warfarina como con dosis tóxicas de vitamina D provocan extensas calcificaciones de las arterias aorta,

femoral, mesentéricas, hepáticas, renales y carotidas. El tratamiento con OPG previene la calcificación en estas arterias y es capaz de reducir los niveles de calcio y fósforo a niveles normales en la aorta abdominal.

3. LA VITAMINA D Y SU RECEPTOR EL VDR.

3.1. BREVE HISTORIA DE LA VITAMINA D.

La historia de la vitamina D es paralela a la historia del raquitismo y de la osteomalacia, dos enfermedades caracterizadas por la falta de calcio en los huesos debida al déficit de vitamina D. El raquitismo afecta a niños en crecimiento y la osteomalacia a adultos que ya tienen los huesos formados.

En los siglos I y II, el físico romano Soranus observó una serie de deformidades óseas más frecuentes en los niños romanos que en los griegos, y lo atribuyó a la desnutrición y falta de higiene de los niños romanos. En la misma época Galeno describió las deformidades óseas clásicas que se observan en el raquitismo. Durante la primera mitad del siglo XVII los casos de raquitismo eran cada vez más frecuentes en Gran Bretaña, y varios médicos se dedicaron a estudiar la enfermedad, describiéndola con gran detalle, pero sin llegar a encontrar la causa. Uno de ellos, Francis Glisson⁹⁹, publicó en 1650 el primer tratado sobre raquitismo, "The Rachitide", donde describió los síntomas y la patología clínica de diversos estados de malnutrición que indujo en animales de experimentación. A partir de este tratado otros investigadores del mismo siglo se empezaron a preguntar por el origen de la enfermedad. Van Siweten y Levacher de la Feutrie y Bouvier, relacionaron el raquitismo como una etiología alimentaria, comenzando a pensar en el papel patogénico de la alimentación "deficiente". En 1918, McCollum y sus colaboradores, John Howland, Edward Park y Paul Shipley estudiaron dietas de cereales deficientes en la vitamina A liposoluble y calcio en ratas jóvenes y observaron cambios esqueléticos semejantes al raquitismo infantil. De estos estudios dedujeron que la causa de la enfermedad podría estar relacionada con la deficiencia de la vitamina A o del calcio, o de la alteración del metabolismo de estos factores. Posteriormente estudiaron el efecto del aceite de hígado de bacalao, que en ocasiones se había utilizado en el tratamiento del raquitismo desde 1789, en estas ratas raquíticas. Suplementándolo en la dieta entre 2 y 7 días conseguían inducir un patrón uniforme de curación del raquitismo. De estos estudios surgió la cuestión de si la vitamina A era antirraquítica por si misma o si existía alguna otra sustancia con función específica antirraquítica y con una distribución similar a la vitamina A. McCollum y sus colaboradores concluyeron que la sustancia antirraquítica era diferente a la vitamina A con propiedades específicas para regular el metabolismo del hueso. La denominaron

vitamina D, ya que era la cuarta descubierta. Con anterioridad a estos resultados ya se había descubierto el papel preventivo de la luz solar sobre el raquitismo (Armand Trousseau en 1861), con lo que a partir del descubrimiento de la vitamina D y su relación con el raquitismo, se estableció que esta sustancia se producía en la piel por acción de la luz solar. Finalmente Adolf Windows descubrió la estructura química de la vitamina D y su relación con los esteroides, por lo que recibió el premio Nobel en 1928¹³⁶.

3.2. BIOSÍNTESIS DE LA VITAMINA D.

La vitamina D es una hormona esteroide importante que interviene en la homeostasis mineral y por tanto en la formación y mantenimiento de la estructura ósea²²⁸. Además se le han atribuido otras funciones relacionadas con la regulación del crecimiento, maduración y diferenciación celular¹⁰⁷, la secreción hormonal⁴⁸ y la función immune¹⁷⁷. La denominación vitamina D engloba una serie de hormonas esteroideas siendo las más conocidas el colecalciferol (vitamina D₃), que se sintetiza en la piel, y el ergocalciferol (vitamina D₂), que es sintetizado por las plantas (figura 9).

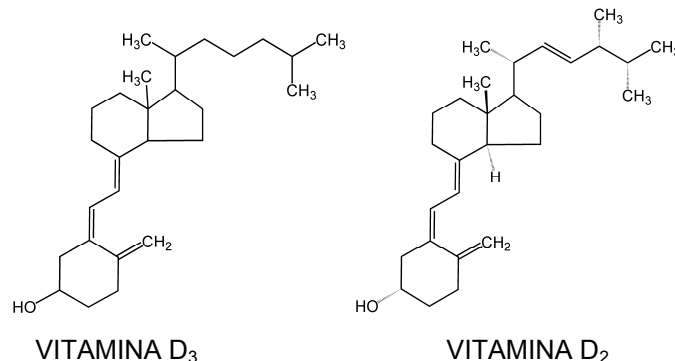


Figura 9: Esquema de las formas más importantes desde un punto de vista nutricional de la vitamina D: vitamina D₃ (colecalciferol) y vitamina D₂ (ergocalciferol).

Como hormona esteroide deriva del colesterol, concretamente del 7-dehidrocolesterol que por la exposición de la piel a la radiación ultravioleta (UV) sufre una conversión fotolítica a previtamina D₃ y de esta a vitamina D₃²⁹. Los metabolitos de la vitamina D son moléculas lipofílicas con baja solubilidad en agua, por lo que deben ser transportadas en la circulación por proteínas plasmáticas. Se desconoce el mecanismo responsable del transporte de la vitamina D₃ de la piel a la sangre, sin embargo una vez en la circulación sanguínea la vitamina D₃ se transporta unida a una proteína ligadora de vitamina D (DBP, "vitamin D binding protein")²⁹. Esta vitamina D₃

no tiene actividad biológica y para ello debe ser metabolizada en la forma activa. Dicha transformación requiere de dos pasos: en el hígado se produce una primera hidroxilación mediante el enzima mitocondrial 25 hidroxilasa produciéndose 25-hidroxivitamina D₃ (25(OH) D₃) a partir de la vitamina D₃²⁹. Este es el metabolito de la vitamina D más abundante en la circulación y tiene una larga vida media por lo que se utiliza con índice del estado nutricional de vitamina D. A partir de la 25(OH)D₃ por la acción del enzima 1α hidroxilasa²⁹ se forma la 1,25(OH)₂D₃ (forma biológicamente activa de la vitamina D₃). La 1α hidroxilasa se localiza fundamentalmente en el riñón, pero también se han descrito otros lugares de hidroxilación extrarrenal por la 1α-hidroxilasa como en las células endoteliales³³⁴, células de músculo liso vascular²⁸⁸, células de la mucosa del colon⁵⁴, macrófagos¹ y queratinocitos¹³⁰. La acción de la 1α-hidroxilasa es el paso limitante en la ruta biosintética de la vitamina D y está finamente regulada por la propia 1,25(OH)₂D₃ mediante retroalimentación negativa, además de por otros factores como la hormona paratiroidea (PTH) y la concentración de calcio y fosfato²⁴⁵. Los niveles del metabolito activo se regulan tanto a nivel de síntesis como de degradación²⁴⁵. La degradación tiene lugar por la acción del enzima 24 hidroxilasa responsable de la hidroxilación de la 25(OH)D₃ y de la 1,25(OH)₂D₃ para dar lugar a 24,25(OH)₂D₃ y 1,24,25(OH)₂D₃, respectivamente²⁴⁵. El enzima 24 hidroxilasa se expresa fundamentalmente en el túbulo renal, pero se ha encontrado en un amplio número de tejidos. Su afinidad por la 1,25(OH)₂D₃ es mayor que por a la 25(OH)D₃, por lo que se considera al enzima 24 hidroxilasa como un mecanismo de eliminación del exceso de 1,25(OH)₂D₃, y por tanto evitar su toxicidad^{33;245}.

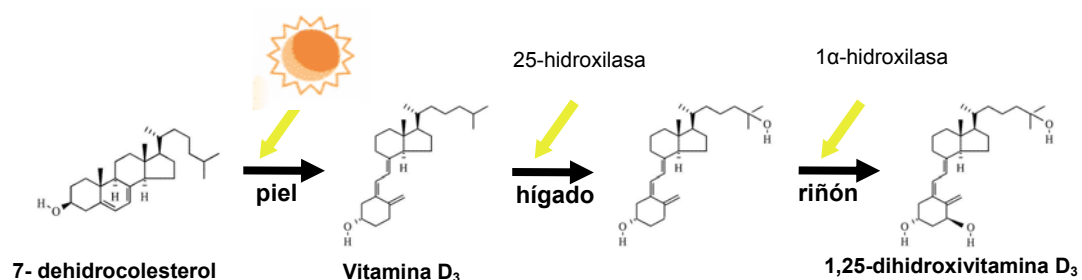


Figura 10. Síntesis de la vitamina D. El precursor de la vitamina D que se obtiene de la dieta o de la bioactivación del 7-dehidrocolesterol por las radiaciones solares sufre una serie de hidroxilaciones para obtener la forma activa 1,25(OH)₂D₃.

Todos los metabolitos de la vitamina D tienen una alta afinidad por la proteína transportadora, la DBP, en el siguiente orden 25(OH)D₃ = 24,25(OH)₂D₃ > 1,25(OH)₂D₃>

vitamina D₃. La unión DBP-metabolito limita su acceso a las células diana, de manera que no podrá ser metabolizado incrementando así la vida media de los metabolitos. Las hormonas esteroideas, como son los metabolitos de la vitamina D, pueden entrar dentro de las células por difusión con la membrana plasmática para ser metabolizados o ejercer su acción biológica. Por otro lado se ha descrito que en las células de los túbulos proximales, la 25(OH)D₃ necesita un receptor endocítico, la megalina, para poder entrar en la célula y ser metabolizados en 1,25(OH)₂D₃²³¹.

3.3. RECEPTOR DE LA VITAMINA D (VDR)

La vitamina D₃ ejerce su acción biológica a través de la unión a su receptor VDR (*Vitamin D Receptor*). El VDR es un receptor nuclear miembro de la superfamilia de los receptores de las hormonas esteroideas/tiroideas. Al igual que otros miembros de esta superfamilia el VDR actúa como factor de transcripción dependiente de ligando. Su estructura (figura 11) consta de diversas regiones bien definidas que pueden funcionar de forma autónoma:

- i) dominio de unión a ligando (LBD, *ligand binding domain*),
- ii) regiones de heterodimerización con el receptor del ácido retinoico (RXR, *retinoic X receptor*),
- iii) dominio de unión al DNA (DBD, *DNA binding domain*) y
- iv) lugar de unión a proteínas nucleares correguladoras del complejo transcripcional que modulan el nivel de transcripción de los genes diana.

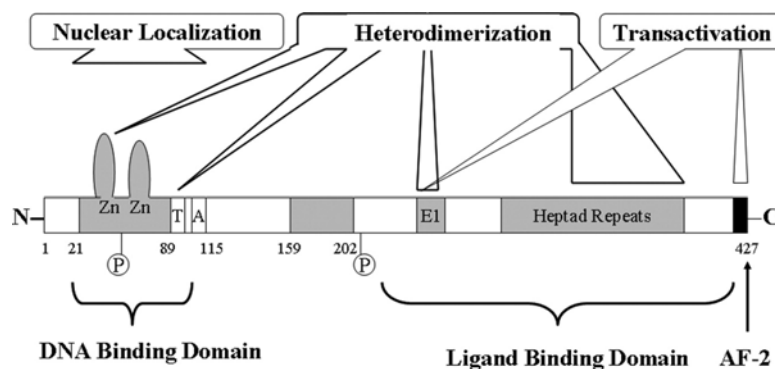


Figura 11. Dominios funcionales del receptor de la vitamina D (VDR): dominio de unión al DNA con función de localización nuclear y heterodimerización, dominio de unión a ligando responsable también de la heterodimerización y de la transactivación del receptor. Adaptado Dusso, Brown and Slatopolsky,⁷⁵.

El dominio de unión a ligando (LBD) se localiza en la porción terminal COOH- del VDR y es responsable de la unión de alta afinidad con la 1,25(OH)₂D₃. También tiene capacidad para unirse a la 25(OH)D₃ y a la 24,25(OH)₂D₃ pero sin embargo lo hace con una afinidad 100 veces menor^{33;201}. La región A del DBD del VDR es crítica para la correcta unión de la vitamina D al VDR.

En el extremo C-terminal se localiza el dominio de activación de la función-2 (AF-2, *activation function-2*). Su activación requiere la unión de proteínas motoras²⁴⁶, que son responsables de la rápida translocación del VDR desde el citoplasma al núcleo a través de los microtúbulos¹¹.

En la región N-terminal se localiza el dominio de unión al DNA (DBD), una región altamente conservada en la familia de receptores nucleares esteroideos, donde se localizan los motivos de unión al DNA y que contiene 2 dedos de zinc. Los dedos zinc consisten en un complejo tetraédrico formado por 4 cisteínas con una molécula de zinc que crea un lazo o “dedo de aminoácidos” que estabiliza la unión con el DNA por medio de contactos con fosfatos del esqueleto de DNA. El primer dedo de zinc (próximo al extremo N-terminal) es el responsable de que el VDR pueda interactuar con alta afinidad con secuencias específicas de DNA de la región promotora (concretamente en la región 5' de esta) de los genes diana de la vitamina D. Dichas secuencias génicas son conocidas como elementos de respuesta a la vitamina D (VDREs, *vitamin D response elements*)¹¹¹. El segundo dedo de zinc permite que el VDR actúe como un heterodímero uniéndose al receptor del ácido retinoico (RXR). Dicha unión conlleva variaciones en los tres dominios de heterodimerización, que inducen un cambio conformacional en el VDR esencial para las funciones transactivadoras o transrepressoras del receptor. Para estas funciones necesita interactuar con proteínas nucleares coreguladoras que permitirán una modulación positiva o negativa de la transcripción en la que interviene el VDR.

Dos de los dominios anteriores sirven como superficie adaptada para la unión de los coreguladores. El dominio de heterodimerización de RXR contiene 246 residuos muy conservados entre los receptores nucleares que sirven de unión para los coreguladores. La otra región se localiza en el dominio AF-2 y permite la unión de proteínas del complejo activador de la transcripción como la RNA polimerasa.

3.4. ACCIONES DE LA VITAMINA D.

3.4.1. ACCIÓN GENÓMICA DE LA VITAMINA D A TRAVÉS DEL VDR

La magnitud de la respuesta biológica del VDR regulada por la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ depende de diferentes factores: la accesibilidad del ligando, el contenido de VDR, modificaciones genéticas y postraduccionales, y disponibilidad y estado de activación de los coreguladores. La respuesta biológica de la vitamina D en las células diana ocurre según el modelo de transactivación de genes de las hormonas esteroides. Por tanto, cuando la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se une al VDR sufre un cambio conformacional que permite que el receptor sea translocado al núcleo donde forma el heterodímero generalmente con el receptor del ácido retinoico (RXR)²⁹. Este heterodímero se une a regiones promotoras de genes específicos en los tejidos diana, los VDREs, formando complejos con proteínas adicionales coactivadoras y corepresoras de la transcripción de manera que pueden incrementar o disminuir la expresión de los genes diana²⁹.

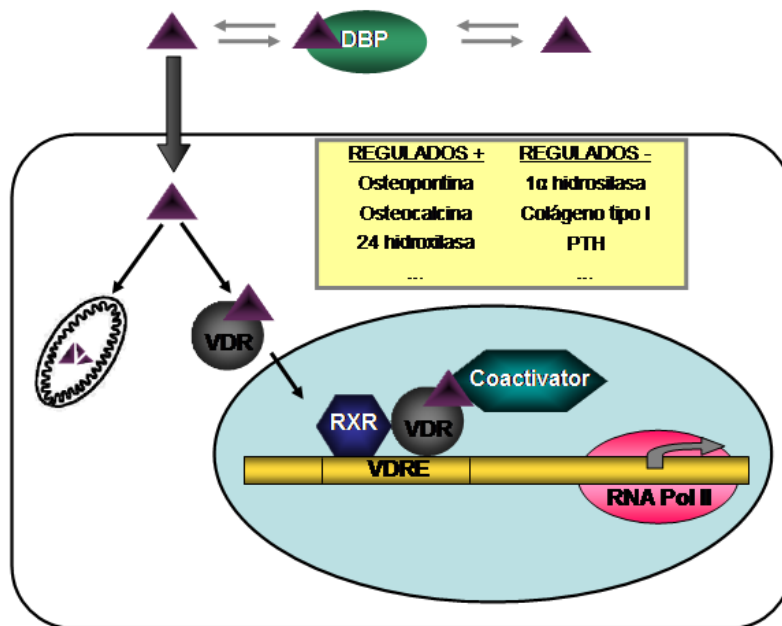


Figura 12. Acción de la vitamina D a través de su receptor (VDR). El metabolito activo de la vitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) entra en las células diana por difusión pasiva y puede ser degradado o unirse al VDR que entra al núcleo y tras heteromerizar con el RXR, activará o inhibirá la expresión génica de los genes diana que contienen VDREs.

En el modelo clásico los VDREs están formados por 2 secuencias hexaméricas de DNA de unión a receptores nucleares: RGKTCA ($\text{R} = \text{A o G}$, $\text{K} = \text{G o T}$)⁷² que se clasifican según la orientación y el número de bases que se encuentren entre las dos secuencias:

- DR (*direct repeat*): DR3, DR4
- IP (*inverted palindrome*): IP7, IP9

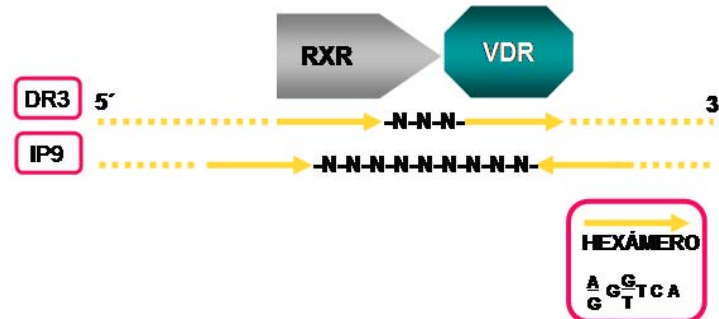


Figura 13. Tipos más comunes de elementos de respuesta de la vitamina D (VDRE): DR3 que consiste en la repetición de la secuencia consenso en el mismo sentido separada por 3 bases e IP9 que contiene la repetición de las secuencias en sentidos contrarios y separada por 9 bases.

Los tipos de VDRE más comunes son el DR3 e IP9. Según el modelo de múltiples vías de la vitamina D de Carlberg et al ⁴², el carácter pleiotrópico de la vitamina D podría atribuirse a los diferentes tipos de uniones que se pueden dar entre los dímeros de VDR y los diferentes VDREs. En relación con este modelo, se han estudiado análogos de la vitamina D que muestran una tendencia a la hora de activar el heterodímero VRD-RXR para que se una a VDREs, de manera que según el análogo se unirá con más frecuencia a un VDRE tipo IP9 o DR3^{59;222}. Esta selectividad del promotor también se podría correlacionar con los estudios de Schröder et al ²⁶⁸ donde observan que el VDRE de tipo IP9 es más frecuente en los genes involucrados en la regulación del ciclo celular.

Está descrito que el VDR se distribuye ampliamente en multitud de tipos celulares, no quedando restringido a los tejidos diana clásicos de la vitamina D, como es el hueso, lo que justifica la gran variedad de acciones de la 1,25(OH)₂D₃ en el organismo²⁰. Esta acción en los genes diana puede afectar a diferentes procesos o respuestas, que pueden clasificarse en:

- respuestas clásicas de la vitamina D: procesos fisiológicos clásicos como la regulación de la concentración del calcio y fosfato en la sangre por la acción de la vitamina D en los intestinos el hueso y el riñón.

- respuestas no clásicas de la vitamina D que se pueden clasificar en 3 categorías generales según sus efectos: regulación de la secreción hormonal, de la función inmune y de la proliferación y diferenciación celular de la vitamina D en los procesos de proliferación y diferenciación de diversos tipos celulares como en células epiteliales de la piel, células intestinales...

3.4.2. ACCIÓN NO-GENÓMICA DE LA VITAMINA D

Existe además diferentes respuestas de los metabolitos de la vitamina D, al igual que sucede con otras hormonas esteroideas, que son demasiado rápidas para implicar cambios en la expresión génica. Algunas de estas acciones no genómicas se describen en la tabla 3

Respuesta	Tipo celular/órgano	Referencia
Transporte rápido del Ca ²⁺	Intestino	224
Activación del metabolismo del fosfoinositol	Paratiroides, enterócitos, mioblastos.	22;176;210
Incremento de la concentración de Ca ²⁺ en el citosol	Monolitos, osteoblastos, enterócitos	124;175;182
Incremento de los niveles de c GMP	Intestino, células renales corticales.	106;315
Activación de la vía PKC	Condrocitos.	296
Activación de las MAP Quinasas	Células hepáticas.	12
Estimulación de apertura de los canales de Cl ⁻ .	Células osteoblásticas	332

Tabla 3. Respuesta rápida de la 1,25(OH)₂D₃. Algunas de las respuestas rápidas de la vitamina D y el tipo celular donde actúa.

En estas respuestas podrían intervenir receptores de la superficie celular Nemere et al²²³ caracterizaron un receptor asociado a la membrana, que denominaron proteína de unión a los esteroides de respuesta rápida (*rapid-response steroid-binding protein*, 1,25D3-MARRS). Este fue aislado de las membranas de células de intestino de pollo y consiguieron hacer un anticuerpo que bloqueara las acciones no genómicas de la 1,25(OH)₂D₃. El papel de estas acciones no genómicas no está todavía muy claro.

3.5 FUNCIONES DE LA VITAMINA D

La vitamina D es esencial para la interacción del riñón, los huesos, las glándulas paratiroides y el intestino. Permite el mantenimiento de los niveles de calcio extracelular de una manera estrictamente regulada, lo cual es vital para la integridad del esqueleto y la fisiología celular. La vitamina D incrementa la absorción de calcio y fósforo en el duodeno proximal, promoviendo el paso a través del borde en cepillo al interior de la célula y su salida por la membrana basolateral¹²². El mecanismo de acción para promover este transporte de calcio en el intestino implica la síntesis de la proteína de unión al calcio (CaBP, *calcium binding protein*)³⁰. La síntesis de esta proteína es dependiente de 1,25(OH)₂D₃ y se regula tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional.

La vitamina D es esencial para al mantenimiento y desarrollo del esqueleto. El déficit de vitamina D provoca raquitismo en humanos jóvenes en edad de crecimiento y osteomalacia en adultos. Como regulador de la transcripción de genes relacionados con el metabolismo óseo la vitamina D induce la expresión de osteocalcina, RANKL (*receptor activator of NF kappa B ligand*) e inhibe la de colágeno tipo I y de OPG (osteoprotegerina)¹⁵⁹. Se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* que la vitamina D estimula la diferenciación de los osteoclastos y por tanto la liberación de calcio y fosfato.

El sistema endocrino de la vitamina D es también un potente modulador de la función paratiroidea. La deficiencia de vitamina D provoca una hiperplasia de la glándula y un incremento de la síntesis y secreción de PTH. Como ya se explicó en apartados anteriores, la administración de 1,25(OH)₂D₃ inhibe la síntesis de PTH y el crecimiento celular, motivo por el que se usa este compuesto en el tratamiento del hiperparatiroidismo secundario.

En el riñón el principal efecto de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ es el control de su propia síntesis y degradación al inhibir la 1α hidroxilasa y estimular la expresión de la 24 hidroxilasa, además de inducir la expresión de megalina en el túbulo proximal²³¹.

Posteriormente, se ha observado que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ tiene acciones en otros órganos diana como son la piel, páncreas, hígado, etc²⁹. Estas acciones son conocidas como acciones no clásicas de la vitamina D y están ligadas a la presencia de VDR en diferentes tipos celulares. Entre estas acciones no clásicas destacan la regulación de la proliferación y diferenciación celular y la regulación de la secreción hormonal y de la función inmune. Los macrófagos y linfocitos además de tener VDR también expresan 1α hidroxilasa, por lo que tienen la capacidad de sintetizar $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ de forma local en determinadas circunstancias^{209;211}. También existen estudios epidemiológicos que demuestran que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ disminuye el riesgo de cáncer de colon^{91;92;194}, pecho^{92;92;255} y próstata¹⁸⁶, y por este motivo se ha estudiado *in vitro* los efectos de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en células cancerígenas y se ha demostrado que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ tiene la capacidad de inhibir la proliferación y estimular la diferenciación celular en estos tipos de células. Por el contrario existen otros tipos celulares, como las células de endometrio⁶², condrocitos¹⁶⁸ y CMLV⁴¹ donde la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ estimula la proliferación celular.

Resumiendo, existen multitud de respuestas de la vitamina D y aún queda mucho por estudiar. La presencia de VDR en las células endoteliales y en células de músculo liso vascular, y el descubrimiento de que estas células sintetizan $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ localmente, hace cuestionarse el papel autocrino-paracrino de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en la pared de los vasos.

3.6. ANÁLOGOS DE LA VITAMINA D.

Las distintas funciones de la vitamina D llamaron la atención de la industria farmacéutica en los años 80 y 90, que intentaban separar las dos funciones principales de la vitamina D: agente calcémico y agente de diferenciación celular. Aparecen así algunos de los análogos de la vitamina D “hipo-calcemiantes” como Calcipotriol, OCT, $19\text{-nor-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ (o Paricalcitol) y $1\alpha\text{-OH-D}_2$, los cuales han sido ampliamente utilizados en dermatología (tratamiento de la psoriasis) y para el tratamiento del hiperparatiroidismo secundario^{16;28}. La vitamina D y sus metabolitos se caracterizan por

su flexibilidad conformacional (figura 14) lo que permite la unión al VDR, a la DBP y al sustrato de los enzimas que metabolizan la vitamina D con diferente afinidad.

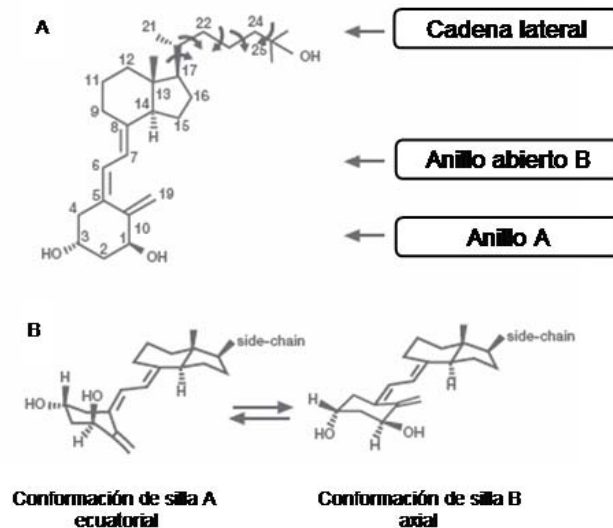


Figura 14. Flexibilidad conformacional de la 1,25(OH)₂D₃. (A) Estructura de la 1,25(OH)₂D₃, las 3 partes de la molécula que le confieren una conformación flexible son: la cadena lateral que puede rotar 360° en el carbono 5, el anillo B que también puede rotar 360° en los carbonos 6 y 7, y el anillo A que puede sufrir cambios de orientación entre ecuatorial y axial. (B) Diferentes conformaciones que puede tener la 1,25(OH)₂D₃ dependiendo del anillo A.

La síntesis de análogos de la vitamina D se centra en esta propiedad de los metabolitos de la vitamina D. La mayoría de los análogos han sido diseñados de manera que interactúan directamente con la maquinaria de transcripción no requiriendo así los pasos anteriores de activación de la vitamina D. Por ello los criterios más importantes que influyen en el diseño de análogos son:

a) Interacción con el VDR/RXR/VDRE.

La afinidad de los análogos por el VDR, comparada con la vitamina activa, es un punto importante ya que puede ser la causa de la disminución e incluso del bloqueo de la respuesta. Cuando el ligando natural se une al VDR, este sufre el cambio conformacional preciso para poder interactuar tanto con el VDRE del gen diana como con los coactivadores encargados de formar el complejo transcripcional. Los análogos

de la vitamina D imitan a la forma activa de la vitamina D, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, y actúan a través del mismo mecanismo. Por lo tanto, las diferencias de biopotencia que se pueden encontrar entre los análogos de la vitamina D y su forma activa podrían deberse en parte a cambios de acoplamiento a la hora de dimerizarse o de interaccionar con los coactivadores. Es decir, los análogos al unirse al VDR provocan un cambio conformacional más o menos afín a la dimerización y/o a la unión de los coactivadores de la transcripción. También se han encontrado análogos de la vitamina D que inducen un cambio conformacional específico del VDR que incrementa la estabilidad del receptor y lo protege contra procesos de proteólisis²²¹.

b) Enzimas catalíticos de la célula diana.

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ es catabolizada por el enzima 24 hidroxilasa. Esta enzima se encuentra prácticamente en todas las células diana de la vitamina D, y se ha descrito la presencia de VDRE en el promotor del gen de la 24 hidroxilasa^{309;336}. Esto lleva a pensar que la existencia de esta vía catabólica hace menos sensible a las células diana después del estímulo hormonal. La acción de este enzima sobre los análogos de la vitamina D no está demasiado estudiada, pero se puede pensar que el catabolismo de las células diana sobre estos análogos podría contribuir a la actividad farmacocinética y biológica observada tanto *in vitro* como *in vivo*. Siu-Caldera et al ²⁸² discuten la posibilidad de que algunos análogos de la vitamina D puedan ser activados en vez de catabolizados por el mismo enzima.

c) Activación enzimática.

La mayoría de análogos son activos como tal, sin requerir ningún paso de activación, pero se ha demostrado que estos análogos tienen actividad biológica a concentraciones excesivamente altas, ya que sufren los efectos laterales o tienen menor vida media en el plasma debido a la baja afinidad con la DBP. Por lo tanto sería mejor diseñar análogos que pudiesen ser activados *in vivo*, pero los criterios estructurales que permiten a los metabolitos de la vitamina D ser sustrato de la 25 hidroxilasa hepática aún no se conocen. Este interés por diseñar análogos que pudiesen ser activados por la 25 hidroxilasa se ha incrementado con el descubrimiento de la presencia de este enzima en otros tejidos extrahepáticos como: riñón⁹³, hueso¹³⁴ y endotelio vascular¹³⁵, de manera que si las células diana pudiesen sintetizar la forma activa a partir de la pro-droga sin necesidad de que la hormona entrara en el torrente sanguíneo, se podría incrementar la potencia de actuación del análogo.

d) Proteínas de unión a la vitamina D.

La DBP es una glicoproteína que tiene diferentes funciones, entre ellas la de unión y transporte de los metabolitos de la vitamina D. Además es la encargada de secuestrar la actina G para prevenir la polimerización en sangre, actúa como un ligando para la megalina para poder absorber la forma $25(\text{OH})\text{D}_3$ en riñón y sintetizar la forma activa, y también se une a ácidos grasos y a agentes quimiotácticos. Por todo ello la DBP es importante en la farmacocinética de los análogos de la vitamina D que pueden tener mayor o menor afinidad por la DBP dependiendo de las modificaciones en las cadenas de los diferentes compuestos. Los análogos con baja afinidad por la DBP tienen menor vida media ya que son eliminados más rápidamente de la circulación pero también tienen mayor accesibilidad a las células diana, lo que podría incrementar la respuesta en el caso de tejidos que requieren de una corta exposición del ligando. Esto podría explicar también la respuesta diferencial del OCT (tiene una afinidad por la DBP de 400 a 500 veces menor que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), pero en el caso del 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ se observan valores muy similares a la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en cuanto a afinidad a la DBP. Además existen otras proteínas, en un porcentaje mucho menor que la DBP, que pueden actuar como transportadores de los análogos, y su impacto en la respuesta diferencial aun no se conoce.

Por todo esto, la selectividad de los análogos no es siempre específica de tipo celular o tejido, también puede ser específica del proceso o gen dentro de un mismo tejido. Todos estos factores son importantes a la hora de diseñar y estudiar los análogos de la vitamina D. Cuando se haya identificado el mecanismo molecular exacto de actuación de la vitamina D se podrán diseñar análogos no calcemiantes con ventajas transcripcionales sobre la forma activa, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

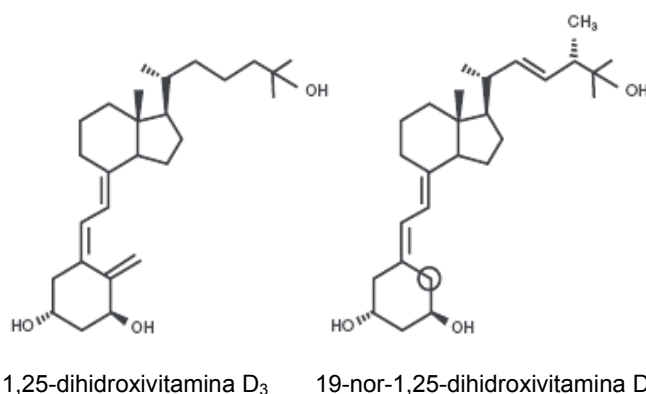


Figura 15. Estructura de la 1,25-dihidroxitamina D_3 y del 19-nor-1,25-dihidroxitamina D_2 . Adaptado de Finch, Brown and Slatopolsky⁸⁴

La acción de algunos de estos análogos ya ha sido probada tanto en estudios experimentales como clínicos. El 19-nor-1,25(OH)₂D₂ (Figura 15), Paricalcitol, es un análogo de la vitamina D de tercera generación, desarrollado en 1985, que tiene modificaciones tanto en la cadena lateral como en el anillo A. Se cree que estas modificaciones causan una supresión efectiva de la PTH con menos efectos calcémicos y fosfatémicos, por lo que se usa actualmente como tratamiento para el HPT^{231;180;191;283;285;291;298}. Estos efectos diferenciales del 19-nor-1,25(OH)₂D₂ no solamente se han encontrado en los niveles plasmáticos de calcio y fósforo, existen estudios con ratas con insuficiencia renal en los que se ha demostrado que el 19-nor-1,25(OH)₂D₂ no incrementa la expresión del VDR en el intestino, contrariamente al efecto que tiene la 1,25(OH)₂D₃²⁹⁸. También se ha demostrado que el efecto sobre el hueso es distinto, el 19-nor-1,25(OH)₂D₂ tiene un efecto menor sobre la actividad osteoclástica y osteoblástica que la 1,25(OH)₂D₃^{123;191}.

Todos estos resultados inducen a pensar que la 1,25(OH)₂D₃ y el 19-nor-1,25(OH)₂D₂ tienen efectos diferenciales sobre los órganos diana.

3.7 PAPEL DE LA VITAMINA D EN LA CALCIFICACIÓN VASCULAR

El descubrimiento de que las CMLV expresan VDR, hizo pensar que la unión del metabolito activo de la vitamina D, 1,25(OH)₂D₃, podría tener efectos sobre las propias CMLV. De hecho, la 1,25(OH)₂D₃ up-regula el VDR e incrementa la carga de calcio en las CMLV de rata en cultivo¹³⁸ y de aorta conejo²⁴⁸. Otros estudios mostraron que concentraciones de 10⁻⁹ M de 1,25(OH)₂D₃ inducían la proliferación de las CMLV¹⁸⁷, migración y un aumento de la expresión de osteopontina²⁵⁰. También se demostró que una concentración de 1,2 μmol/L inducía cambios morfológicos en las CMLV de aorta de rata, incluida la progresión de un fenotipo contráctil a uno sintético con un incremento la producción de factores que promueven la calcificación *in vitro*. Este efecto parece ser debido a la estimulación de la actividad proliferativa en estas células³⁰⁷. Cardús y colaboradores demostraron que el 19-nor-1,25(OH)₂D₂ inducía una menor respuesta proliferativa comparada con el 1,25(OH)₂D₃^{40;41}.

Jono *et al* demostraron que la 1,25(OH)₂D₃ a concentraciones comprendidas entre 10⁻⁷ y 10⁻⁹ M induce un incremento de la calcificación dosis dependiente en CMLV bovinas *in vitro*. Esto va acompañado de un incremento similar en la actividad fosfatasa

alcalina y una down-regulación del péptido relacionado al PTH (PTHrp)^{145;146}. El PTHrp fue identificada en el año 1987, como una proteína semejante a la PTH, responsable de los episodios hipercalcémicos observados en ciertos enfermos de cáncer^{39;295}. El efecto hipercalcémico es debido a que el PTHrP también se fija y activa el mismo PTH R1²³⁴, presente también en CMLV¹⁴⁵.

Existen en la actualidad numerosos estudios que señalan a la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ como inductor de la calcificación vascular en los pacientes con ERC, sin embargo aun existen multitud de interrogantes sobre cual es el mecanismo por el que produce esta deposición de calcio en las CMLV. Su mejor conocimiento proporcionaría una herramienta de gran utilidad a la hora de luchar contra la alta mortalidad de estos pacientes por causas cardiovasculares.

Objetivos

La ERC es una patología compleja con múltiples consecuencias como son el síndrome urémico, hiperfosfatemia, hiperparatiroidismo secundario y enfermedades cardiovasculares, incluyendo las calcificaciones vasculares. Ante esto, los nefrologos tratan de controlar los niveles séricos de fósforo en la ingesta y con el uso de quelantes. También es una práctica común el tratamiento de estos pacientes con Calcitriol o análogos como el Paricalcitol, que suprimen los efectos en la glándula paratiroides, y regulan la absorción intestinal de calcio y fósforo y su movilización en el hueso. Conocer cual es la relevancia y las consecuencias de algunos de estos factores es la finalidad de nuestro estudio, por lo que definimos los siguientes objetivos para esta tesis:

1. Analizar las diferencias en calcificación vascular entre el Calcitriol y su análogo el Paricalcitol *in vivo* e *in vitro*.

2. Estudiar el mecanismo por el que calcifican las células de músculo liso vascular. Investigar el papel de RANKL.

3. Conocer los cambios que se producen durante la uremia en las células de músculo liso vascular y su relación con la calcificación vascular.

4. Conocer los efectos de la ingesta de una dieta con alto fósforo en animales con función renal normal.

Resultados

1. Differential effects of Vitamin D analogs on vascular calcification.
2. RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4–dependent pathway.
3. Influence of uremia, and Calcitriol and Paricalcitol treatment in Vitamin D metabolism and in vascular calcification.
4. High phosphorus diet increases blood pressure by PTH-renin stimulation in vivo.

ARTÍCULO 1: Differential effects of Vitamin D analogs on vascular calcification.

Efectos diferenciales de análogos de vitamina D en la calcificación vascular

Introducción: La calcificación vascular es un fenómeno frecuente en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC). Estos pacientes a menudo presentan hiperparatiroidismo secundario (HPT2), en parte debido a una disminución de la síntesis renal de Calcitriol, por lo que una de las principales opciones terapéuticas es su tratamiento con Calcitriol o análogos, como el Paricalcitol. Sin embargo, el tratamiento con Calcitriol presenta efectos secundarios no deseados, como el incremento de las calcificaciones en tejidos blandos, como es la calcificación vascular. Las células de músculo liso vascular (CMLV) expresan el receptor de vitamina D (VDR) y el Calcitriol actúa sobre estas células provocando cambios fenotípicos en ellas que conducen a su calcificación. Esto ha llevado a la búsqueda de análogos del Calcitriol, que tienen un efecto similar a la hora de controlar los niveles de PTH, pero que evitan estos efectos negativos. Uno ellos es el Paricalcitol, que al compararlo con el Calcitriol en estudios retrospectivos de pacientes con ERC, se asocia con una mejora en la supervivencia. En este trabajo, estudiamos los efectos del Calcitriol y Paricalcitol sobre la calcificación de las CMLV tanto *in vitro* como *in vivo*, con el fin de analizar las posibles diferencias entre estos dos compuestos.

Materiales y Métodos: Analizamos el efecto del Calcitriol y su análogo, el Paricalcitol, sobre la calcificación de CMLV *in vitro* y en animales sometido a nefrectomía subtotal como modelo de ERC *in vivo*.

Resultados: A pesar de que el Calcitriol y el Paricalcitol (siguiendo el ratio 1:3 usado en clínica) son igual de eficaces a la hora de suprimir el incremento en los niveles séricos de PTH y que los niveles de calcio y fósforo del suero son similares, ambos tratamientos presentan un efecto diferencial en la calcificación vascular *in vivo*. Los animales tratados con Calcitriol presentan extensas calcificaciones de las aortas, mientras que los tratados con Paricalcitol solo muestran pequeñas calcificaciones. Estas diferencias *in vivo* se podrían explicar con las diferencias observadas en las CMLV *in vitro*. El Calcitriol aumenta la calcificación de las CMLV incubadas en medio calcificante, mientras que el Paricalcitol no. La calcificación vascular es un proceso activamente regulado, en el que las CMLV dejan de expresar marcadores de células de

músculo liso asociados fundamentalmente a contractilidad y empiezan a expresar marcadores osteoblásticos. Una de estos marcadores osteoblásticos es RANKL, una proteína altamente expresada por osteoblastos, apenas detectable en las CMLV normales pero que incrementa su expresión en las lesiones arteriales calcificadas. En nuestros experimentos la expresión y secreción de RANKL está significativamente elevada en las CMLV incubadas con Calcitriol pero no en las incubadas con Paricalcitol.

Por otro lado, los animales con ERC tratados tanto con Calcitriol como con Paricalcitol muestran un aumento en la presión arterial sistólica. Sin embargo, la presión arterial diastólica sólo se eleva de manera significativa en los animales tratados con Paricalcitol. Este efecto conlleva a un incremento significativo de la presión de pulso en los animales tratados con Calcitriol, pero no en los tratados con Paricalcitol. El aumento de la presión de pulso probablemente esté causado por la pérdida de elasticidad de las arterias de los animales tratados con Calcitriol, al presentar extensas calcificaciones.

Conclusiones: El Calcitriol y el Paricalcitol tienen un efecto diferente en la calcificación CMLV lo que podría explicar, en parte, las diferencias observadas en cuanto a supervivencia en el ámbito clínico.

JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH
 Volume 22, Number 6, 2007
 Published online on March 12, 2007; doi: 10.1359/JBMR.070305
 © 2007 American Society for Bone and Mineral Research

Differential Effects of Vitamin D Analogs on Vascular Calcification

Anna Carcots,¹ Sara Panizo,¹ Eva Parisi,² Elvira Fernandez,^{1,2,3} and Jose M Valdivielso^{2,3}

ABSTRACT: We tested the effects of calcitriol and its analog paricalcitol on VSMC calcification *in vitro* and *in vivo*. For that reason, cells and animals with five-sixths nephrectomy were treated with both compounds. Calcitriol, but not paricalcitol, increased VSMC calcification *in vitro* and *in vivo* independently of calcium and phosphate levels. This increase in calcification was parallel to an increase in the RANKL/OPG ratio.

Introduction: Vascular calcification is a common finding in patients with endstage renal disease. Furthermore, those patients often present secondary hyperparathyroidism, partly because of a decrease of calcitriol synthesis on the kidney. Thus, one of the main therapeutic options is to treat those patients with calcitriol or analogs. However, this treatment presents unwanted side effects, such as increases in vascular calcification.

Materials and Methods: We tested the effect on vascular smooth muscle cell (VSMC) calcification of calcitriol and one of its analogs, paricalcitol, *in vitro* and *in vivo* in animals with endstage renal disease.

Results: Calcitriol increased calcification of VSMCs cultured in calcification media. This effect was not present when cells were incubated with paricalcitol. Furthermore, only cells incubated with calcitriol showed an increased RANKL/osteoprotegerin (OPG) expression. Animals with renal failure treated with hypercalcemic doses of calcitriol and paricalcitol showed an increase in systolic blood pressure. However, diastolic blood pressure only raised significantly in those animals treated with paricalcitol. This effect led to a significant increase in pulse pressure in animals treated with calcitriol. The increase in pulse pressure was likely caused by the extensive calcification observed in arteries of animals treated with calcitriol. This increase in calcification was not seen in arteries of animals treated with paricalcitol, despite having similar levels of serum calcium and phosphorus as animals treated with calcitriol. Furthermore, the decreases in serum PTH levels were similar in both treatments.

Conclusions: We conclude that paricalcitol has a different effect than calcitriol in VSMC calcification and that this could explain part of the differences observed in the clinical settings.

J Bone Miner Res 2007;22:860–866. Published online on March 12, 2007; doi: 10.1359/JBMR.070305

Key words: calcitriol, paricalcitol, RANKL, osteoprotegerin, calcification

INTRODUCTION

IT HAS BEEN known for many years that calcification of large arteries is common among patients with endstage renal disease (ESRD).⁽¹⁾ Medial aortic calcification and stiffening account for reduced vascular distensibility and increased vascular resistance in renal failure patients,⁽²⁾ which has been associated to an increase in mortality.⁽³⁾ Another complication in these patients is the intimal calcification of small vessels leading to ischemia of organs and skin. This syndrome, called calciphylaxis, also causes high mortality caused by infections and organ damage.⁽⁴⁾ Thus, it is now accepted that patients with ESRD have more severe vascular calcifications and at a younger age.⁽⁵⁾ Several explanations for this marked calcification in ESRD are proposed, including the deregulation of calcium/phosphate metabolism,^(6,8) the use of calcium-containing binders,⁽²⁾ and the use of vitamin D.^(7,9)

In ESRD, high circulating levels of PTH cause several complications that increase morbidity and mortality.⁽⁶⁾ Impaired production of the active form of vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D₃ or calcitriol) is a major contributor to the generation and maintenance of parathyroid hyperplasia and to the increased synthesis and secretion of PTH. Furthermore, the absence of calcitriol could further stimulate the development of secondary hyperparathyroidism (2HPT) indirectly through decreased calcium absorption and subsequent hypocalcemia.^(10,11) The fact that calcitriol represses both parathyroid cell proliferation and PTH synthesis⁽¹²⁾ has made calcitriol treatment in patients with renal failure the therapy of choice to revert the 2HPT and normalize PTH levels. However, one of the main problems of treatment with calcitriol is the appearance of hypercalcemic episodes,⁽¹²⁾ which can increase soft tissue calcifications.⁽¹³⁾ Furthermore, it has been shown that vascular smooth muscle cells (VSMCs) have the vitamin D receptor (VDR)⁽¹⁴⁾ and that calcitriol has a direct effect increasing

The authors state that they have no conflicts of interest.

¹Department of Medicine, University of Lleida, Lleida, Spain; ²Research Laboratory, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, Spain; ³These authors share senior authorship.

VSMCs calcification *in vitro*.⁽¹⁴⁾ Therefore, calcitriol treatment may increase vascular calcification in a dual way, indirectly by increasing serum calcium and phosphorus and directly affecting VSMCs phenotypic change.

The search for calcitriol analogs with lesser effect in serum calcium levels and similar effect on PTH release uncovered new therapeutic agents. One of the analogs of calcitriol used to treat 2HPT is the 19-Nor-1,25(OH)₂D₂ (paricalcitol). In previous studies it was shown that paricalcitol was 3 times less effective in suppressing PTH levels but 10 times less potent in increasing calcium absorption in the gut.⁽¹²⁶⁻¹²⁸⁾ Furthermore, a retrospective analysis of renal patients treated either with calcitriol or paricalcitol showed that treatment with paricalcitol was associated with better survival.⁽¹²⁹⁾ The difference, however, seemed to be related to effects beyond the control of systemic levels of calcium and phosphorus. Thus, the advantages of paricalcitol treatment could be related not only to a lower effect on systemic calcium and phosphorus levels, but also to a different effect on VSMCs phenotypic change.

Therefore, in this study, we investigated the effects of calcitriol and paricalcitol in the calcification of VSMC *in vitro* and *in vivo* and investigated whether they are related to its different potency, increasing calcium and phosphorus serum levels.

MATERIALS AND METHODS

All the experiments performed in this study followed the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

In vitro studies

Primary rat aortic VSMCs of Sprague-Dawley rats were obtained as described previously by Rickeding et al.⁽²⁰⁾ and maintained in DMEM containing 10% FBS, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. Cells were incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

Cells obtained by this method were identified as VSMCs by the following criteria: the cells grew in the characteristic hill and valley pattern and by positive immunostaining for monoclonal anti-smooth muscle α -actin.

All the experiments were performed in triplicate. In each experiment, at least eight wells were used per condition.

Analysis of VSMC calcification: To compare the differences in VSMC calcification between calcitriol or paricalcitol treatment, we analyzed the rate of calcium incorporation of cells incubated for 5 days with 1, 10, 100, and 500 nM of calcitriol or paricalcitol. Furthermore, we added 10, 20, and 50 pM of RANKL to the control cells and cells treated with paricalcitol to test the direct effect of the compound on VSMC calcification. Briefly, rat VSMCs were cultured in the growing medium. After confluence, the cells were incubated for 5 days in DMEM (high glucose, 4.5 g/liter) containing 15% FBS and 10 mM sodium pyruvate in the presence of 10 mM β -glycerophosphate (GP) supplemented with 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (calcification media). Quantification of calcium deposits and von Kossa staining were performed as previously described.^(120,22) Briefly, for calcium quantification, cells were washed with PBS, and calcium was extracted with HCl (0.6

N). Cells were transferred to lysis buffer (125 mM Tris, 2% SDS, pH 6.8), and total protein was extracted. Calcium content was determined by the *O*-cresolphthalein complexone method and total protein by the Lowry method (Bio-Rad). For von Kossa staining, cells were soaked in 5% silver nitrate solution, placed under UV light for 15 minutes, incubated in 5% sodium thiosulphate solution for 2 minutes, and washed with water. Tissue was counterstained with H&E.

Analysis of gene expression: Total cellular RNA was extracted from cells incubated for 48 h in calcification media using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN), and reverse transcription was performed with a first-strand DNA synthesis Kit for RT-PCR (Roche Diagnostics). We used the Taqman real-time PCR method. The forward, reverse, and Taqman middle primers for rat RANKL, osteoprotegerin (OPG), and GAPDH were purchased from Applied Biosystems. Each real-time PCR reaction was performed using 0.5 µg total RNA. For reverse transcription, a 1-h period at 42°C was run before inactivating the reverse transcriptase at 99°C for 10 min. Forty cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min were performed with an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). All experiments were carried out three times; triplicate readings were taken, and the average was calculated. The relative RNA amount was calculated by standard formulae. Average and SE from three experiments were calculated.

Analysis of protein content: Levels of RANKL and OPG were determined in culture media supernatants of control cells and cells treated with calcitriol and paricalcitol with commercially available ELISAs (Biomedica, Vienna, Austria).

In vivo studies

Sprague-Dawley rats (200–225 g) were anesthetized with isoflurane, and right nephrectomy was performed. After 1 wk, animals suffered two-thirds nephrectomy in the left kidney by ligation of both poles as previously described.⁽²²⁾ Animals with five-sixths nephrectomy were divided into three groups. One group received calcitriol (1 µg/kg, three times a week for 8 wk, $n = 9$), another group received paricalcitol (3 µg/kg, three times a week for 8 wk, $n = 9$), and the third group received a vehicle injection ($n = 9$). During the last week, systolic (SAP) and diastolic arterial pressures (DAP) were measured by the tail-cuff method (LSI Letica, Barcelona, Spain). At death, a blood sample was extracted and blood biochemistry data were obtained. After death, abdominal aortas were collected and divided in two. One part was fixed, included in paraffin and sliced, and the other part was used to determine total calcium content.

Analysis of aortic calcification: To study the changes in the aortas, we performed von Kossa staining in aortic slices. After capturing the images with a digital microscope (LEICA Microsystems), histomorphometric studies were performed. We determined the area of the media and the calcified area with image analysis software (Leica IM50 Image Manager). As a second approach, aortas were washed with saline and homogenized in HCl (0.6 N). After centrifugation, the debris was transferred to lysis buffer (125 mM

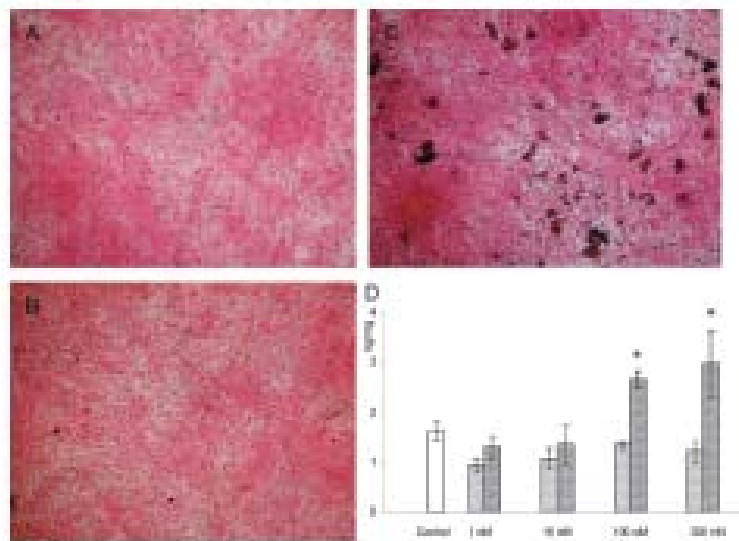


FIG. 1. Effect of in vitro incubation of rat VSMCs with calcitriol (100 nM) or paricalcitol (100 nM) on calcification. Representative photographs of van Kossa staining of (A) control cells, (B) cells incubated with paricalcitol, or (C) cells incubated with calcitriol. (D) Quantification of calcium incorporation in VSMCs incubated with constant concentrations of calcitriol (dashed bars) and paricalcitol (dotted bars). Data are nanograms of calcium per milligram of protein. Data are means \pm SE. * $p < 0.01$ vs. control.

Tris, 2% SDS, pH 6.8), and total protein was extracted. Calcium content was determined in the HCl solution by the *O*-cresolphthalein complexone method and total protein by the Lowry method (Bio-Rad).

Biochemistry data: Blood obtained at the end of the experiment was analyzed for calcium, phosphate, and PTH. Serum biochemistry was analyzed using a multichannel autoanalyzer (Roche/Hitachi Modular Analytics), using the following methods: for calcium, the *O*-cresolphthalein complexone method; for phosphate, the ammonium molybdate method. Serum iPTH levels were analyzed by ELISA (Immutopic).

Statistical analysis: Differences between groups were assessed by ANOVA followed by a Dunnett posthoc test. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Effects of calcitriol and paricalcitol on VSMC calcification in vitro

In Fig. 1, we show the effect of calcitriol and paricalcitol on rat VSMC calcification. Calcitriol (Figs. 1C and 1D) induced a significant increase in calcium incorporation in the cells at 100 and 300 nM compared with cells incubated only in the calcification media (Figs. 1A and 1D). Paricalcitol (Figs. 1B and 1D) did not have a statistically significant effect on calcium content in rat VSMCs. Addition of RANKL to the control cells or cells incubated with paricalcitol did not significantly change the calcification level (data not shown).

Effects of calcitriol and paricalcitol on RANKL and OPG expression by VSMCs in vitro

In Fig. 2, we show the effect of calcitriol and paricalcitol in VSMC mRNA expression of RANKL and OPG when incubated in calcification media. Calcitriol increased the mRNA for RANKL more than five times (Fig. 2A). In

contrast, paricalcitol only increased RANKL expression about two times. OPG levels did not change with any of the treatments. Thus, the RANKL/OPG ratio increased only with the calcitriol treatment (Fig. 2C). Protein levels followed the mRNA tendency (Figs. 2B and 2D).

Effects of treatment with calcitriol or paricalcitol on aortic calcification in vivo

In Fig. 3, we show the effects of the different in vivo treatments on aortic calcification. Treatment with calcitriol dramatically increased the calcified areas (Figs. 3C and 3D) and total calcium content (Fig. 3E) in the abdominal aorta. Calcification of the medial area of the artery was only seen sporadically (arrows) in rats treated with paricalcitol (Figs. 3B, 3D, and 3E).

Effects of treatment with calcitriol or paricalcitol on blood pressure

Treatments at both doses increased SBP significantly. However, only treatment with paricalcitol increased DBP significantly (Fig. 4A). This led to a significant increase in pulse pressure only in the group of animals treated with calcitriol (Fig. 4B).

Effects of treatment with calcitriol or paricalcitol on serum calcium and phosphorus

As shown in Fig. 5A, both treatments significantly increased calcium levels. No differences were observed among the calcium levels in both treatments. The product $\text{Ca} \times \text{PO}_4$ followed a similar pattern (Fig. 5C). Phosphorus level increased also in both groups, but the rise did not reach statistical significance (Fig. 5B).

Effects of treatment with calcitriol or paricalcitol on PTH levels

Both treatments, at the doses used, decreased PTH levels to the same extent (Fig. 5D).

VITAMIN D ANALOGS AND THE VASCULATURE

863

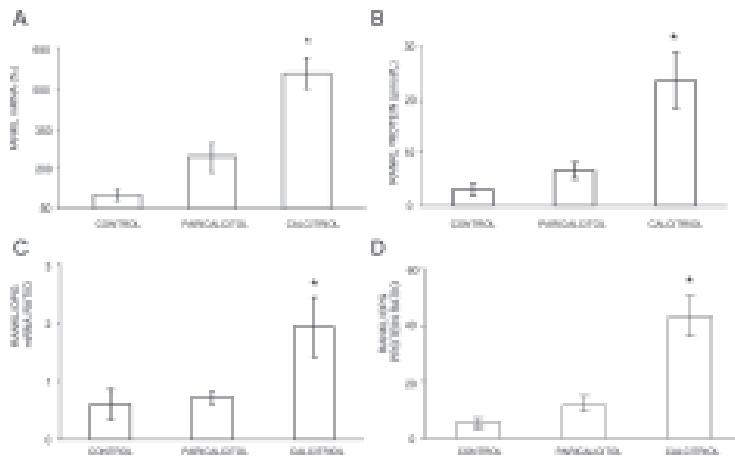


FIG. 2. Effect of *in vitro* incubation of rat VSMCs with calcitriol (100 nM) or paricalcitol (100 nM) on RANKL and OPG expression. (A) RANKL mRNA measured by real-time PCR. Data are percentage over basal values. (B) Levels of RANKL protein secreted in the culture media. (C) RANKL/OPG mRNA ratio. (D) RANKL/OPG protein ratio. Data are mean \pm SE. * $p < 0.01$ vs. control.

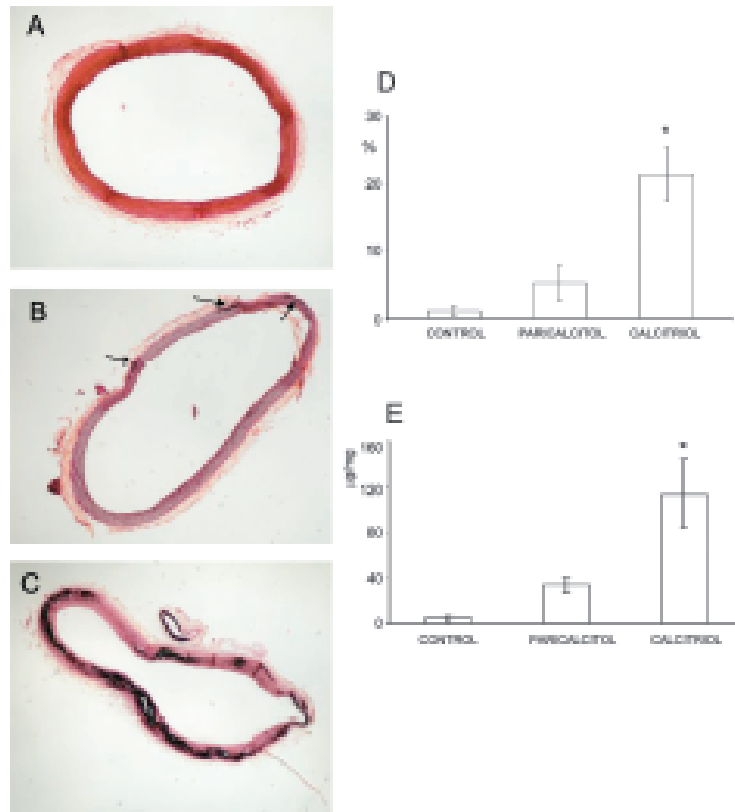


FIG. 3. Effect of the *in vivo* treatment of five-sixths nephrectomized rats with calcitriol (1 μ g/kg, three times a week for 8 wk) or paricalcitol (3 μ g/kg, three times a week for 8 wk) on aortic calcification. Representative photographs of von Kossa staining of (A) control animals, (B) animals treated with paricalcitol, or (C) animals treated with calcitriol. (D) Quantification of calcified areas in the aorta. Data are percentage of the media presenting calcification. (E) Quantification of calcium in the aorta. Data are micrograms of calcium per milligram of protein. Data are mean \pm SE. * $p < 0.01$ vs. control.

DISCUSSION

This is the first report comparing the *in vitro* and *in vivo* effects of calcitriol and a noncalcemic analog (paricalcitol) in VSMC calcification. We showed a differential effect of both compounds in vascular calcification *in vivo*. Both treatments were equally efficient in suppressing the increase in PTH secretion induced by the five-sixths nephrec-

to-my, so a potential effect of PTH levels in vascular calcification is not likely. To rule out the effect of high calcium and phosphorus levels in the *in vivo* calcification process, we deliberately chose a hypercalcemic dose of paricalcitol and the clinically comparable dose of calcitriol (following the 1:3 ratio used in the clinical settings). Thus, after 8 wk of treatment, animals treated either with calcitriol or paricalcitol showed similar levels of serum calcium, phosphorus,

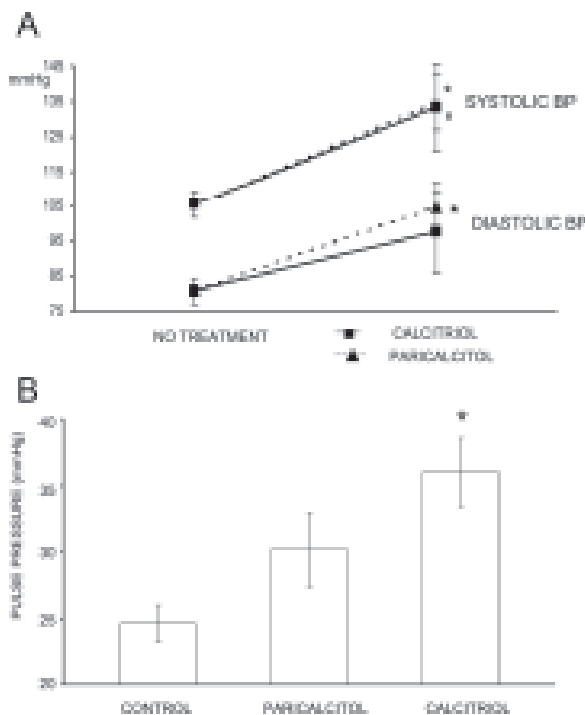


FIG. 4. Evolution of blood pressure in five-sixths animals treated with calcitriol (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, three times a week for 8 wk) or paricalcitol (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, three times a week for 8 wk). (A) Effect of treatment in systolic and diastolic blood pressure. On the left, we present the values of untreated five-sixths nephrectomized animals at the end of the study. On the right, we present values for animals treated with calcitriol (solid lines) or paricalcitol (dotted lines). * $p < 0.01$ vs. no treatment. # $p < 0.05$ vs. no treatment. (B) Effect of treatment with calcitriol or paricalcitol on pulse pressure on five-sixths nephrectomized animals. Data are mean \pm SE. * $p < 0.01$ vs. no treatment (A) or control (B). # $p < 0.05$ vs. no treatment.

and calcium-phosphorus product. However, the effect on vascular calcification was different. Whereas animals treated with paricalcitol showed little aortic calcification, calcitriol-treated animals had extensive medial calcification in their aortas, pointing to an effect on vascular calcification independent of the capacity of both compounds for increasing serum calcium and phosphorus. It has been described that increases in serum calcium-phosphorus product induce aortic calcification in uremic patients.⁽²²⁾ Therefore, the increase in calcium-phosphorus product in the animals treated with paricalcitol could be responsible for the small calcified areas observed. However, animals treated with calcitriol that reached similar levels of calcium-phosphorus product had a significantly more extensive aortic calcification. These results agree with those of Wu-Wong et al.⁽²⁴⁾ when comparing paricalcitol with 1 α -hydroxyvitamin-D₃. In that paper, Wu-Wong et al.⁽²⁴⁾ showed that, at similar increases of serum calcium and phosphorus, the effects of both compounds in calcification were different. Furthermore, this effect on calcification by calcitriol has been also reported with nonhypercalcemic doses of calcitriol.⁽²⁰⁾

Therefore, the effect of calcitriol inducing vascular calcification seems to be direct and independent of serum calcium levels.

This disparity in the in vivo effect could be partially explained by the different effect we observed in the VSMCs calcification in vitro. In our experimental settings, calcitriol induced an increase in VSMCs calcification in cells incubated in calcification media starting at 100 nM. These results are in agreement with those of Jono et al.⁽²³⁾ who first showed a direct effect of calcitriol increasing VSMCs calcification. The direct in vitro effect of calcitriol increasing the calcium content in rat VSMCs is absent in cells treated with paricalcitol, even at concentrations three times higher than those of calcitriol. In this case, the levels of calcium incorporation did not increase compared with the control cells incubated only in calcification media. It is now been accepted that vascular calcification is an actively regulated process. In a first step, VSMCs change their phenotype and start exhibiting osteoblastic markers. They start expressing bone-associated proteins leading to mineralization on the extracellular matrix.⁽²⁶⁾ One of the early expressed bone related proteins is RANKL. RANKL is a 316 amino acid protein highly expressed by osteoblast/stromal cells in the trabecular bone, especially in areas undergoing active bone remodeling.⁽²⁷⁻³⁰⁾ It is normally undetectable in normal VSMCs, but its expression increases in calcified arterial lesions.⁽³¹⁻³³⁾ In our experiments, we showed that RANKL expression and secretion to the culture media was significantly increased in the cells incubated with calcitriol, but did not change in cells incubated with paricalcitol. In addition, administration of OPG has been reported to inhibit the vascular calcification induced by warfarin and vitamin D in vivo.⁽³⁴⁾ OPG, a naturally occurring protein related to the TNF family, is a decoy receptor for RANKL and an inhibitor of osteoclast formation.⁽³⁵⁾ OPG-deficient mice exhibit a decrease in total BMD with a high incidence of bone fractures and also exhibit medial calcification of the aorta and renal arteries.^(36,37) In our experiments, levels of OPG did not increase with any of the compounds tested. Overall, the occurrences of vascular calcification with little or no change in OPG and increases in RANKL (in human atherosclerotic or valvular lesions and OPG^{-/-} mice) have led to the proposal that elevated RANKL levels might somehow favor vessel calcification.^(38,39) However, when we add recombinant RANKL to control cells or cells incubated to paricalcitol, the in vitro calcification did not increase. Therefore, in our experimental settings, the increase in RANKL could be parallel to the increase in calcification. Thus, this increase may indicate an increase in RANKL-producing cells and hence, increase in osteoblast-like cells that would be the responsible of the increase in calcification.

An increase in blood pressure after treatment with vitamin D has been previously reported both in animals^(23,40,41) and patients.⁽⁴²⁾ Treatment with both analogs had a significant effect in blood pressure. However, whereas both treatments increased significantly the SBP, the DBP only raised in the paricalcitol-treated group. This led to a significant increase in pulse pressure only in the animals treated with calcitriol. This increase seems similar to the one observed in

VITAMIN D ANALOGS AND THE VASCULATURE

865

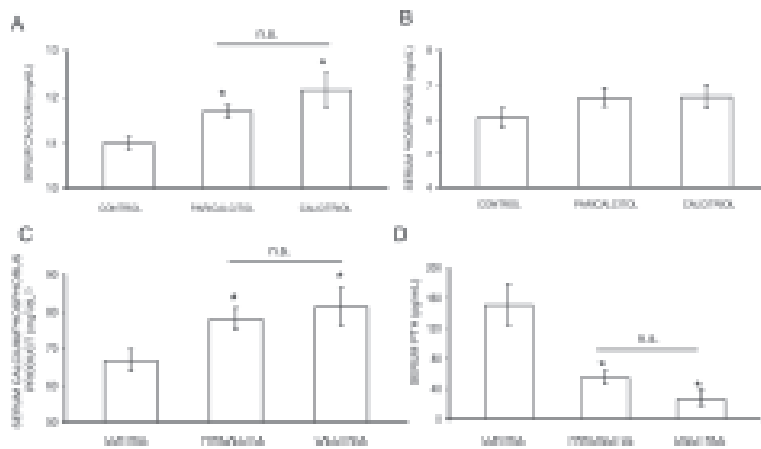


FIG. 5. Effect of the *in vivo* treatment of five-nephx nephrectomized rats with calcitriol (1 μ g/kg, three times a week for 8 wk) or paricalcitol (3 μ g/kg, three times a week for 8 wk) on (A) serum calcium levels, (B) serum phosphorus levels, (C) serum calcium-phosphorus product, and (D) serum iPTH levels. Data are mean \pm SE. * p < 0.01 vs. control. NS, not significant.

aging, in which an increase in pulse pressure is observed, caused by increases in SBP with little changes in DBP. In our study, the increase on pulse pressure can be explained by the stiffness of the artery caused by the calcification process. This increase in pulse pressure could be also a deleterious side effect of the calcitriol treatment, because it has been previously shown that pulse pressure is a strong predictor of cardiovascular and cerebrovascular mortality.^(43,44)

As we stated in the introduction, vitamin D therapy is widely used to treat 2HPT in dialysis patients. The positive effect of vitamin D treatment in hemodialysis patients has been recently shown.⁽⁴⁵⁾ However, as we and others have shown, calcitriol has the potential of increasing vascular calcification. In fact, it has also been shown that, in dialysis patients, treatment with paricalcitol shows even better results in survival.^(13,46) Furthermore, the differential effect seen in the clinical practice seems to be independent of serum calcium and phosphorus levels.⁽⁴⁷⁾

In summary, we showed that calcitriol and paricalcitol have different effects in the calcification of VSMCs. Thus, whereas calcitriol increases calcification of cells *in vitro* and *in vivo*, paricalcitol does not. The different effect on calcification is independent of levels of calcium and phosphate. Thus, calcitriol and paricalcitol have different potencies for calcifying VSMCs. Therefore, extrapolating these results to the clinical settings, treatment with paricalcitol could maintain all the positive effects of vitamin D therapy and avoid some of the downsides. Furthermore, these results may explain, at least in part, the differences in survival observed in the clinical settings. However, more studies in humans are needed to confirm these results and to further delineate the advantages and disadvantages of different vitamin D analogs.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by grants from Ministerio de Ciencia y Tecnología SAF2003-08548, "Fondo de Investigaciones Sanitarias" CPG000055, and "Sociedad Española de Nefrología" PI L00. SP received a Fellowship from the Generalitat de Catalunya.

REFERENCES

- Parfitt AM 1969 Soft-tissue calcification in uremia. *Arch Intern Med* 124:544-548.
- Gastin AP, London GM, Marchais SJ, Metivier F 2000 Arterial stiffening and vascular calcifications in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 15:1014-1021.
- Wilson PW, Knappis LI, O'Donnell CI, Kiel DP, Heinsohn M, Polak DM, Cupples LA 2001 Abdominal aortic calcific deposits are an important predictor of vascular morbidity and mortality. *Circulation* 103:1529-1534.
- Wilmer WA, Magro CM 2002 Calciphylaxis: Emerging concepts in prevention, diagnosis, and treatment. *Semin Dial* 15:172-186.
- Goodman WG, Goldin J, Kulzow BD, Yoon C, Gales E, Sider D, Wang Y, Chung J, Emerick A, Gossner L, Elmhoff RM, Slatopolsky EB 2000 Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med* 342:1478-1483.
- Block GA, Port FK 2000 Re-evaluation of risks associated with hyperphosphatemia and hyperparathyroidism in dialysis patients: Recommendations for a change in management. *Am J Kidney Dis* 35:1226-1237.
- Goldsmith DJA, Cowie A, Sembrock PA, Azkell P 1997 Vascular calcification in long-term haemodialysis patients in a single unit: A retrospective analysis. *Nephron* 77:37-43.
- Milliner DS, Zinsmeister AR, Lieberman E, Landing B 1990 Soft-Tissue Calcification in Pediatric Patients with End-Stage Renal Disease. *Kidney Int* 38:931-936.
- Marco MP, Crowe L, Botto A, Belati M, Filla J, Fernandez E 2003 Higher impact of mineral metabolism on cardiovascular mortality in a European hemodialysis population. *Kidney Int* 63:S111-S114.
- Bocora AJ, Duno A, Slatopolsky E 1999 Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 277:F157-F175.
- Slatopolsky E, Brown A, Duno A 1999 Pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* 56:S14-S19.
- Andres DL 2005 Vitamin D treatment in chronic kidney disease. *Semin Dial* 18:315-321.
- Qunibi WY, Nolas CA, Ayus JC 2002 Cardiovascular calcification in patients with end-stage renal disease: A century-old phenomenon. *Kidney Int* 62:575-580.
- Kawachi H 1987 Receptor for 1,25-dihydroxyvitamin-D in a vascular smooth-muscle cell-line derived from rat aorta. *Biochem Biophys Res Commun* 146:1-6.
- Jono S, Nishizawa Y, Shiou A, Morii H 1998 1,25-dihydroxyvitamin D-3 increases *in vitro* vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide. *Circulation* 98:1302-1306.

16. Linch F, Yadd M 2001 Paricalcitol in dialysis patients with calcitriol-resistant secondary hyperparathyroidism. *Am J Kidney Dis* 38:545-550.
17. Martín KJ, Gonzalez EA, Gallens ME, Hanna LL, Abboud H, Lindberg J 1998 Therapy of secondary hyperparathyroidism with 19-nor-1,25-dihydroxyvitamin D-3. *Am J Kidney Dis* 32:561-566.
18. Finch JL, Brown AJ, Slatopolsky E 1999 Differential effects of 1,25-dihydroxy-vitamin D-3 and 19-nor-1,25-dihydroxy-vitamin D-2 on calcium and phosphorus reorption in bone. *J Am Soc Nephrol* 10:980-985.
19. Teng M, Wolf M, Laverie E, O'Riordan N, Lazarus JM, Thadhani R 2003 Survival of patients undergoing hemodialysis with paricalcitol or calcitriol therapy. *N Engl J Med* 349:446-456.
20. Pickering KL, Wale L, Rosenfield K, Sorez J, Jankowski J, Isner JM 1992 Smooth-muscle cell outgrowth from human atherosclerotic plaque: Implications for the assessment of lesion biology. *J Am Coll Cardiol* 20:1430-1439.
21. Qi YF, Wang SH, Zhang BH, Bu DF, Shu TC, Du JB 2003 Changes in amount of ADM mRNA and RAMP2 mRNA in calcified vascular smooth muscle cells. *Peptides* 24:287-294.
22. Pérez-Ruiz L, Ros-Lopez S, Cardús A, Fernández E, Valdviéso JM 2006 A forgotten method to induce experimental chronic renal failure in the rat by ligation of the renal parenchyma. *Nephron* 103:126-130.
23. Block GA, Hulbert-Sanzon TE, Levin NW, Port FK 1998 Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: A national study. *Am J Kidney Dis* 31:607-617.
24. Wu-Wong JR, Neenan W, Ma JL, Dixon D, Nakase M, Bolin AL, Koch KA, Paul S, Morgan SJ, Reinhart GA 2006 Role of phosphorus and vitamin D analogs in the pathogenesis of vascular calcification. *J Pharmacol Exp Ther* 318:95-98.
25. Häfner D, Hoehner B, Müller D, Simon K, König K, Richter CM, Eggert B, Schwarz J, Godes M, Nitsch R, Quasfeld U 2005 Systemic cardiovascular disease in uremic rats induced by 1,25(OH)₂D-3. *J Hypertens* 23:1067-1075.
26. Jono S, Sasaki A, Izumi Y, Nishizawa Y 2006 Vascular calcification in chronic kidney disease. *J Bone Miner Metab* 24:176-181.
27. Hofbauer LC, Hausfeldt AE 2001 Role of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Muske Med* 79:243-253.
28. Hofbauer LC, Schoppet M 2004 Clinical implications of the osteoprotegerin/RANK-L/RANK system for bone and vascular disease. *JAMA* 292:490-495.
29. Sessler AM, Schoppet M, Schaefer JR, Hofbauer LC 2004 Novel aspects on RANK ligand and osteoprotegerin in osteoporosis and vascular disease. *Calcif Tissue Int* 74:103-106.
30. Walsh MC, Choi YW 2003 Biology of the TRANCE axis. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:251-263.
31. Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC 2002 RANK ligand and osteoprotegerin: Potential regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:540-553.
32. Schoppet M, Al Fakih N, Franke FE, Katz N, Barth PI, Mallick B, Preissner KT, Hofbauer LC 2004 Localization of osteoprotegerin, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand in Monckeberg's sclerosis and atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab* 89:4104-4112.
33. Dhoot CR, Clautjens JFM, Lutgens E, Clautjens KBJM, Gommers PFM, Kintanar PJEH, Toeslab JHM, Spronk HMH, Vermeer C, Dassen MJAP 2001 Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1998-2003.
34. Price PA, Jans HH, Buckley JR, Williamson MK 2001 Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1610-1616.
35. O'Brien EA, Williams JHH, Marshall MJ 2000 Osteoprotegerin ligand regulates osteoclast adhesion to the bone surface in mouse calvaria. *Biochem Biophys Res Commun* 274:281-290.
36. Bucay N, Szenci I, Dunstan CR, Morony S, Tappley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu WL, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS 1998 Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 12:1260-1268.
37. Schinke T, Karsenty G 2000 Vascular calcification—a passive process in need of inhibitors. *Nephrol Dial Transplant* 15:1272-1274.
38. Min H, Morony S, Szenci I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, Van G, Kaufman S, Kozlowski PJ, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS 2000 Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J Exp Med* 192:463-474.
39. Kaden J, Bickelhaup S, Grobholz R, Haase KK, Sarrico A, Kille R, Bruckmann M, Lung S, Zahn I, Vahl C, Hagl S, Dempfle CE, Bergmann M 2004 Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *J Mol Cell Cardiol* 36:57-66.
40. Bukoski RD, Li JY, Bo J 1993 Effect of long-term administration of 1,25(OH)₂ vitamin-D(3) on blood-pressure and histamine artery contractility in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens* 6:944-950.
41. Bukoski RD, Xue H 1993 On the vascular inotropic action of 1,25(OH)₂ vitamin-D(3). *Am J Hypertens* 6:388-396.
42. Jaspersen B, Rendley A, Abrahamsen J, Fogh-Andersen N, Olsen NV, Kanstrup IL 1998 Acute cardiovascular effect of 1,25-dihydroxycholecalciferol in essential hypertension. *Am J Hypertens* 11:659-666.
43. Mirza A, Pessina AC, Gianfranceschi P, Tikhonoff V, Peral A, Caviglia E 2001 Pulse pressure: An independent predictor of coronary and stroke mortality in elderly females from the general population. *Blood Press* 10:205-211.
44. Fang J, Madhavan S, Alderman MH 2000 Pulse pressure: A predictor of cardiovascular mortality among young non-smoking subjects. *Blood Press* 9:260-266.
45. Teng M, Wolf M, O'Riordan N, Lazarus JM, Herman MA, Camargo CA Jr, Thadhani R 2005 Activated injectable vitamin D and hemodialysis survival: A historical cohort study. *J Am Soc Nephrol* 16:1115-1125.
46. Dobras DG, Mathias A, Amdahl M, Marx SE, Mallick JZ, Sprague SM 2004 Paricalcitol-treated patients experience improved hospitalization outcomes compared with calcitriol-treated patients in real-world clinical settings. *Nephrol Dial Transplant* 19:1174-1181.

Address reprint requests to:

Jose M Valdviéso, PhD

Laboratorio de Investigación

HECV-UDE

Hospital Universitario Arnao de Vilanova

Rovira Roure 80

25198 Llívia, Spain

E-mail: Valdviéso@medicina.udel.es

Received in original form September 27, 2006; revised form February 5, 2007; accepted March 5, 2007.

ARTÍCULO 2: RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway.

RANKL aumenta la calcificación de las células de músculo liso vascular a través de la vía RANK-BMP4.

Introducción: La calcificación vascular es un proceso que se asocia frecuentemente con diversas patologías como la enfermedad renal crónica (ERC). Es un proceso activo y regulado de manera semejante a la mineralización y metabolismo del hueso, en el se encuentran implicadas diversas proteínas óseas. El eje RANK-RANKL-OPG (receptor activador del factor nuclear κ B - ligando de RANK - osteoprotegerina) controla estrechamente el recambio óseo. RANKL se expresa principalmente en osteoblastos y sus precursores. Activa a su receptor RANK en los precursores osteoclasticos, permitiendo su activación, maduración y supervivencia. El paso final de la activación de RANK es la translocación al núcleo del factor nuclear κ B (NF- κ B), que tiene lugar tanto por la vía canónica (regulada por IKK β) como por la alternativa (controlada por IKK α). OPG es un receptor soluble señuelo de RANKL que impide su unión al receptor RANK. RANKL ha sido sugerido por diversos autores como molécula responsable del incremento de la calcificación vascular, basándose en observaciones indirectas, sin que existan hasta el momento pruebas directas de ello. Por este motivo, en este trabajo, evaluamos el efecto de RANKL sobre la calcificación células de músculo liso vascular (CMLV).

Materiales y métodos: Utilizamos CMLV procedentes de aorta de rata para determinar la calcificación producida por RANKL *in vitro*. Se coincubaron con OPG y se silenciaron, mediante sh RNA, diferentes puntos de la señalización desencadenada por RANKL (RANK, IKK β e IKK α), para dilucidar el mecanismo por el que RANKL induce calcificación vascular. Analizamos la expresión de *Bone morphogenic protein 4* (BMP4) en las diferentes condiciones. Como modelo *in vivo* empleamos ratas sometidas a nefrectomía subtotal, con y sin tratamiento con Calcitriol en las que se determinó y localizó en las arterias la calcificación vascular y la expresión de RANKL, OPG y BMP4. También se analizaron los niveles séricos de RANKL y OPG.

Resultados: Las CMLV incubadas con RANKL muestran un aumento dosis dependiente de la calcificación, que es suprimido al coincubar OPG. Para probar si el

efecto en la calcificación es mediado por la unión de RANKL a su receptor RANK, silenciamos RANK en las CMLV. Las células que carecen de RANK no muestran aumentos en la calcificación vascular cuando se incuban con RANKL. Para conocer el mecanismo por el cual la unión de RANKL a RANK desencadena la calcificación de las CMLV, silenciamos las quinasas que regulan tanto la vía canónica ($IKK\beta$) como la alternativa ($IKK\alpha$) de NF- κ B. Sólo la inactivación de $IKK\alpha$ inhibe la calcificación, señalando la implicación de la vía alternativa. Por otra parte, la incubación con RANKL aumenta la expresión de BMP4 en las CMLV; este incremento no se produce en las CMLV que tienen silenciado RANK o $IKK\alpha$. Además, el aumento en la calcificación provocado por RANKL, también desaparece al adicionar al medio de cultivo nogina (un inhibidor de las BMPs), apuntando a BMP4 como mediador en la calcificación inducida por RANKL.

En el modelo in vivo, el incremento en el contenido de calcio en las aortas es paralelo al aumento en la expresión de RANKL y de BMP4, que además se localizan en las áreas calcificadas. Sin embargo, no se observan variaciones significativas en los niveles circulante del ratio RANKL / OPG.

Conclusiones: RANKL aumenta la calcificación de las células de músculo liso vascular a través de la unión a su receptor RANK y el aumento de BMP4 a través de la activación de la vía alternativa de NF- κ B.

Molecular Medicine

RANKL Increases Vascular Smooth Muscle Cell Calcification Through a RANK-BMP4-Dependent Pathway

Sara Panizo, Anna Cardus, Mario Encinas, Eva Parisi, Petya Valcheva, Susana López-Ongil, Blai Coll, Elvira Fernandez,* Jose M. Valdivielso*

Abstract—Vascular calcification commonly associated with several pathologies and it has been suggested to be similar to bone mineralization. The axis RANKL-OPG (receptor activator of nuclear factor κ B ligand-osteoprotegerin) finely controls bone turnover. RANKL has been suggested to increase vascular calcification, but direct evidence is missing. Thus, in the present work, we assess the effect of RANKL in vascular smooth muscle cell (VSMC) calcification. VSMCs incubated with RANKL showed a dose-dependent increase in calcification, which was abolished by coincubation with OPG. To test whether the effect was mediated by signaling to its receptor, knockdown of RANK was accomplished by short hairpin (sh)RNA. Indeed, cells lacking RANK showed no increases in vascular calcification when incubated with RANKL. To further elucidate the mechanism by which RANK activation increases calcification, we blocked both nuclear factor (NF)- κ B activation pathways. Only IKK α inactivation inhibited calcification, pointing to an involvement of the alternative NF- κ B activation pathway. Furthermore, RANKL addition increased bone morphogenetic protein (BMP)4 expression in VSMCs, and that increase disappeared in cells lacking RANK or IKK α . The increase in calcification was also blunted by Noggin, pointing to a mediation of BMP4 in the calcification induced by RANKL. Furthermore, in an *in vivo* model, the increase in vascular calcium content was parallel to an increase in RANKL and BMP4 expression, which was localized in calcified areas. However, blood levels of the ratio RANKL/OPG did not change. We conclude that RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification by binding to RANK and increasing BMP4 production through activation of the alternative NF- κ B pathway. (*Circ Res*. 2009;104:1041-1048.)

Key Words: vascular calcification ■ RANKL ■ BMP4 ■ NF- κ B

Vascular calcification is a well recognized and common complication of a variety of pathological conditions like chronic kidney disease (CKD), diabetes mellitus, and atherosclerosis.¹ There are 2 main types of vascular calcification, depending on whether the calcium deposits are located in the intima or in the medial layer.² Intimal calcification is found in atherosclerotic plaques and is associated with a higher likelihood of adverse events such as myocardial infarction and coronary death.³ Atherosclerotic disease involves a complex interplay among several factors like inflammation, thrombosis, and lipid metabolism and different cell types such as endothelial cells, vascular smooth muscle cells (VSMCs), and macrophages. Medial calcification is usually associated with age and CKD patients. Medial calcification generates increased vascular stiffness and reduced vascular compliance, which are associated with increases in systolic blood pressure, pulse pressure, and pulse wave velocity. All of these complications lead to altered coronary perfusion and left ventricular hypertrophy.⁴ Furthermore, medial calcification

of skin arterioles causes calciphylaxis, which is associated with thrombotic cutaneous ischemia, necrotic skin ulceration, and a high mortality rate. In this case, the main cell type involved is the VSMCs.

In the past, arterial calcification was regarded as a passive process. Thus, increases in calcium and phosphate levels over its solubility threshold would induce calcium mineral deposition in soft tissues. Nevertheless, accumulating evidence suggest that arterial calcification is the result of organized and regulated processes similar to bone formation.⁵ Bone remodeling is a lifelong coordinated process of bone formation and resorption that renews and adapts the skeleton.⁶ Thus, the balance between bone resorption and formation is finely regulated, and imbalances on one side or the other can cause bone disease. The regulation of that balance is achieved by a combination of hormones and the local cytokine milieu within the bone microenvironment.⁷ Among the hormones that regulate bone remodeling, the discovery of the RANK-RANKL-OPG system (receptor activator of nuclear factor κ B

Original received October 7, 2008; revision received March 16, 2009; accepted March 17, 2009.

From the Department of Medicine (S.P., A.C., E.P., P.V.), University of Lleida; Research Laboratory (S.P., A.C., M.E., E.P., P.V., J.M.V.), Hospital Universitari Arnau de Vilanova; Research Unit and Nephrology Section (S.L.-O.), Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Madrid; and Unitat de Diagnòstic i Tractament de Malalties Ateroescleròtiques (UBETMA) (B.C., E.F., J.M.V.), Nephrology Department, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRBILLEIDA), Spain.

*Both authors contributed equally as senior authors of this work.

Correspondence to Dr Jose M. Valdivielso, Laboratorio de Investigación HUAY-LDL, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Rovira Rossa 80, 25198 Lleida, Spain. E-mail: Valdivielso@medicina.udl.es

© 2009 American Heart Association, Inc.

Circulation Research is available at <http://circres.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.189001

[RANK]–RANK ligand–osteoprotegerin) provided a major breakthrough on the understanding of bone remodeling mechanisms.

RANKL is a member of the tumor necrosis factor superfamily and is expressed mainly by osteoblasts and its immature precursors.⁴ RANKL activates its receptor (RANK), which is expressed in osteoclasts and its precursors, promoting osteoclast formation and activation and prolonging osteoclast survival by suppressing apoptosis.⁵ The final step in RANK activation is the nuclear translocation of nuclear factor ($\text{NF-}\kappa\text{B}$), which is controlled by 2 main pathways, the classic and the alternative $\text{NF-}\kappa\text{B}$ pathways, which are also controlled by different kinases (IKK β and IKK α , respectively). OPG is a decoy receptor for RANKL, which directly counters all the RANKL-mediated actions.¹⁰ Thus, the RANKL/OPG ratio is critical to determining bone remodeling and bone mass, and imbalances in this ratio or in RANK signaling underlie the pathology of many disorders exhibiting excessive bone loss.^{11,12} In fact, vascular calcification is associated with osteoporotic bone loss, but the reasons for this are unclear. The discovery that mice lacking OPG had severe osteoporosis and arterial calcification provided the first clue that the OPG–RANK–RANKL axis could be an important autocrine/paracrine axis on vascular calcification.¹³ Furthermore, the fact that RANKL expression increases in calcified arterial tissue^{13,14} added new evidence to a possible role of RANKL on vascular calcification. However, direct evidence of a role of RANKL on vascular calcification is missing. In the present work, we analyze the role of RANKL in vascular calcification *in vitro* and in an *in vivo* model of vascular calcification.

Materials and Methods

All the experiments performed in this study followed the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

In Vitro Studies

Cell Cultures

Primary rat aortic VSMCs of Sprague–Dawley rats were obtained as described previously¹⁵ and maintained in DMEM (GIBCO) containing 10% FBS.

Cells were plated (10^5 cells/plate) in 100-mm plates. When the cell confluence was $\approx 80\%$, VSMCs were shifted to calcification media, DMEM containing 15% FBS, 10 mmol/L sodium pyruvate, and 10 mmol/L β -glycerophosphate (Sigma). The effect of RANKL (1, 100, 500, 1000 pmol/L), OPG (100 pmol/L), and noggin (100 pmol/L) (all 3 from Sigma) on the calcification levels was tested.

We used cells between passage 2 and 8. All of the experiments were performed in triplicate. In each experiment, 3 plates were used per condition.

Determination of VSMC Calcification

In all of the calcification experiments, the calcium levels were measured 5 days after the addition of the treatments. First, we measured the rate of calcium incorporation of VSMCs incubated with increasing doses of RANKL. Moreover, we tested the effect of OPG and noggin in the calcification level induced by 100 pmol/L RANKL. Quantification of calcium deposits and von Kossa staining were performed as previously described.¹⁶ Alkaline phosphatase (ALP) activity was determined by the para-nitrophenyl phosphate detection (BioAssay Systems).

Lentiviral Production and Infection

Lentiviral-based vectors for RNA interference-mediated gene silencing (FSV*si*) consisted of a U6 promoter for expression of short hairpin (sh)RNAs and the Venus variant of yellow fluorescent protein under the control of an SV40 promoter for monitoring transduction efficiency. Oligonucleotides to produce shRNA were annealed in buffer (150 mmol/L NaCl; 50 mmol/L Tris, pH 7.6) and cloned into the *Age*I–*Bam*HI sites of FSV*si*. shRNA target sequence to RANK was TTAGCTGAGGATCCTGAGGAT. shRNAs to IKK α and IKK β were a generous gift of Dr X. Delort.¹⁷ Negative controls consisted on scrambled sequences. To produce infective lentiviral particles, 293T cells were cotransfected by the polyethylenimine method with the vector packaging elements (VSV-G and Δ 8.9) and the shRNA-producing vector (FSV*si*–RANK or FSV*si* as a control). 293T cells were allowed to produce lentiviral particles during 3 to 4 days in the same culture media used for VSMCs. Culture media was collected and centrifuged for 5 minutes at 1050g, and the supernatant was added to growing VSMCs overnight. After this period, media were replaced with fresh media, and cells were incubated for 4 additional days to allow endogenous gene knockdown. Western blot and/or real-time PCR were performed to check the gene knockdown.

Real-Time PCR

Total cellular RNA was isolated from VSMC control, RANK knockdown, IKK α and β knockdown, and tissue samples by the TRIzol method. In the *in vitro* experiments, isolation of RNA was performed 48 hours after the addition of treatments. Reverse transcription was performed with the first-strand DNA synthesis kit for RT-PCR (Roche Diagnostics). We used TaqMan real-time PCR amplification with gene-specific primer for RANKL, RANK, OPG, bone morphogenetic protein (BMP)2, or BMP4 (Gene Expression Assays from Applied Biosystems), using rat glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) as a reference with an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). The relative RNA amount was calculated by standard formulae. Average and standard error from 3 experiments were calculated.

Preparation of Nuclear and Cytoplasmic Protein Extracts

VSMCs were treated with 100 pmol/L RANKL for 0, 10, and 30 minutes and 1, 2, and 4 hours. After each time point, VSMCs were washed with cold PBS. Cytoplasmic and nuclear protein fractions were extracted using NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit (Pierce).

Western Blot Analysis

Western blot analysis was performed as described previously,¹⁸ 48 hours after the addition of treatments.¹⁸ After blotting, the membrane was incubated overnight with anti-RANK antibody, anti-active caspase 3 antibody (1:1000; Cell Signaling), anti-IKK α , and anti-IKK β (1:1000; Calbiochem), anti-RELB (1:1000; Santa Cruz Biotechnology), anti-histone 1 (1:500; Santa Cruz Biotechnology), anti-lactic dehydrogenase (1:1000; Rockland), and anti-tubulin (1:10 000 Sigma). Secondary antibody binding was detected with the ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences) and the VersaDoc Imaging system Model 4000 (Bio-Rad).

Enzyme-Link of Immunosorbent Assay

Levels of BMP2, BMP4, RANKL, and OPG were determined in cell culture supernatant, and rat plasma was determined by a commercially available ELISA (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, Minn, and Biomedica, Vienna, Austria).

In Vivo Studies

Experimental Animals

Sprague–Dawley rats (200 to 225 g) underwent S6 nephrectomy by previously described procedures¹⁹ and were divided in 2 groups. One group received calcitriol (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 times a week for 3 weeks; $n=9$), whereas the second group received a vehicle injection ($n=9$). Moreover, 2 more groups of sham-operated rats were used (control, $n=9$; injected with the same dose of calcitriol, $n=9$). At euthanasia,

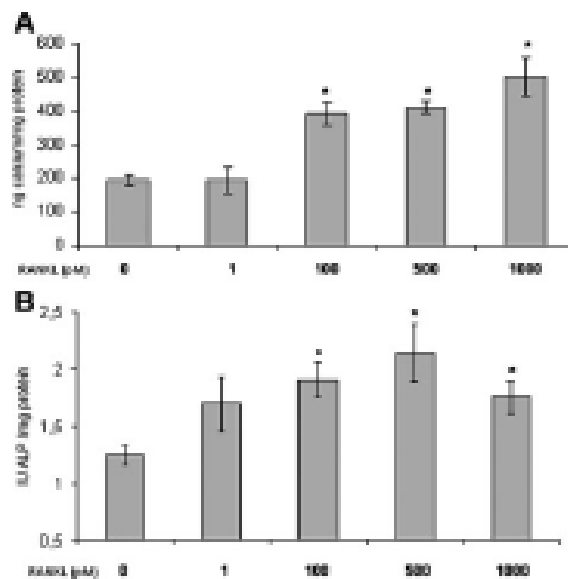


Figure 1. Effect of the incubation of rat VSMCs with increasing doses of RANKL on calcification. **A**, Effect of RANKL on levels of calcium. Data are expressed in nanograms of calcium per milligram of protein. **B**, Effect of RANKL on ALP activity. Data are expressed in international units of ALP per milligram of protein. Data are means \pm SEM. * $P < 0.05$ vs RANKL 0 pmol/L.

a blood sample was extracted and abdominal aortas were collected and divided into 3 pieces. One was fixed, included in paraffin, and sliced; another piece was used to determine calcium content; and the last was used to isolate RNA.

Aortic Calcification

To study the changes in the aortas of the animals, we performed von Kossa staining as described in the section Determination of VSMC Calcification above. Furthermore, we measured total calcium content as described in the same section.

Immunohistochemistry

Sequential slides were used for immunohistochemistry and von Kossa staining as previously described.¹⁸ Sections were incubated in 1:50 anti-RANKL (Imgenex), anti-BMP4 (Abcam), and anti-TRAP (Santa Cruz Biotechnology) polyclonal antibodies or nonimmune serum (negative controls) overnight at 4°C. After washing, the sections were incubated with 1:200 biotinylated secondary antibody and Vectastain ABC and DAB substrate kits (Vector Labs).

Biochemistry Data

Blood obtained at the end of the experiment was analyzed for calcium and phosphate using a mechanical autoanalyzer (Roche Hitachi Modular Analytics).

Statistical Analysis

Differences between groups were assessed by ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

In Figure 1, we show the effect of adding RANKL to VSMCs cultured with calcification media. RANKL increased VSMC calcification measured as VSMC calcium levels (Figure 1A) and ALP activity (Figure 1B) in a dose-dependent manner and starting at concentrations of 100 pmol/L. The calcification induced by RANKL was also visualized by von Kossa

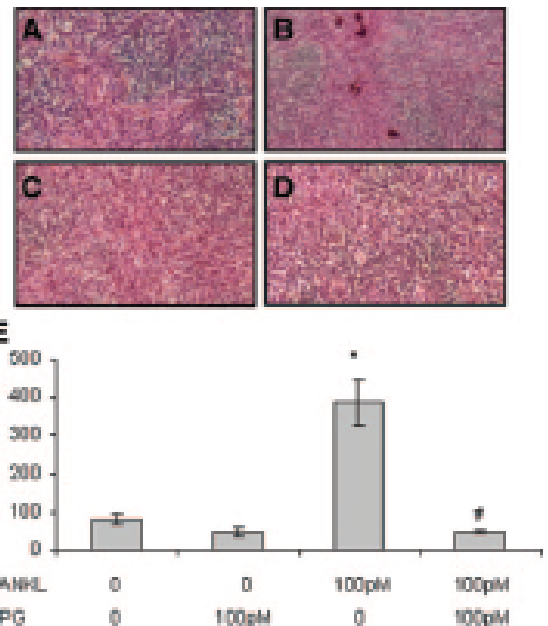


Figure 2. Effect of the incubation of rat VSMCs with RANKL (100 pmol/L) and OPG (100 pmol/L). Representative photographs of von Kossa staining of control cells (**A**), cells incubated with RANKL (**B**), control cells incubated with OPG (**C**), and cells incubated with RANKL and OPG (**D**). **E**, Quantification of calcium incorporation. Data are expressed in nanograms of calcium per milligram of protein. Data are means \pm SEM. * $P < 0.05$ vs RANKL 0 pmol/L, OPG 0 pmol/L; # $P < 0.05$ vs RANKL 100 pmol/L, OPG 0 pmol/L.

staining, as we show in Figure 2B. In this case, we can see that incubation of VSMCs with RANKL increased the brown staining that marks calcified areas.

In Figure 2, we show the effect of coincubation of RANKL with OPG in the calcification of VSMCs. The increase in calcium levels induced by RANKL was inhibited by OPG (Figure 2B, 2D, and 2E).

To determine whether the effect of RANKL was mediated by activation of RANK, we designed shRNA to decrease RANK protein levels. In Figure 3, we can see that levels RANK (Figure 3A) were decreased in the cells infected with FSVsi-RANK. The incubation of those cells with 100 pmol/L RANKL showed that the elimination of RANK blunted the increase in calcification (Figure 3B), suggesting that the effect of RANKL in calcification is mediated by binding to RANK. To determine whether or not part of the effect of OPG was mediated by inhibition of TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand), and thus inhibiting apoptosis, we also checked the effect of RANKL and coincubation of RANKL and OPG on the levels of active caspase 3. Incubation of VSMCs with RANKL or RANKL plus OPG for 48 hours did not modify the levels of active caspase 3 (data not shown). To further elucidate the pathway, we infected cells with shRNA for both kinases involved in the classic and the alternative pathways of NF- κ B activation (Figure 3A). The disruption of the alternative pathway (but not the classic pathway) blunted the increase in calcification (Figure 3B). Accordingly, incubation of VSMCs with

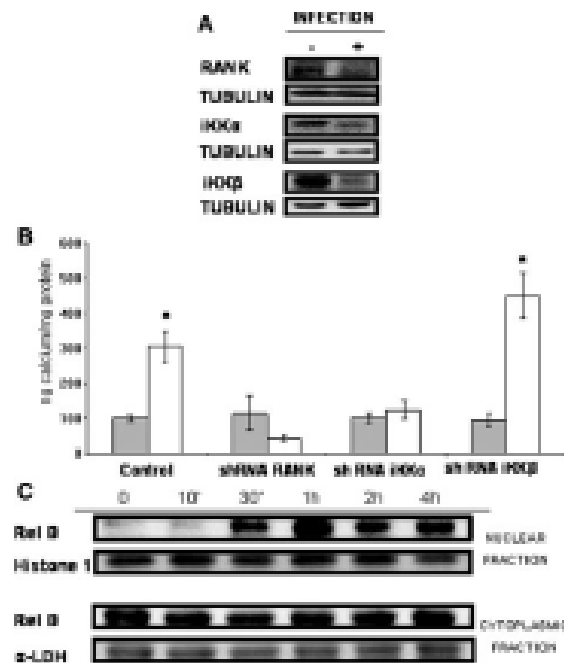


Figure 3. Effect of the knockdown of RANK, IKK α , and IKK β on vascular calcification induced by RANKL. **A**, Protein in control VSMCs and cells infected with shRNA for RANK, IKK α , and IKK β . Tubulin is used as a loading control. **B**, Calcium levels in control VSMCs or cells lacking RANK, IKK α , and IKK β incubated in calcification media (gray bars) or calcification media with 100 pmol/L RANKL (white bars). Data are expressed in nanograms of calcium per milligram of protein. Data are means \pm SEM. * P <0.05 vs control cells incubated in calcification media. **C**, Translocation of RelB to the nucleus. RelB levels were determined by Western blot in nuclear (top) and cytoplasmic (bottom) fractions of VSMCs at different time points after the addition of RANKL. Histone 1 and α -lactic dehydrogenase (α -LDH) were used as loading controls in nuclear and cytoplasmic fractions, respectively.

RANKL increased the nuclear levels of RelB (Figure 3C), confirming the activation of the alternative pathway of NF- κ B activation.

In Figure 4 we show the effect of adding RANKL in the mRNA (Figure 4A) and protein (Figure 4B) levels of BMP4. RANKL increased BMP4 levels in VSMCs. No effect of RANKL on BMP2 levels was detected either by real-time PCR or ELISA (data not shown). Elimination of RANK or IKK α (but not IKK β) blunted the effect of RANKL on BMP4, pointing again to the alternative pathway of activation of NF- κ B as the responsible of the increase in BMP4 induced by RANKL. In Figure 5A and 5B, we show the effect of adding Noggin (a BMP4 inhibitor) in the calcification induced by RANKL. The addition of 100 pmol/L Noggin blunted the increase in calcification induced by RANKL, suggesting that this increase is mediated by a BMP.

Figure 6 shows the results obtained in the *in vivo* model of vascular calcification. Arteries obtained from animals with 5/6 nephrectomy showed a significant increase in vascular calcification, measured as calcium content, which was exacerbated by treatment with calcitriol for 8 weeks (Figure 6A).

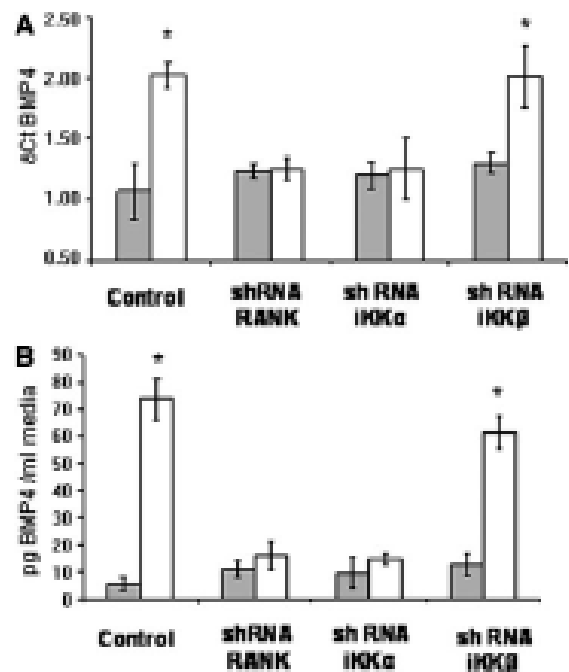


Figure 4. BMP4 expression. **A** and **B**, mRNA (**A**) and protein (**B**) levels of BMP4 in control VSMCs or cells lacking RANK, IKK α , and IKK β incubated in calcification media (gray bars) or calcification media with RANKL (white bars). Data are means \pm SEM. * P <0.05 vs control cells incubated in calcification media.

Blood levels of RANKL were not modified by the treatment but OPG levels increased in uremic animals, leading to a tendency to decrease the RANKL/OPG ratio (Figure 6B). However, vascular expression of RANKL in those animals increased with no changes in OPG (Figure 6C) and was colocalized with the calcified areas (Figure 6E and 6F). In addition, BMP4 expression (Figure 6D) also increased in arteries from uremic rats and uremic rats treated with calcitriol and was immunolocalized in heavily calcified areas (Figure 6E and 6G). No staining for TRAP was detected in areas expressing BMP4 or RANKL (Figure 6H).

Uremia induced a significant increase in serum calcium (Ca) but not in phosphorus (P) levels (control Ca: 10.42 ± 0.24 mg/dL; control P: 5.81 ± 0.24 mg/dL; uremia Ca: 11.02 ± 0.14 mg/dL; uremia P: 6.06 ± 0.27 mg/dL; P <0.01). Administration of vitamin D further increased both calcium and phosphorus levels in uremic animals (uremic+vitamin D Ca: 12.14 ± 0.37 mg/dL; uremic+vitamin D P: 6.68 ± 0.34 mg/dL; P <0.01), whereas treatment of control animals with vitamin D did not change control Ca nor P blood levels (control+vitamin D Ca: 10.78 ± 0.07 mg/dL; control+vitamin D P: 5.7 ± 0.08 mg/dL).

Discussion

To our knowledge, this is the first report showing a direct effect of RANKL increasing VSMC calcification. The possible effect of RANKL on VSMC calcification has been suggested by several authors^{20,21} mainly based on indirect experimental results found in the literature. On the one hand,

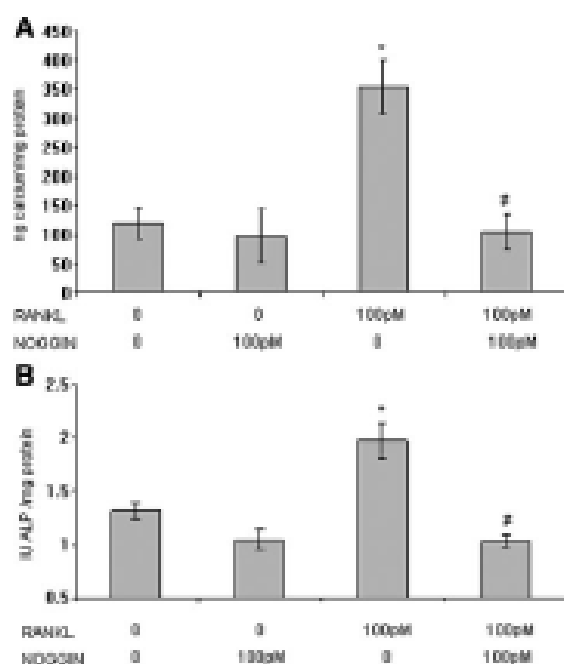


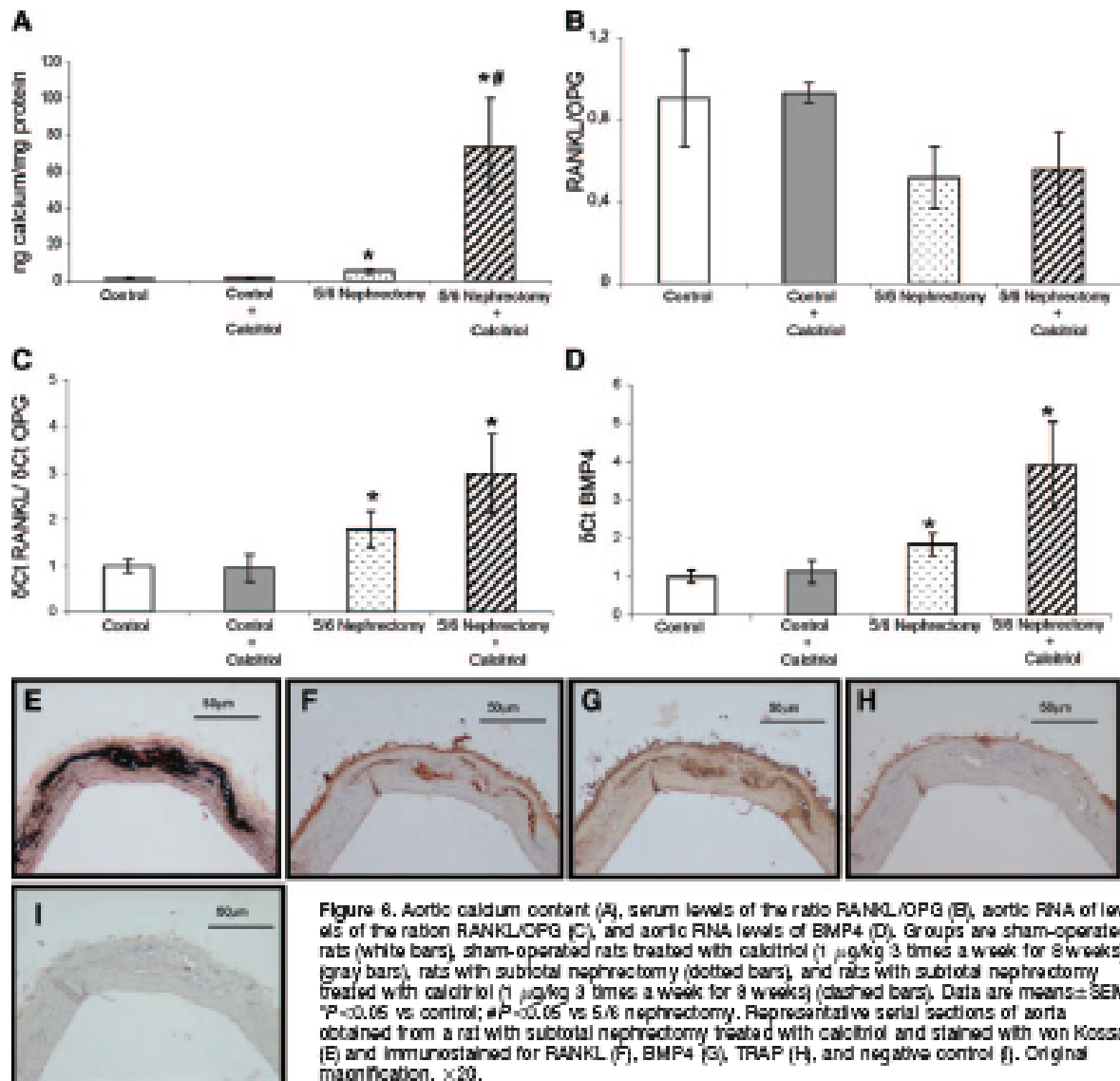
Figure 5. Effect of the incubation of rat VSMCs with RANKL (100 pmol/L) and Noggin (100 pmol/L). **A**, Quantification of calcium incorporation. Data are expressed in nanograms of calcium per milligram of protein. **B**, Effect on ALP activity. Data are expressed in International units of ALP per milligram of protein. Data are means \pm SEM. * $P < 0.05$ vs RANKL 0 pmol/L, Noggin 0 pmol/L; # $P < 0.05$ vs RANKL 100 pmol/L, Noggin 0 pmol/L.

the expression of RANKL increases in calcified areas in arteries from experimental animals and from patients. In the OPG knockout mice, a model that shows osteoporosis and vascular calcification, Min et al¹⁴ showed that RANKL mRNA could be found near the calcified arterial lesions. In addition, the presence of RANKL has been also found in association with extracellular matrix surrounding calcium deposits in human atherosclerotic plaques¹⁵ and in calcified aortic valves.²² On the other hand, the expression of OPG as a transgene on an OPG-null background prevented the appearance of vascular calcification. However, the administration of OPG to adult knockout mice did not inhibit vascular calcification, indicating a possible effect of RANKL in the onset of calcification.¹⁴ Furthermore, Price et al²³ showed that administration of OPG could inhibit the vascular calcification induced by warfarin and vitamin D in experimental animals. A recent report of Mooney et al²⁴ also shows that OPG can inhibit vascular calcification without affecting atherosclerosis in an animal model. Our results show that RANKL added to VSMCs incubated in calcification media increased both calcium content and ALP activity, together with an increase in von Kossa staining. Thus, we have shown a direct effect of RANKL inducing VSMC-mediated matrix mineralization.

The fact that OPG inhibits vascular calcification in experimental models has been attributed in the past to 2 possible mechanisms. One was explained by the fact that OPG inhibits bone resorption, and some authors link an increase in bone resorption with vascular calcification. Thus, it has been

proposed that an imbalance in calcium allocation allows its movement from bone to vascular wall via mechanisms that involve OPG.²⁵ This hypothesis was supported by results that link arterial calcification with diseases with a high bone resorption rate^{22,26} and also because treatments that inhibit bone resorption can inhibit vascular calcification in experimental models.²⁶ However, in patients with chronic renal failure, high levels of OPG seem to be unable to protect against vascular calcification.^{1,27} Nonetheless the significance of those results is limited because of the fact that in those studies, RANKL levels were not measured, and, thus, RANKL/OPG ratios were not determined. The other mechanism is by acting directly on cells in the artery inhibiting the effect of calcification stimulators. OPG is a decoy receptor for RANKL and also for TRAIL.²⁸ VSMCs express both OPG²⁹ and TRAIL.³⁰ The binding of TRAIL to its receptor induced apoptosis, which has also been related to vascular calcification. In vitro models of calcifying VSMCs have shown that a mineral imbalance induces VSMC apoptosis and vesicle release³¹ and that these apoptotic bodies and vesicles form a nidus for the deposition of calcium phosphate.³² Thus, inhibition of TRAIL could inhibit also vascular calcification. However, no direct evidence of apoptosis has been found in models of vascular calcification in which OPG treatment was able to inhibit it.²² There is a third possibility, which is that OPG inhibits vascular calcification by directly inhibiting RANKL. Our results clearly show that cocultivation with OPG inhibits RANKL-induced VSMC calcification. However, it could be hypothesized that incubation with RANKL will increase VSMC calcification by depleting endogenously produced OPG and, thus, leaving TRAIL free to induce apoptosis. Our experimental results show that incubation of VSMC with RANKL did not increase the level of active caspase 3, which is involved in TRAIL-induced apoptosis. Furthermore, we performed experiments in which we inhibited RANK expression by shRNA. In those cells, incubation with RANKL did not increase VSMC calcification, pointing to a direct role of RANKL increasing VSMC calcification by binding to RANK.

The binding of RANKL to its receptor RANK activates both the canonical and the alternative NF- κ B pathways.^{21,33} We further investigated how activation of RANK induced vascular calcification by inhibiting either pathway in the NF- κ B cascade. The results showed that inhibition of the canonical pathway did not affect vascular calcification, whereas the use of shRNA for the main kinase involved in the alternative pathway totally blunted RANKL-induced VSMC calcification. Accordingly, incubation with RANKL induced an increase in nuclear translocation of RelB, proving an activation of the alternative NF- κ B pathway. Furthermore, activation of RANK increased the production of BMP4. BMP4 is a member of the BMP family, a group of signaling molecules that belong to the transforming growth factor β superfamily and were initially identified by their capacity to induce endochondral bone formation.³⁴ In addition, BMP4 has been involved in the osteogenic transition of VSMCs, leading to vascular calcification.³⁵ It has also been described that BMP4 increases in vitro VSMC calcification³⁶ and is upregulated in calcified atherosclerotic lesions.³⁷ Our results



further show that parallel to a decrease in vascular calcification, inhibition of the alternative NF- κ B activation pathway also decreased BMP4. Furthermore, the addition of noggin (a pharmacological inhibitor of the BMPs) to the incubation media also inhibited the RANKL-induced VSMC calcification, suggesting that it is mediated by an increase in BMP4 expression.

We also tested our results in an *in vivo* model of vascular calcification. In that model, subtotally nephrectomized rats were treated with high doses of vitamin D to intensify vascular calcification. This model has been used before, and it has been shown that administration of OPG was able to decrease the vascular calcification.²² The results show that administration of calcitriol to normal animals does not increase either the expression of RANKL/OPG or BMP4 in arteries or in blood. Those animals showed no increases in vascular calcification. In addition, uremia induces an increase in the RANKL/OPG ratio and in BMP4 expression in arteries.

Consistently, the levels of vascular calcification are increased in those animals. The increase in vascular calcification is higher in the uremic animals treated with calcitriol, together with a tendency to increase arterial RANKL and BMP4 expression. This finding suggests that there are other factors that have an effect on the degree of vascular calcification *in vivo* that can be influenced by calcitriol treatment. For instance, uremic animals treated with calcitriol show higher levels of phosphorus in blood, a parameter that has been shown to increase vascular calcification.²² In addition, the expression of RANKL and BMP4 were localized in areas of medial calcification, supporting the role of RANKL in promoting VSMC calcification. The staining for TRAP was negative in those areas and agrees with previous reports suggesting that, contrary to atherosclerotic plaque calcification, in medial calcification macrophage infiltration is not involved.²⁴ The clinical implications of our *in vivo* model to

human pathology are relative, because vitamin D intoxication in uremic patients is currently a rare phenomenon.

We also tested the role of circulating levels of RANKL as a possible marker for vascular calcification in our model. However, whereas the vascular expression of RANKL increased, the circulating levels of RANKL did not change. The association of circulating OPG levels with traditional vascular risk factors has been extensively reported,^{40–42} but the possible use of RANKL levels is still controversial. Scheit et al⁴² showed that serum RANKL levels were not associated with traditional vascular risk factors. In general, serum RANKL levels appear unaltered, although they have sometimes declined as serum OPG levels increased.^{29,33,43} Furthermore, in a recent study, Klechl et al showed in a large scale epidemiological study that serum RANKL levels did not correlate with atherosclerosis, but baseline RANKL levels were shown to be a predictor of vascular risk.⁴⁴ Thus, the role of serum RANKL levels as predictors of cardiovascular risk is unclear. In our experimental model, we have shown that although vascular levels of RANKL are increased, circulating levels did not change. Thus, changes in circulating levels of RANKL could not reflect changes in vascular levels. Furthermore, and in agreement with previous reports, OPG levels increase in all uremic animals, leading to a tendency to decrease the RANKL/OPG ratios. Nevertheless, the importance of these results in the clinical settings needs further investigation.

In summary, we have shown that RANKL is able to induce VSMC calcification *in vitro* by binding to RANK. The activation of RANK will increase BMP4 expression by launching the alternative NF- κ B pathway. These results add new evidence to the role of the OPG-RANK-RANKL system in vascular calcification and confirm RANKL inhibition as a possible target to treat vascular calcification.

Sources of Funding

This work was supported, in part, by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias (grants PI06/0010 and PI07/0427) and REDiREN (16/06). J.M.V. and B.C. hold a contract from the Miguel Servet program. M.E. holds a contract from the Ramon y Cajal program. S.P. and P.V. hold a fellowship from Generalitat de Catalunya.

Disclosures

None.

References

1. Vitekuli E, Towler DA. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;286: E516–E526.
2. London GM, Marchais SJ, Cozzari AP, Meuwier F. Arteriosclerosis, vascular calcifications and cardiovascular disease in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005;14:525–531.
3. Detrano RC, Debuzy TM, Diezler MJ, Slay HC. Predicting coronary events with coronary calcium: pathophysiologic and clinical problems. *Curr Probl Cardiol*. 2000;25:374–402.
4. Blacher J, Cozzari AP, Fumier B, Marchais SJ, London GM. Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension*. 2001;38:938–942.
5. Debuzy TM, Asotra K, Fitzpatrick LA, Qiao JH, Wilkin DJ, Detrano RC, Durston CR, Shah PK, Rajavashish TB. Calcification in atherosclerotic: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:11201–11208.
6. Karsenty G. The complexities of skeletal biology. *Nature*. 2003;423: 318–319.
7. Hofbauer LC, Schoppa M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular disease. *JAMA*. 2004;292: 490–493.
8. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Smith G, Gao J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93:165–176.
9. Hsu HL, Lacey DL, Dunstan CR, Sokoyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimazone G, Bau MB, Boyle WJ. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:3240–3245.
10. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lutz R, Nguyen HQ, Woodan S, Bennett L, Boone T, Shimazone G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Megen L, Hughes TM, Hill D, Patrick W, Campbell S, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997; 89:309–319.
11. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med*. 2001;79:243–253.
12. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu WL, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*. 1998;12:1260–1269.
13. Dixon CR, Chouhan JPM, Liggins E, Chouhan KBM, Gossens PFM, Kishor PNH, Tordok JM, Speck RMH, Verczer C, Dawson MAJ. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21: 1998–2003.
14. Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, Van G, Kaufman S, Kostenuk PJ, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoosteogenesis. *J Exp Med*. 2000;192:463–474.
15. Cardas A, Parisi E, Gallego C, Aldas M, Fernandez E, Valdivieso JM. 1,25-Dihydroxyvitamin D-3 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through a VEGF-mediated pathway. *Kidney Int*. 2006;69: 1377–1384.
16. Cardas A, Panizo S, Parisi E, Fernandez E, Valdivieso JM. Differential effects of vitamin D analogues on vascular calcification. *J Bone Miner Res*. 2007;22:860–866.
17. Dolnik N, Lieber D, Erlicau M, Pillaris J, Cabero A, Schwenkberger JA, Cornella JX, Molino-Gala X. Proteinase inhibitors induce death but activate NF-kappaB on endometrial carcinoma cell line and primary culture explants. *J Biol Chem*. 2006;281:22118–22120.
18. Valdivieso JM, Poveda-Barrioand F, Garcia-Bates J, Lopez-Nevos JM. Role of nitric oxide in the early renal hemodynamic response after unilateral nephrectomy. *Am J Physiol Regul Comp Physiol*. 1999;276: R1718–R1723.
19. Poveda-Rait L, Ros-Lopez S, Cardas A, Fernandez E, Valdivieso JM. A forgotten method to induce experimental chronic renal failure in the rat by ligation of the renal parenchyma. *Nephron Exp Nephrol*. 2006;103: e126–e130.
20. Schoppa M, Feinsner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin - paracrine regulation of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:546–553.
21. Sedor AM, Schoppa M, Schaefer JR, Hofbauer LC. Novel aspects on RANK ligand and osteoprotegerin in osteoporosis and vascular disease. *Calcif Tissue Int*. 2004;74:103–108.
22. Kaden JJ, Bickelhaupl S, Grobholz R, Haase KK, Sattler A, Kille R, Broeckmann M, Laag S, Zahn I, Vahl C, Hagl S, Dempsie CE, Borggrefe M. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;36: 57–66.
23. Price PA, Jara HM, Buckley JR, Williamson MK. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1610–1616.

24. Morony S, Tintal Y, Zhang Z, Calkley RC, Van G, Dwyer D, Solina M, Komaruk FJ, Demer LL. Osteoprotegerin inhibits vascular calcification without affecting atherosclerosis in *Mh(-/-)* mice. *Circulation*. 2006;117:411–420.
25. Hoffauer LC, Schoppa M. Osteoprotegerin: a link between osteoporosis and arterial calcification? *Lancet*. 2001;358:257–259.
26. Price PA, Faux SA, Williamson MK. Bisphosphonate alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:117–124.
27. Niimi K, Akiba T, Uchida K, Otsubo S, Takai T, Yamano W, Kobaya T, Nishi H. Serum osteoprotegerin levels and the extent of vascular calcification in hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19:1885–1889.
28. Enayati JG, McDonnell P, Burke MB, Dean KC, Lyn S, Silverman C, Dai E, Appelbaum ER, Richman C, DiPrince R, Dodds RA, Jones JE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem*. 1998;273:14363–14367.
29. Hoffauer LC, Stiel CK, Riggs BL, Dunstan CR, Spelsberg TC, O'Brien T, Khosla S. Effects of immunosuppressants on receptor activator of NF- κ B ligand and osteoprotegerin production by human osteoblastic and coronary artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;280:334–339.
30. Godwin BE, Zhang J, Ma BY, Marshall-Rothstein A, Fink A. TRAIL expression in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;278:L1045–L1050.
31. Reynolds JL, Jonsson AJ, Skoppa JM, McNair R, Schurgans LJ, Proudfoot D, Johnson-Dachert W, Weinberg PL, Shanahan CM. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:2157–2167.
32. Chalason ME, Hamelster DG, Derry JM, Armstrong AP, Tomczak ME, Takada K, Akira S, Deegall WC. Osteoclast differentiation is impaired in the absence of inhibitor of κ B kinase alpha. *J Biol Chem*. 2004;279:34841–34848.
33. Novack DV, Yin L, Hagari-Stapleton A, Schreiber KD, Grøddal DV, Ross FP, Teitelbaum SL. The κ B kinase function of NF- κ B2 p100 controls stimulated osteoclastogenesis. *J Exp Med*. 2003;196:771–781.
34. Leboy PS. Regulating bone growth and development with bone morphogenetic proteins. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1088:14–18.
35. Hayashi K, Nakamura S, Nishida W, Sobue K. Bone morphogenetic protein-induced MSK1 and MSK2 inhibit myocardin-dependent smooth muscle gene transcription. *Mol Cell Biol*. 2006;26:9426–9430.
36. Mikhaylova L, Malinowski J, Sumitaniya M. Regulation of in vitro vascular calcification by BMP4, MCP and Wnt3a. *Calcif Tissue Int*. 2007;81:372–381.
37. Glashoff CM, Spurr MY, Li X, Rajachar RM, Yang H. Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin. *Circ Res*. 2005;96:717–722.
38. Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weinberg PL, Edwards ME. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation*. 1999;100:2168–2176.
39. Kloci S, Schett G, Werning G, Redlich K, Oberteleuner M, Mayr A, Sauer P, Szeles J, Poeschl W, Willert J. Osteoprotegerin is a risk factor for progressive atherosclerosis and cardiovascular disease. *Circulation*. 2004;109:2175–2180.
40. Schoppa M, Sattler AM, Schaefer JR, Herranz M, Malach B, Hoffauer LC. Increased osteoprotegerin serum levels in men with coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;86:1024–1028.
41. Hermann-Arnhol KM, Kastnerbauer T, Pablig T, Novotny P, Lobo N, Schwann S, Koller U, Filzgradl R. Initially elevated osteoprotegerin serum levels may predict a perioperative myocardial infarction in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Crit Care Med*. 2006;34:76–80.
42. Schett G, Kloci S, Redlich K, Oberteleuner F, Wegar S, Egger G, Mayr A, Jocher J, Xu QB, Patschanam P, Teitelbaum S, Szeles J, Willert J. Soluble RANKL and risk of nontraumatic fracture. *JAMA*. 2004;291:1108–1113.
43. Schoppa M, Schaefer JR, Hoffauer LC. Low serum levels of soluble RANK ligand are associated with the presence of coronary artery disease in men. *Circulation*. 2003;107:676.
44. Kloci S, Schett G, Schwaidler J, Seppi K, Eder P, Egger G, Sauer P, Mayr A, Xu QB, Willert J. Soluble receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and risk for cardiovascular disease. *Circulation*. 2007;116:385–391.

ARTÍCULO 3: Influence of uremia, and Calcitriol and Paricalcitol treatment in Vitamin D metabolism and in vascular calcification

Influencia de la uremia, y del tratamiento con Calcitriol y Paricalcitol en el metabolismo de la vitamina D y en la calcificación vascular.

Introducción La aterosclerosis es un proceso complejo caracterizado por un aumento del grosor de la pared y el endurecimiento de las arterias. Afecta a la media e íntima arterial y es debido principalmente a la acumulación de CMLV, células inflamatorias como macrófagos, linfocitos T, células dendríticas y mastocitos, así como lípidos, colágeno y matriz extracelular. Este proceso está acelerado en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) que presentan una disminución de la síntesis de Calcitriol y desarrollan hiperparatiroidismo secundario. Las CMLV han sido consideradas por diversos autores como responsables directas de la generación de la placa aterosclerótica, vía proliferación, migración de la media y síntesis de proteínas de matriz. Es una práctica común el tratar a los pacientes con ERC con Calcitriol o análogos, como el Paricalcitol, para downregular los niveles de PTH que están elevados en estos pacientes. Previos estudios de nuestro grupo demostraron que el Paricalcitol tiene una menor respuesta proliferativa comparado con el Calcitriol en la CMLV. Otros estudios han demostrado que el exceso de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ es aterotóxico, e induce calcificaciones vasculares en humanos y animales de experimentación. Estudios recientes sugieren que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ podría tener importantes implicaciones en el proceso aterosclerótico. Algunos autores han sugerido que la síntesis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ por las células endoteliales tiene una función paracrina-autocrina actuando a nivel local promoviendo la adhesión de leucocitos; y que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induce un incremento dosis dependiente de la migración en CMLV. El descubrimiento de que las CMLV expresaban las proteínas implicadas en el metabolismo de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (1α hidroxilasa, 24 hidroxilasa y VDR) provocó un creciente interés por su efecto auto y paracrino y por los mecanismos implicados en su regulación. Por esta razón analizamos el efecto de la uremia y del tratamiento con Calcitriol y Paricalcitol sobre la expresión de estos genes y sobre la calcificación vascular.

Materiales y Métodos Para los estudios *in vivo* se utilizaron ratas Sprague Dawley sometidas a nefrectomía subtotal que se dividieron en 3 tratamientos (control, Paricalcitol y el Calcitriol). Tras 3 meses se recogió suero, la arteria y el riñón. Para los

experimentos *in vitro* se emplearon CMLV procedentes de explantes de aorta de rata, que se trataron con DMEM suplementado con un 15% de suero procedente de las ratas control, o urémicas. Además, se añadió tratamiento con Paricalcitol o Calcitriol. Así mismo, se incubaron con OPG o se emplearon CMLV RANK- para tratar de inhibir la calcificación. Tanto *in vivo* como *in vitro* se analizó la expresión de genes del metabolismo de la vitamina D y la calcificación vascular.

Resultados: La uremia provoca una desregulación de las proteínas implicadas en el metabolismo de la vitamina D en las arterias *in vivo* y en las CMLV *in vitro*. Esta desregulación conduce un aumento local de Calcitriol que podría tener un efecto autocrino-paracrino en la células de los vasos. Este resultado se observa en las aortas pero no en los riñones, indicando una regulación diferente según el tejido. El tratamiento con distintos activadores del receptor de la vitamina D tiene efectos diferentes sobre la expresión génica: mientras que el Paricalcitol no modifica el efecto la uremia, el Calcitriol lo dispara. El incremento en los niveles locales de Calcitriol estimula la expresión de RANKL en CMLV induciendo su calcificación. Una parte importante de la calcificación inducida por la uremia se puede inhibir con la adición de OPG o el silenciamiento de RANK *in vitro*.

Conclusiones: La uremia provoca una desregulación de las proteínas implicadas en el metabolismo de la vitamina D en las CMLV. Esta desregulación produce un incremento local de la síntesis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, que podría tener un efecto paracrino sobre las células del vaso. Esto podría guardar relación con la aterosclerosis acelerada que sufren los pacientes urémicos. El tratamiento con diferentes activadores del VDR tendría un impacto diferente en la progresión del proceso aterosclerótico. Además, la regulación de las proteínas involucradas en el metabolismo de la vitamina D parece ser diferente en el tejido renal y arterial

Influence of uremia, and Calcitriol and Paricalcitol treatment in vitamin D metabolism and in vascular calcification.

Sara Panizo MSc, Eva Parisi PhD, Anna Cardus PhD, Petya Valcheva MSc, Elvira Fernandez Md, PhD, Jose M Valdivielso PhD

ABSTRACT

INTRODUCTION Atherosclerosis is a complex process characterized by an increase in wall thickness and hardening of the arteries due to the accumulation of vascular smooth muscle cells (VSMC), inflammatory cells (macrophages, T lymphocytes, dendritic and mast cells), lipids, collagen and extracellular matrix. This process is accelerated in patients with chronic kidney disease which are commonly treated with Calcitriol or analogues, like Paricalcitol, in order to downregulate PTH levels. The finding that VSMC express the proteins involved in Calcitriol metabolism (VDR, 1-alpha hydroxylase and 24-hydroxylase) provoked an increased interest over the paracrine effect and the mechanisms implicated in its regulation.

MATERIALS AND METHODS *In vivo*: 5/6 nephrectomized Sprague Dawley rats divided in three treatments (Control, Paricalcitol and Calcitriol). They were maintained for 3 months. At the moment to the sacrifice we collected serum, aorta and kidney samples. *In vitro*: rat VSMC maintained in DMEM, supplemented with 15% serum from healthy or uremic rats. Treatments with Calcitriol and Paricalcitol were added to this media. They also were incubated with OPG to to inhibit the calcification. We determine in vitro and in vivo the expression of genes involve in vitamin D metabolism (VDR, 1alpha hydroxylase and 24 hydroxylase) and in vascular calcification (RANKL)

RESULTS -Uremia provokes a deregulation of the proteins involved in vitamin D metabolism in VSMC. This deregulation produces a local increase in Calcitriol that may have a paracrine effect on the vessel cells. This Calcitriol stimulates the expression of RANKL in VSMC inducing their calcification. The treatment with different Vitamin D receptor activators has different effect over the gene expression. The regulation of the

proteins involved in vitamin D metabolism seems to be different in renal than arterial tissue.

INTRODUCTION

Atherosclerosis is a complex process characterized by an increase in the wall thickness and the hardening of the arteries. It affects media and intima of the artery and is due mainly to the accumulation of vascular smooth muscle cells (VSMC), inflammatory cells (macrophages, T lymphocytes, dendritic and mast cells), lipids, collagen and extracellular matrix which provoke endothelium dysfunction¹. Atherosclerosis develops rapidly in uremic patients² and is believed to be responsible for the high incidence of ischemic heart disease, left ventricular hypertrophy, congestive heart disease, sudden death, and stroke in these patients³. Patients with chronic kidney disease (CKD) develop extensive calcification, which causes increased arterial stiffness and severer cardiovascular disease that induces a higher morbidity and mortality^{4:5}. A significantly greater incidence of plaques has been reported in the common carotid artery of patients with an stage of renal disease (ESRD). High sensitive techniques confirm that atherosclerotic plaques have an accelerated development in dialysis patients⁶. Arterial disease and left ventricular hypertrophy (LVH)⁷ are two principal risk factors driving the high rate of cardiovascular mortality in haemodialysis patients. VSMC have been viewed as directly responsible for generating the atherosclerotic plaque, via proliferation, migration from the media and synthesis of matrix proteins relative to calcification⁸.

It is a common practise to treat CKD patients with Calcitriol or analogues, like Paricalcitol, in order to downregulate PTH levels⁹⁻¹¹. Previous studies in our group¹² demonstrated that Paricalcitol induced less of a proliferative response compared to Calcitriol in VSMC. Several studies have demonstrated that an excess of 1,25(OH)₂D₃

is arteriotoxic and that 1,25(OH)₂D₃ induces vascular calcifications in humans and experimental animals^{13;14}. Calcitriol increases vascular calcification in VSMC through the increase of the expression of RANKL¹⁵. RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand) is a member of the TNF superfamily and is expressed mainly by osteoblasts and its immature precursors¹⁶. RANKL activates its receptor (RANK) which is expressed in osteoclasts and its precursors, promoting osteoclast formation, activation and prolonging osteoclast survival by suppressing apoptosis¹⁷. OPG is a decoy receptor for RANKL, which directly counteracts all the RANKL-mediated actions¹⁸. Recent studies suggest that 1,25(OH)₂D₃ may have further implications in the atherosclerotic process. Zehnder et al.¹⁹ postulated that the synthesis of 1,25(OH)₂D₃ by endothelial cells has a paracrine/autocrine function and acts at a local level promoting leukocyte adhesion. Furthermore, Rebsamen et al.²⁰ found that 1,25(OH)₂D₃ induced a dose dependent increase in VSMC migration. Tukaj et al. demonstrated that Calcitriol induced morphologic changes in rat aorta VSMC, including a progression from a contractile to a synthetic phenotype with an increased number of factors that promote calcification²¹.

Vitamin D₃ is first metabolized to 25(OH)D₃ in the liver and subsequently to 1,25(OH)₂D₃ (Calcitriol) (with biological activity) by the enzyme 1 α -hydroxylase²². 1 α -hydroxylase is mainly located in the kidney but it can also be found in other extrarenal tissues as endothelial cells¹⁹, VSMC²³, cells from the colon mucosa²⁴, macrophages²⁵ and keratinocytes²⁶. 1 α -hydroxylase action is the limiting step in the vitamin D biosynthesis and it is tightly regulated by the own 1,25(OH)₂D₃ by negative feedback and by other factors as PTH, calcium and phosphate concentration²⁷. The levels of the active metabolite are regulated by synthesis and degradation rates²⁷. The degradation occurs by the enzyme 24-hydroxylase, which is responsible for the hydroxylation of 25(OH)D₃ and 1,25(OH)₂D₃ to obtain 24,25(OH)₂D₃ and 1,24,25(OH)₂D₃, respectively²⁷. It is fundamentally expressed in renal tubule, but it can be found in a wide number of tissues

that are target of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ²⁸. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ exerts its action through its receptor the VDR.

The finding that VSMC express the proteins involved in vitamin D metabolism (VDR, 1-alpha hydroxylase and 24-hydroxylase) provoked an increased interest over the paracrine effect and the mechanisms implicated in its regulation. For this reason we decide to analyze the effect of uremia and treatment with Calcitriol and Paricalcitol over the expression of these genes and its relationship with vascular calcification.

MATERIALS AND METHODS

All the experiments performed in this study followed the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

In vitro studies

Cell cultures

Primary rat aortic VSMCs of Sprague-Dawley rats were obtained as described previously²⁹ and maintained in DMEM (GIBCO) containing 10% FBS.

Cells were seeded (10^5 cells/plate) in 100 mm plates. When the cell confluence was about 80% VSMCs were shifted to treatment media, DMEM containing 15% serum from normal rat or 15% serum from 5/6 nephrectomy rat, 10 mmol/L sodium pyruvate and 10 mmol/L β -glycerophosphate (Sigma). Paricalcitol (300nM) (Abbott) or Calcitriol (100nM) (Sigma) were added to this treatment media during 48 hours. Then we collect RNA and protein.

We used cells between passage 2 and 8. All the experiments were performed in triplicate. In each experiment, three plates were used per condition.

Determination of VSMC calcification

In all the calcification experiments, the calcium levels were measured 5 days after the addition of the treatments by the o-cresolphthalein complexone method. We measured the calcium incorporation of VSMC incubated with media with normal or uremic rat serum and the addition to these media of Paricalcitol (300nM) or Calcitriol (100nM). Moreover, we tested the effect of OPG (Sigma) (100pM) in the calcification level induced by the uremic serum, and the calcification of VSMC infected with shRNA for RANK.

Lentiviral Production and Infection

Lentiviral-based vectors for RNA interference-mediated gene silencing (FSVsi) consisted of a U6 promoter for expression of short hairpin RNAs and the Venus variant of YFP under the control of an SV40 promoter for monitoring transduction efficiency. Oligonucleotides to produce shRNA were annealed in buffer (150 mM NaCl; 50 mM Tris pH 7.6) and cloned into the AgeI-BamHI sites of FSVsi. shRNA target sequence to RANK was TTAGCTGAGGATGCTGAGGAT. Scramble sequence (CGTGGGGTTAATTAAGAGGCT) was used as a control. To produce infective lentiviral particles, 293T cells were co-transfected by the Polyethylenimine (PEI) method with the virion packaging elements (VSV-G and $\Delta 8.9$) and the shRNA producing vector (FSVsi-RANK or FSVsi as a control). 293T cells were allowed to produce lentiviral particles during 3-4 days in the same culture media used for VSMC. Culture media was collected and centrifuged for 5 min at 1000 x g and supernatant added to growing VSMC overnight. After this period, media was replaced with fresh medium and cells were incubated for 4 additional days to allow endogenous gene knockdown. Western blot of RANK were performed to check the gene knockdown.

Real Time PCR

Total cellular RNA was isolated from VSMC incubated with the different serums and treatments, and tissue samples by Trizol method. In the *in vitro* experiments, isolation of RNA was performed 48 hours after the addition of treatments. Reverse transcription was performed with the first-strand DNA synthesis kit for RT-PCR (Roche Diagnostics). We used Taqman real time-PCR amplification with gene-specific primer for RANKL, VDR, 1 α hydroxylase and 24 hydroxylase (Gene Expression Assays from Applied Biosystems), using rat glyceraldehyd-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) as a reference, with an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). The relative RNA amount was calculated by standard formulae. Average and standard error from three experiments were calculated.

Western Blot analysis

Western blot analysis were performed as previously described, 48 hours after the addition of treatments.³⁰ After blotting, the membrane was incubated overnight with anti-RANK antibody (1:1000. Cell Signalling), anti-VDR (1:1000 Santa Cruz Biotechnology), anti-1 α hydroxylase (1:1000 The Binding Site), anti-24 hydroxylase (1:1000 Santa Cruz Biotechnology) and anti-tubulin (1:10000 Sigma). Secondary antibody binding was detected with the ECL™ Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences) and the VersaDoc Imaging system Model 4000 (BioRad).

Immunoprecipitation (IP)

Cells were lysated and protein was quantified by “DC Protein Assay” from BioRad. We used 500 ug of protein with 1ug of primary antibody anti 24 hydroxylase for the IP. We added 25% v/v of sepharose beads (Calbiochem), and incubated them overnight at 4 °C under rotary agitation. When the incubation time is over, we washed the beads in lysis buffer three times. Finally, we removed the last supernatant and add

25 of 2x loading buffer. Tubes were boiled at 95-100 °C for 5 minutes to denature the protein and separate it from the sepharose beads, and then they were centrifuged and the supernatant, where the protein is now, was keeping performing the western blot.

Determination of Calcitriol production (1 α hydroxylase activity)

After 5 days of each treatment we washed 6 times each well with PBS. After the washed we incubated the cells with DMEM with or without 25 (OH) D₃ during 1 hour. We collected this media and we measured de production of 1,25(OH)₂D₃ by a ELISA kit (Immunodiagnosics Systems) The production was calculated: (1,25(OH)₂D₃ production in well with 25 (OH) D₃) - (1,25(OH)₂D₃ media production in wells without 25 (OH) D₃).

In vivo studies

Experimental animals

Sprague-Dawley rats (200-225 g) were anesthetized with Isoflurane and right nephrectomy was performed. After 1 week, animals suffered 2/3 nephrectomy in the left kidney by ligation of both poles as previously described.³¹ Animals with 5/6 nephrectomy were divided in 3 groups. One group received Calcitriol (1 μ g/kg 3 times a week for 8 weeks, n=9), other group received Paricalcitol (3 μ g/kg 3 times a week for 8 weeks, n=9,) whereas the third group received a vehicle injection (n=9). Moreover, one more group of sham-operated rats were used as control, (n=9). At sacrifice, 8 weeks later, abdominal aortas and kidneys were collected to isolate RNA. Serum was collected.

Statistical Analysis

Differences between groups were assessed by ANOVA. A p<0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Effect of uraemia and Paricalcitol or Calcitriol treatment in the expression of genes involve in vitamin D metabolism in aorta and kidneys in vivo

In figure 1A we can observe how arteries from subtotal nephrectomized rats (uremic rats) do not show any difference comparing to the control ones in VDR expression determined by RT PCR. Treatment with Paricalcitol and Calcitriol increases VDR expression in the uremic group. Uremia increases the expression, determined by Real Time PCR, of 1α hydroxylase (figure 1C) and 24-hydroxylase (1E) in rat arteries. Although Paricalcitol does not modify the effect of uremia, Calcitriol treatment increased 1α hydroxylase expression.

VDR expression in the kidneys (figure 1B) is downregulated in uremia, however its expression increases with both compounds. 1α hydroxylase expression in the kidneys (1D) decreases in uremia and even more with both treatments. 24-hydroxylase expression increases with Calcitriol and Paricalcitol (1F).

Effect of uraemia and Paricalcitol or Calcitriol treatment in the expression of genes involve in vitamin D metabolism in VSMC in vitro

In figure 2 we show the effect of the uraemia and the treatment in cultured VSMC over the expression of the same genes. In vitro we found an increase in the VDR (RNA (2A) and protein (2B)) levels with Calcitriol and Paricalcitol treatments. 1α hydroxylase (2C, 2D) increases in uremic media and even more when we add Calcitriol. 24-hydroxylase (2E, 2F) increases with Paricalcitol with both serums and its expression is intensified in media with control serum plus Calcitriol by Real Time PCR and immunoprecipitation.

Uremic serum increases $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ production in VSMC in vitro (figure 2G). The Paricalcitol addition has not effect. However, Calcitriol addition to the uremic serum provokes a higher increase in this production

Effect of uraemia and Paricalcitol or Calcitriol treatment VSMCcalcification and RANKL expression in vitro

Previous results showed a significant increase in vascular calcification of abdominal aortas obtained from animals with 5/6 nephrectomy versus control rats. Moreover treatment with Calcitriol dramatically increased the calcified areas and total calcium content in this artery. However calcification of the medial area of the artery was only seen sporadically in rats treated with Paricalcitol¹⁵. For this reason we decided to study the direct effect of the uremic serum in VSMC in vitro calcification and the effect over it of the addition of Paricalcitol (300nM) and Calcitriol (100nM) in figure 3. Uremic serum provokes and increases of the calcification level (figure 3A). Paricalcitol does not modify the effect oh the uremia over calcification. Calcitriol increases significantly the calcification level in both serums.

We know that Calcitriol increases the expression of RANKL, and it is the responsible of VSMC calcification. We can observe in figure 3B that uremic serum promotes an increase of RANKL expression determined by RT PCR. Calcitriol addition increases more this expression.

Inhibition of VSMC calcification induced by uraemia using OPG o sh RNA of RANK in vitro.

To check if the increase of the expression of RANKL in VSMC is the responsible of this calcification we added to the media (control and uremic) 100pM of OPG. We observed in figure 4 A that calcification produced by the uremic serum in VSMC is

inhibited by OPG. In order to determine if the effect of uremic was mediated by activation of RANK or to another potential receptor, we designed shRNA to decrease the endogenous RANK protein levels. Incubation of VSMC control or VSMC RANK- with normal or uremic serum for 5 days (figure 4B) show that cells without RANK presents a reduction of the calcification compared to the normal ones when they were cultured with uremic serum.

DISCUSSION

Cardiovascular disease is the most frequent cause of morbidity and mortality in chronic kidney disease (CKD) patients. Accelerated atherosclerosis and medial calcification are common in the dialysis population. The mechanisms by which uremia promotes vascular calcification and the relationship between arterial wall calcification and atherosclerosis are poorly understood. Many different cell types, including macrophages, lymphocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells (VSMC), are involved in atherosclerotic lesion formation³². VSMC in response variety of atherogenic stimuli can switch between the “contractile” and “synthetic” phenotypic states. These “synthetic” VSMC migrate and proliferate more readily than “contractile” VSMC and can synthesize more collagen and matrix proteins, involving them in the initiation and early progression of atherosclerotic plaque^{8;33}. Patients with CKD show an increase in VSMC proliferation, leading to arterial complications³⁴. Those patients have been commonly treated with 1,25(OH)2D3, which has a pro-proliferative effect in VSMC²⁹. Therefore, treatment with 1,25(OH)2D3 could increase the effect in VSMC proliferation in these patients, increasing vascular complications like atherosclerosis. Paricalcitol shows no effect on proliferation in VSMC¹². Our results show that in VSMC uremia induces alterations in the vitamin D metabolism, all of them aimed to increase the local

synthesis of 1,25(OH)₂D₃. Moreover, this effect is intensified by the addition of Calcitriol, but not by Paricalcitol.

This abnormal Calcitriol metabolism during the uremia has been previously reported in other tissues. The low concentration of the biologically active metabolite of vitamin D, (1,25(OH)₂D₃), is critical to the pathogenesis of secondary hyperparathyroidism in chronic renal failure. The actions of 1,25(OH)₂D₃ are mediated through binding to its cellular receptor protein, the vitamin D receptor (VDR). Many authors report a decrease in VDR content of parathyroid glands in rats³⁵, dogs³⁶ and humans³⁷ with renal failure. In addition, the up-regulating effect of 1,25 (OH)₂ D₃ on levels of VDR protein in duodenum is attenuated in uremic rats³⁸. To obtain the biological response, the hormone receptor complex binds to vitamin responsive elements present in the DNA. Studies based on DNA-cellulose chromatography show that the interaction with DNA was weakened in CKD³⁹. In addition, Patel et al⁴⁰ demonstrated that uremic ultrafiltrate blocked Calcitriol-induced reporter gene activity *in vitro*. The electrophoretic binding capacity of VDR to the osteocalcin gene VDR is reduced to 50% when VDR is incubated with uremic ultrafiltrate and compare with the normal one⁴⁰. Uremic ultrafiltrates derived from hemo or peritoneal dialyzed patients inhibit the interaction of VDR with DNA. In vivo studies with rats with incipient renal failure showed an important reduction of VDR binding to the VDREs compared with sham operated rats⁴¹. Szabo et al⁴² showed that intestinal and parathyroid gland binding capacity of 1,25 to VDR was markedly downregulated in uremic rats. Uremic toxins are involved in 1,25-(OH)₂D₃ resistance observed in patients with chronic renal failure⁴³. The inhibitory effect of uremic toxins on VDR-VDRE binding could underlie the Calcitriol resistance reported in renal failure. Thus, the decrease in VDR content and in its binding capacity to DNA could be responsible of the increase in 1 α hydroxylase (due to the elimination of the negative feedback) that we observe in VSMC *in vitro* and in arteries *in vivo* in uremic condition. This explains the increase in a local production in

1,25(OH)₂D₃ in the uremia, that can exert its effects in an auto-paracrine way. Thus, the high increase in intracellular 1,25 could overcome the resistance and cause the increase in proliferation and calcification in VSMC.

Chronic uremia is characterized by decreased levels of plasma 1,25(OH)₂D₃ due to decreased renal 1-hydroxylase activity. However our results show that extrarenal synthesis in the VSMC is increased. Some articles suggest that 1 α hydroxylase regulation is tissue specific.⁴⁴ Studies from Dusso et al⁴⁵ demonstrated that macrophages from normal individuals synthesize 1,25-(OH)₂D₃. In chronic renal failure, peripheral macrophages exhibited an enhanced 1 α -hydroxylase activity and a decreased capacity to degrade 1,25-(OH)₂D₃. Besides uremic patients have elevated PTH, another stimulus that increases the expression of 1 α hydroxylase. In summary, during uremia vitamin D circulating levels are decreased. This, and the elevated PTH levels, serve as a stimulus to increase extrarenal synthesis of 1,25 (OH)₂D₃. Our uremic rats suffer an increase of the expression of 1 α hydroxylase in the artery but a decrease in the kidney. Thus, extrarenal synthesis of 1,25 is elevated in VSMC.

The tissue dependent deregulation of 1 α hydroxylase, has been observed in other diseases. Hypercalcemia associated with granulomatous slack skin syndrome seems to be caused by dysregulation of α -hydroxylase expression in both epidermal and dermal granulomatous cells. In psoriasis and sarcoidosis of the skin the overexpression of the enzyme is restricted to keratinocytes and granulomata, respectively⁴⁶.

The deregulation of genes of vitamin D metabolism by uremia is also described for 24-hydroxylase. Koyama et al⁴⁷ showed the induction of duodenal 24-hydroxylase gene was 2.0- to 3.8-fold greater in uremic rats than in sham-operated rats. Hsu et al⁴⁸ studied how uremic toxins play a major role in the suppression of Calcitriol degradation. Uremic toxins suppress genomic synthesis of 24- hydroxylase, via a receptor-mediated

process. In our experiments in vitro and in vivo uremia do not modify significantly 24-hydroxylase expression.

The consequence of all these alteration, the extrarenal synthesis of 1,25 (OH)₂D during the uremia in the artery, concretely in VSMC, is elevated due to an increase in the synthesis and a decrease in degradation. We confirmed this conclusion when we measure the 1,25 (OH)₂D₃ product in VSMC in vitro cultured with normal and with uremic serum. This production is higher in cells cultured with uremic serum.

Secondary hyperparathyroidism (2HPT) in chronic kidney disease requires therapy to minimize the effects of parathyroid hormone (PTH) on bone and other tissues⁴⁹. Low levels of Calcitriol in blood play a major role in the initiation and maintenance of hyperparathyroidism. Accordingly, administration of Calcitriol has been demonstrated to be an effective form of therapy. Therapy for the treatment of secondary hyperparathyroidism in patients with chronic kidney disease with different vitamin D receptor activator (VDRA), as Calcitriol or Paricalcitol primarily involves suppressive effects on the parathyroid gland, and regulation of calcium and phosphorus absorption in the intestine and mobilisation in bone. Results seen in observational studies of HD patients show that Paricalcitol is associated with improved survival compared to Calcitriol⁵⁰. The survival benefits of Paricalcitol appear to be linked, at least in part, to 'nonclassical' actions of VDRA, possibly through VDRA-mediated modulation of gene expression. Paricalcitol regulates several cardiovascular and renal parameters more favourably than nonselective VDRA. Complex nonclassical effects, which are not clearly understood, possibly contribute to the improved survival seen with VDRA, especially Paricalcitol⁵¹. In our case the use of Paricalcitol or Calcitriol has different effects both in vivo and in vitro in VSMC, whereas Paricalcitol do not modify the effect of uremia, Calcitriol triggers the expression of 1 α hydroxylase and the production of 1,25(OH)₂D₃. Arteries from healthy rats treated with Cacitriol follow the expected

behaviour: VDR and 24-hydroxylase are increased, but 1α hydroxylase is decreased (data not shown)

Our results are in agreement with previous reports from other groups that show that uremic serum increases calcification and enhances the expression of osteogenic markers in VSMC⁵²⁻⁵⁴. This report shows that 1α hydroxylase increase its expression in VSMC cultured in uremic serum and in aorta of subtotal nephrectomy rats. This deregulation produces an local increase in $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ VSMC in vitro that may have a paracrine effect on the vessel cells. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ acts over the own VSMC increasing RANKL expression, and we demonstrated in previous articles^{15;55} that RANKL is an important mediator in the vascular calcification. RANKL expression is almost undetectable in normal VSMC, but it is increases in calcified arterial lesions^{56;57}. Moreover the addition of Calcitriol provokes an up regulation in 1α expression in VSMC in uremia and in the aortas of these rats. This increases $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ production, increasing RANKL expression and VSMC calcification. Moreover, and important part of the increase in calcium content observed in VSMC treated with uremic serum can be inhibited by the addition of OPG or using RANK shRNA VSMC. These results show that the mediator in VSMC calcification observed in uremia is the local increase of RANKL.

Van Driel et al⁵⁸ show that 1α hydroxylase is expressed in human osteoblasts. Functional analyses demonstrate that after incubation with the $25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$, osteoblasts can produce enough $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ to modulate their activity, resulting in induced alkaline phosphatase (ALP) activity, osteocalcin (OC) mRNA expression, and mineralization. Autocrine/paracrine 1α hydroxylase activity in extrarenal tissues is modulated differently and is less sensitive to autoregulation by $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ⁵⁹. The results of van Driel support this notion, as in human osteoblasts 1α hydroxylase activity and expression is unaffected by $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. The classical renal regulators of 1α hydroxylase, PTH and calcium do not regulate it in osteoblasts. Moreover they observe how the induction of osteoclast differentiation, by addition of the critical osteoclast

inducer RANKL, results an increase in 1 alpha hydroxylase mRNA levels. It indicates the existence of a local (autocrine/paracrine) regulation of 1 α hydroxylase by factors (growth factors, cytokines) derived from bone cells and/or cells in the bone marrow. Analysing our results we can observe something similar. It seem that extrarenal synthesis of 1,25 (OH)2D3 in VSMC is modulated in a different way than in kidney. The addition of Calcitriol is not capable to inhibit the 1 α hydroxylase expression. Even more, the addition of Calcitriol provokes an increase in 1 α hydroxylase. As we previously demonstrated Calcitriol stimulates the synthesis of RANKL in VSMC⁵⁵. The VSMC start to express osteogenic markers and they are very similar to osteoclasts. Uremia and Calcitriol stimulates RANKL and calcification. This RANKL could be the responsible of the increase in 1 α hydroxylase expression and there for the increase in 1,25 (OH)2D3 production.

In conclusion uremia produces a deregulation in the enzymes of the vitamin D metabolism. This affects the extrarenal synthesis in the VSMC in the artery. 1 α hydroxylase is elevated and this involve an increase in 1,25(OH)2D3 production. This effect is intensified with the Calcitriol treatment, but not with Paricalcitol. Uremia and Calcitriol elevates RANKL expression. This RANKL increase VSMC calcification and it seems that RANKL could increase the synthesis of 1 α hydroxylase in groups of these cells that are like osteoblasts. These results can be important to choose the treatment with Calcitriol or Paricalcitol in CKD patients.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: VDR, 1α hydroxylase and 24 hydroxylase expression determined by real time PCR in artery (A,C and E respectively) and kidney ((B, D, and F) from sham operated rats (white bars), rats with subtotal nephrectomy (grey bars), rats with subtotal nephrectomy and treated with Paricalcitol (3ug/kg 3 times a week for 8 weeks) (dotted bars) and rats treated with Calcitriol (1 mg/kg 3 times a week for 8 weeks) (dashed bars) rats. Data are expressed in ng calcium per mg protein Data are mean \pm sem.*: $p < 0.05$ vs. control.

Figure 2: Expression in VSMC treated for 5 days with serum from a healthy rat (with bars) or 5/6 nephrectomized one (grey bars) and adding Paricalcitol or Calcitriol determined by Real Time PCR or Western Blot of VDR (A and B) 1α hydroxylase (C and D) and 24 hydroxilase (E and F). In all western blot tubulin was used as a loading control. (G) $1,25$ (OH) $_2$ D $_3$ production in VSMC treated with the same serums and conditions. Data are mean \pm sem.*: $p < 0.05$ VSMC plus control serum vs VSMC plus uremic serum and the same treatment (without, Paricalcitol or Calcitriol). #: $p < 0.05$ VSMC plus control serum without treatments vs VSMC plus control serum with Paricalcitol or Calcitriol. α : $p < 0.05$ VSMC plus control uremic without treatments vs VSMC plus uremic serum with Paricalcitol or Calcitriol

Figure 3: .VSMC calcification (A). Cells were incubated in DMEM with serum from control (white bars) or 5/6 nephrectomy rat (grey bars), and they were supplement with Paricalcitol or Calcitriol. 5 days later the calcium content was measured by o-cresolftalein complexone method. Expression determined by Real Time PCR of RANKL (B) in VSMC in the different conditions. Data are mean \pm sem.*: $p < 0.05$ VSMC plus control serum vs VSMC plus uremic serum and the same treatment (without,

Paricalcitol or Calcitriol). #: $p < 0.05$ VSMC plus control serum without treatments vs VSMC plus control serum with Paricalcitol or Calcitriol. α : $p < 0.05$ VSMC plus control uremic without treatments vs VSMC plus uremic serum with Paricalcitol or Calcitriol

Figure 4: Effect in the calcification of the *in vitro* incubation of rat VSMCs with OPG (100 pM) in normal and uremic serum (A) Quantification of calcium incorporation. Data are expressed in ng calcium per mg protein. $p < 0.05$ vs. OPG 0 pM. (B) Comparison of the calcification level between normal VSMC and RANK- VSMC incubated with normal and uremic serum. Data are mean \pm sem.*: $p < 0.05$ vs. control serum.

BIBLIOGRAPHY

1. Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R: Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 8:403-409, 2002
2. Kawagishi T, Nishizawa Y, Konishi T, Kawasaki K, Emoto M, Shoji T, Tabata T, Inoue T, Morii H: High-resolution B-mode ultrasonography in evaluation of atherosclerosis in uremia. *Kidney Int* 48:820-826, 1995
3. London GM, Drueke TB: Atherosclerosis and arteriosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int* 51:1678-1695, 1997
4. London GM, Guerin AP, Marchais SJ, Metivier F, Pannier B, Adda H: Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant* 18:1731-1740, 2003
5. Blacher J, Safar ME, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, London GM: Aortic pulse wave velocity index and mortality in end-stage renal disease. *Kidney Int* 63:1852-1860, 2003
6. Braun J, Oldendorf M, Moshage W, Heidler R, Zeitler E, Luft FC: Electron beam computed tomography in the evaluation of cardiac calcification in chronic dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 27:394-401, 1996
7. Silberberg JS, Barre PE, Prichard SS, Sniderman AD: Impact of left ventricular hypertrophy on survival in end-stage renal disease. *Kidney Int* 36:286-290, 1989
8. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801-809, 1993
9. Slatopolsky E, Weerts C, Thielan J, Horst R, Harter H, Martin KJ: Marked suppression of secondary hyperparathyroidism by intravenous administration of 1,25-dihydroxy-cholecalciferol in uremic patients. *J Clin Invest* 74:2136-2143, 1984
10. Gallieni M, Brancaccio D, Padovese P, Rolla D, Bedani P, Colantonio G, Bronzieri C, Bagni B, Tarolo G: Low-dose intravenous calcitriol treatment of secondary hyperparathyroidism in hemodialysis patients. Italian Group for the Study of Intravenous Calcitriol. *Kidney Int* 42:1191-1198, 1992
11. Andress DL, Norris KC, Coburn JW, Slatopolsky EA, Sherrard DJ: Intravenous calcitriol in the treatment of refractory osteitis fibrosa of chronic renal failure. *N Engl J Med* 321:274-279, 1989
12. Cardus A, Gallego C, Muray S, Marco MP, Parisi E, Aldea M, Fernandez E: [Differential effect of vitamin D analogues on the proliferation of vascular smooth muscle cells]. *Nefrologia* 23 Suppl 2:117-121, 2003

13. Bajwa GS, Morrison LM, Ershoff BH: Induction of Aortic and Coronary Athero-Arteriosclerosis in Rats Fed A Hypervitaminosis-D, Cholesterol-Containing Diet. *Proc Soc Exp Biol Med* 138:975-&, 1971
14. Liu LB, Taylor CB, Peng SK, Mikkelsen B: Experimental Arteriosclerosis in Rhesus-Monkeys Induced by Multiple Risk-Factors - Cholesterol, Vitamin-D, and Nicotine. *Paroi Arterielle-Arterial Wall* 5:25-31, 1979
15. Cardus A, Panizo S, Parisi E, Fernandez E, Valdivielso JM: Differential Effects of Vitamin D Analogues on Vascular Calcification. *J Bone Miner Res* 2007
16. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ: Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93:165-176, 1998
17. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ: Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3540-3545, 1999
18. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ: Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89:309-319, 1997
19. Zehnder D, Bland R, Chana RS, Wheeler DC, Howie AJ, Williams MC, Stewart PM, Hewison M: Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D-3 by human endothelial cells is regulated by inflammatory cytokines: A novel autocrine determinant of vascular cell adhesion. *Journal of the American Society of Nephrology* 13: 2002
20. Rebsamen MC, Sun JX, Norman AW, Liao JK: 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3 induces vascular smooth muscle cell migration via activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Circ Res* 91:17-24, 2002
21. Tukaj C, Kubasik-Juraniec J, Kraszpulski M: Morphological changes of aortal smooth muscle cells exposed to calcitriol in culture. *Med Sci Monit* 6:668-674, 2000
22. Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E: Vitamin D. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 277:F157-F175, 1999
23. Somjen D, Weisman Y, Kohen F, Gayer B, Limor R, Sharon O, Jaccard N, Knoll E, Stern N: 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase is expressed in human vascular smooth muscle cells and is upregulated by parathyroid hormone and estrogenic compounds. *Circulation* 111:1666-1671, 2005

24. Cross HS, Bareis P, Hofer H, Bischof MG, Bajna E, Kriwanek S, Bonner E, Peterlik M: 25-Hydroxyvitamin D(3)-1alpha-hydroxylase and vitamin D receptor gene expression in human colonic mucosa is elevated during early cancerogenesis. *Steroids* 66:287-292, 2001
25. Adams JS, Gacad MA: Characterization of 1 alpha-hydroxylation of vitamin D3 sterols by cultured alveolar macrophages from patients with sarcoidosis. *J Exp Med* 161:755-765, 1985
26. Huang DC, Papavasiliou V, Rhim JS, Horst RL, Kremer R: Targeted disruption of the 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene in ras-transformed keratinocytes demonstrates that locally produced 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses growth and induces differentiation in an autocrine fashion. *Mol Cancer Res* 1:56-67, 2002
27. Quesada JM. Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral. Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral Capítulo 6: Vitamina D. 2004.
Ref Type: Generic
28. Dusso A, Brown A, Slatopolsky E: Extrarenal production of calcitriol. *Semin Nephrol* 14:144-155, 1994
29. Cardus A, Parisi E, Gallego C, Aldea M, Fernandez E, Valdivielso JM: 1,25-dihydroxyvitamin D-3 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through a VEGF-mediated pathway. *Kidney Int* 69:1377-1384, 2006
30. Valdivielso JM, Perez-Barriocanal F, Garcia-Estan J, Lopez-Novoa JM: Role of nitric oxide in the early renal hemodynamic response after unilateral nephrectomy. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 276:R1718-R1723, 1999
31. Perez-Ruiz L, Ros-Lopez S, Cardus A, Fernandez E, Valdivielso JM: A Forgotten Method to Induce Experimental Chronic Renal Failure in the Rat by Ligation of the Renal Parenchyma. *Nephron Exp Nephrol* 103:e126-e130, 2006
32. Lusis AJ: Atherosclerosis. *Nature* 407:233-241, 2000
33. Doran AC, Meller N, McNamara CA: Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:812-819, 2008
34. Amann K, Wolf B, Nichols C, Tornig J, Schwarz U, Zeier M, Mall G, Ritz E: Aortic changes in experimental renal failure - Hyperplasia or hypertrophy of smooth muscle cells? *Hypertension* 29:770-775, 1997
35. Denda M, Finch J, Brown AJ, Nishii Y, Kubodera N, Slatopolsky E: 1,25-dihydroxyvitamin D3 and 22-oxacalcitriol prevent the decrease in vitamin D receptor content in the parathyroid glands of uremic rats. *Kidney Int* 50:34-39, 1996

36. Brown AJ, Dusso A, Lopez-Hilker S, Lewis-Finch J, Grooms P, Slatopolsky E: 1,25-(OH)₂D receptors are decreased in parathyroid glands from chronically uremic dogs. *Kidney Int* 35:19-23, 1989
37. Korkor AB: Reduced binding of [3H]1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the parathyroid glands of patients with renal failure. *N Engl J Med* 316:1573-1577, 1987
38. Koyama H, Nishizawa Y, Inaba M, Hino M, Prael JM, Deluca HF, Morii H: Impaired homologous upregulation of vitamin D receptor in rats with chronic renal failure. *Am J Physiol* 266:F706-F712, 1994
39. Hsu CH, Patel SR, Vanholder R: Mechanism of decreased intestinal calcitriol receptor concentration in renal failure. *Am J Physiol* 264:F662-F669, 1993
40. Patel SR, Ke HQ, Vanholder R, Koenig RJ, Hsu CH: Inhibition of calcitriol receptor binding to vitamin D response elements by uremic toxins. *J Clin Invest* 96:50-59, 1995
41. Sawaya BP, Koszewski NJ, Qi Q, Langub MC, Monier-Faugere MC, Malluche HH: Secondary hyperparathyroidism and vitamin D receptor binding to vitamin D response elements in rats with incipient renal failure. *J Am Soc Nephrol* 8:271-278, 1997
42. Szabo A, Ritz E, Schmidt-Gayk H, Reichel H: Abnormal expression and regulation of vitamin D receptor in experimental uremia. *Nephron* 73:619-628, 1996
43. Dusso AS: Vitamin D receptor: mechanisms for vitamin D resistance in renal failure. *Kidney Int Suppl* S6-S9, 2003
44. Bikle, D. D. Extra Renal Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D and its Health Implications. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism* . 2009. Ref Type: Generic
45. Dusso AS, Finch J, Brown A, Ritter C, Delmez J, Schreiner G, Slatopolsky E: Extrarenal Production of Calcitriol in Normal and Uremic Humans. *J Clin Endocrinol Metab* 72:157-164, 1991
46. Karakelides H, Geller JL, Schroeter AL, Chen H, Behn PS, Adams JS, Hewison M, Wermers RA: Vitamin D-mediated hypercalcemia in slack skin disease: evidence for involvement of extrarenal 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase. *J Bone Miner Res* 21:1496-1499, 2006
47. Koyama H, Inaba M, Nishizawa Y, Ishimura E, Imanishi Y, Hino M, Furuyama T, Takagi H, Morii H: Potentiated 1,25(OH)₂D₃-induced 24-hydroxylase gene expression in uremic rat intestine. *Am J Physiol* 267:F926-F930, 1994
48. Hsu CH, Patel SR, Young EW: Mechanism of Decreased Calcitriol Degradation in Renal-Failure. *Am J Physiol* 262:F192-F198, 1992
49. Martin KJ, Gonzalez EA: Vitamin D analogues for the management of secondary hyperparathyroidism. *Am J Kidney Dis* 38:S34-S40, 2001

50. Cozzolino M, Brancaccio D: Emerging role for the vitamin D receptor activator (VDRA), paricalcitol, in the treatment of secondary hyperparathyroidism. *Expert Opin Pharmacother* 9:947-954, 2008
51. Andress D: Nonclassical aspects of differential vitamin D receptor activation: implications for survival in patients with chronic kidney disease. *Drugs* 67:1999-2012, 2007
52. Moe SM, Duan D, Doehle BP, O'Neill KD, Chen NX: Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels. *Kidney Int* 63:1003-1011, 2003
53. Chen NX, O'Neill KD, Duan D, Moe SM: Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* 62:1724-1731, 2002
54. Chen NX, Duan D, O'Neill KD, Wolisi GO, Koczman JJ, Laclair R, Moe SM: The mechanisms of uremic serum-induced expression of bone matrix proteins in bovine vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* 70:1046-1053, 2006
55. Panizo S, Cardus A, Encinas M, Parisi E, Valcheva P, Lopez-Ongil S, Coll B, Fernandez E, Valdivielso JM: RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. *Circ Res* 104:1041-1048, 2009
56. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, Jahnhen-Dechent W, Weissberg PL, Shanahan CM: Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 15:2857-2867, 2004
57. Chaisson ML, Branstetter DG, Derry JM, Armstrong AP, Tometsko ME, Takeda K, Akira S, Dougall WC: Osteoclast differentiation is impaired in the absence of inhibitor of kappa B kinase alpha. *J Biol Chem* 279:54841-54848, 2004
58. van DM, Koedam M, Buurman CJ, Hewison M, Chiba H, Uitterlinden AG, Pols HA, van Leeuwen JP: Evidence for auto/paracrine actions of vitamin D in bone: 1alpha-hydroxylase expression and activity in human bone cells. *FASEB J* 20:2417-2419, 2006
59. Hewison M, Zehnder D, Bland R, Stewart PM: 1alpha-Hydroxylase and the action of vitamin D. *J Mol Endocrinol* 25:141-148, 2000

FIGURES

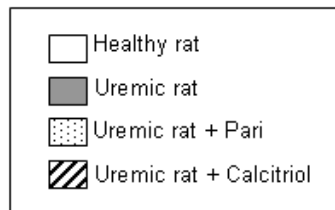
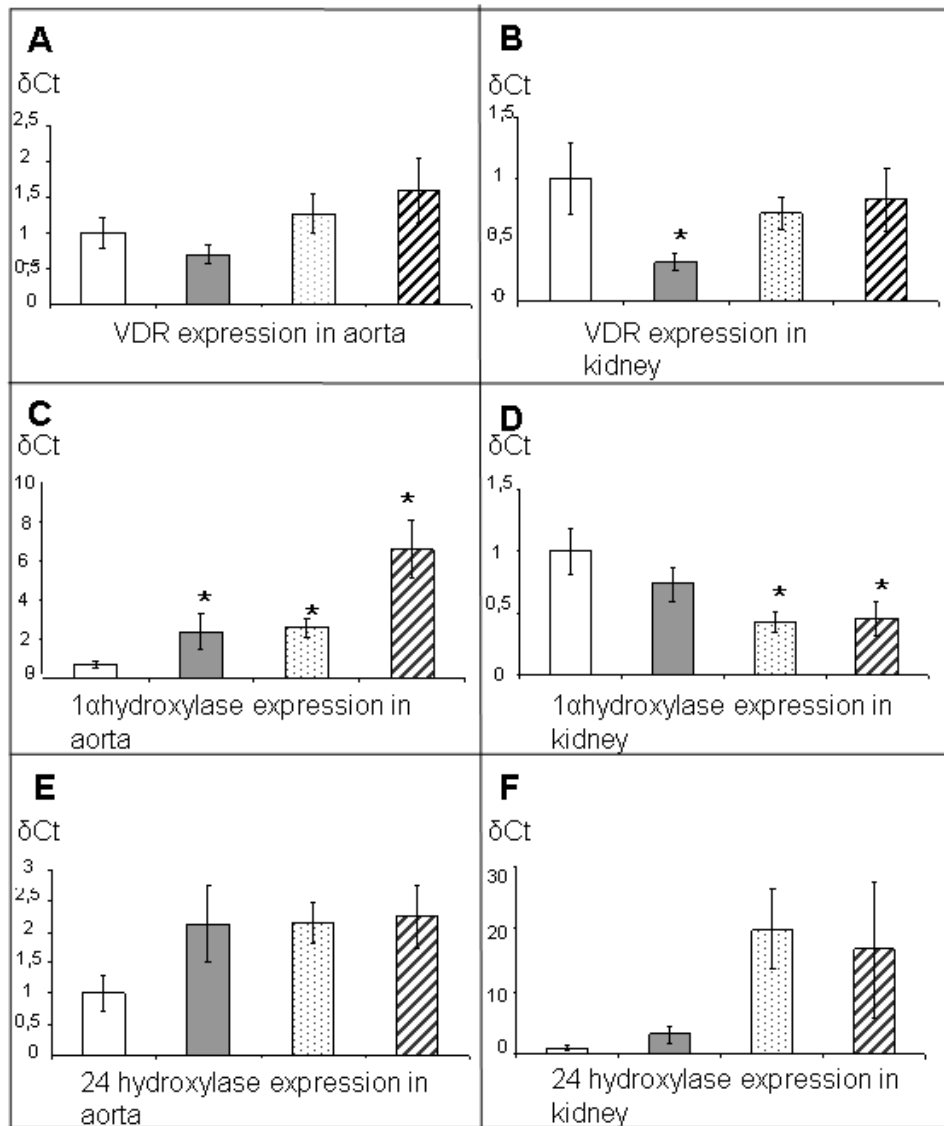


Figure 1

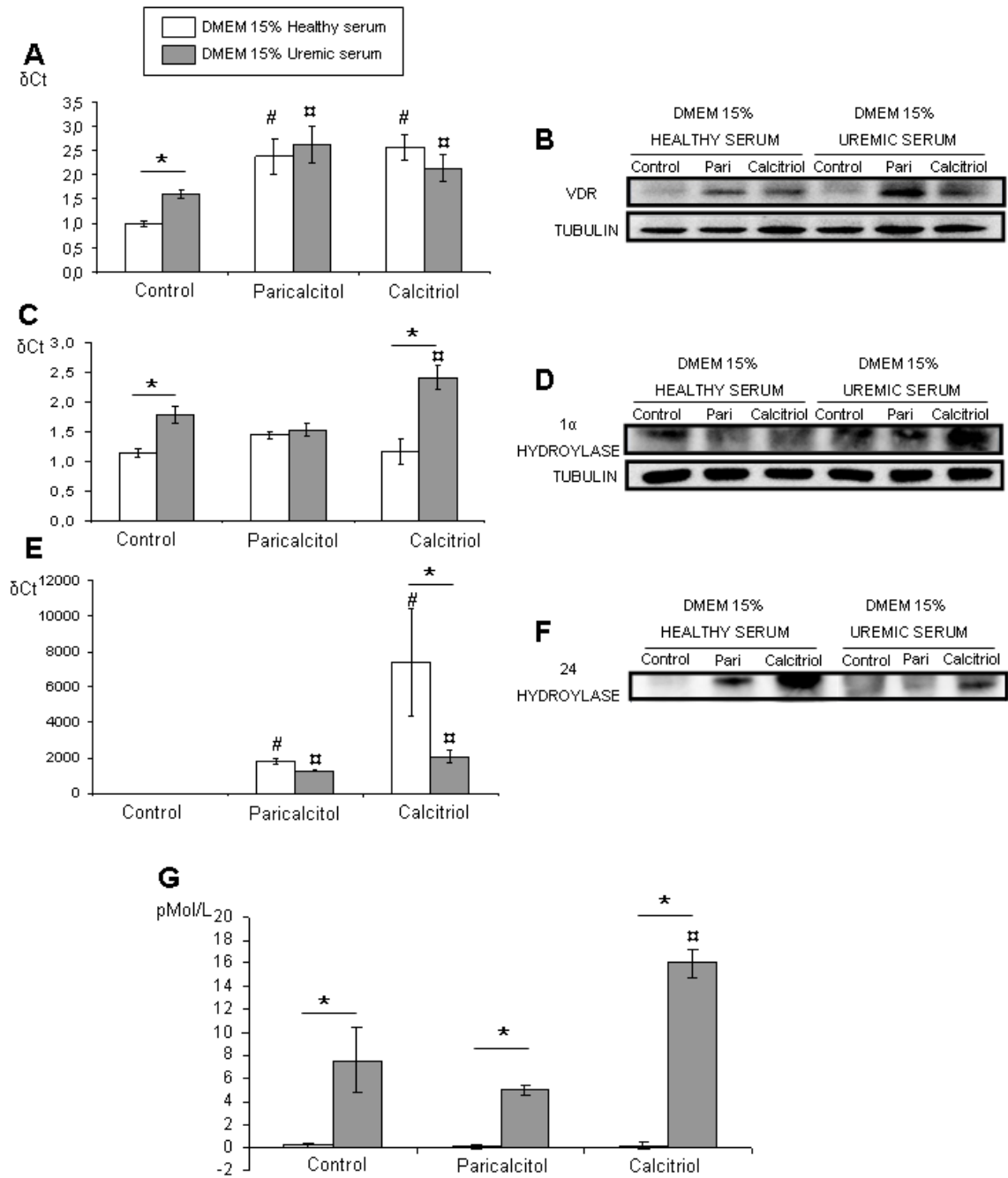


Figure 2

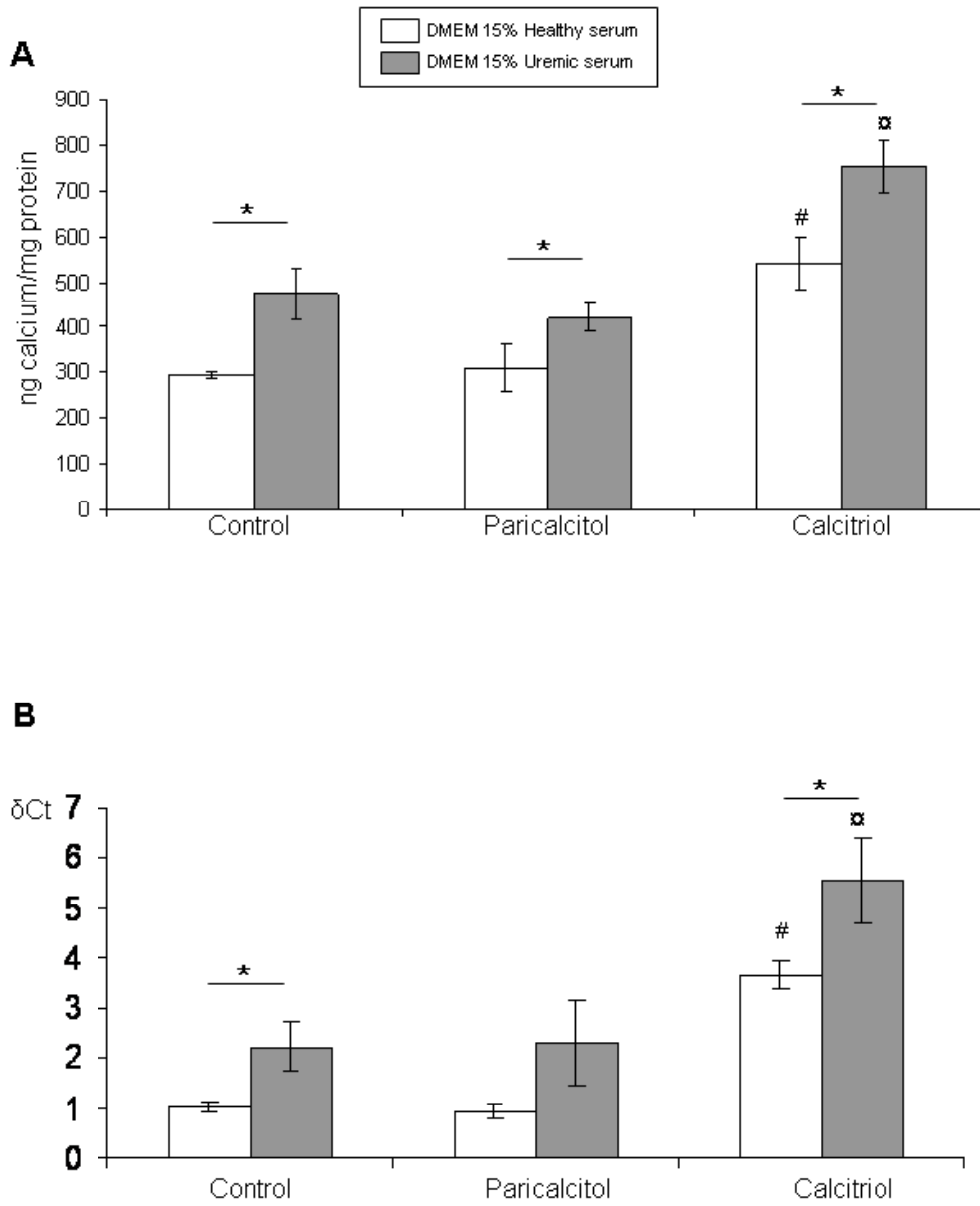


Figure 3

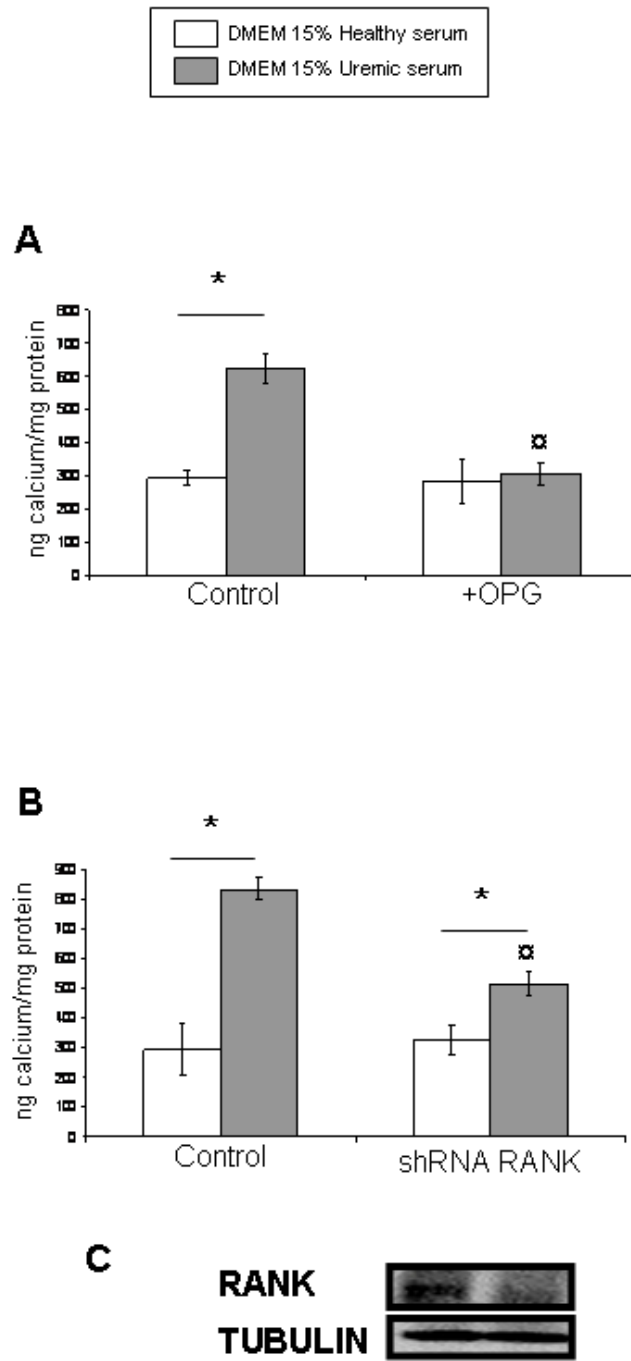


Figure 4

ARTÍCULO 4: High phosphorus diet increases blood pressure by PTH-renin stimulation in vivo.

La dieta alta en fósforo incrementa la presión arterial por la estimulación PTH - renina *in vivo*.

Introducción El fósforo es un elemento esencial para la vida. Sin embargo, la hiperfosfatemia se ha relacionado con riesgo cardiovascular elevado y un aumento de la morbimortalidad por eventos cardiovasculares en pacientes en diálisis. En la enfermedad renal crónica (ERC) la elevación de los niveles de fósforo sérico se asocia con HPT2, alteraciones en el remodelado óseo y calcificaciones vasculares. En pacientes con ERC es de vital importancia el control de los niveles séricos de este ion, controlando su ingesta en la dieta y mediante el uso de quelantes de fósforo. El carbonato de lantano es un quelante de fósforo seguro y efectivo sin efectos tóxicos. Existen multitud de estudios sobre este ion en la enfermedad renal crónica, pero no están del todo claras las consecuencias que tendría la ingesta de una dieta alta en fósforo en individuos con una función renal normal. En teoría en las personas y animales con función renal normal, la homeostasis del calcio y del fósforo se mantiene mediante la interacción de la hormona paratiroidea (PTH) y la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a pesar de las variaciones de la ingesta de fósforo y calcio. Tanto el fósforo como el calcio ingeridos se absorben en el intestino y llegan al torrente sanguíneo, para excretarse por los riñones o almacenarse en el tejido óseo. Algunos estudios sugieren que altos niveles séricos de fósforo puede ser un factor de riesgo para la aterosclerosis coronaria y para la hipertrofia ventricular izquierda en adultos jóvenes sanos. Este estudio busca aclarar cuales son las consecuencias de una dieta con alto contenido en fósforo en animales con función renal normal.

Materiales y Métodos: Ratas Sprague-Dawley se mantuvieron durante 8 semanas con dietas con diferente contenido de fósforo (3 grupos: control, dieta alto fósforo y dieta muy alto fósforo). En la semana 4 se dividieron los grupos con elevado fósforo en 2, a la mitad de los individuos del grupo se le suministró en la dieta carbonato de lantano (5 grupos: control, dieta alto fósforo, dieta alto fósforo+ carbonato de lantano, dieta muy alto fósforo y dieta muy alto fósforo + carbonato de lantano). Transcurridas las 8 semanas se midió la ingesta de agua y alimento y el volumen de orina durante 24 horas. Se recogió sangre y orina para determinar datos bioquímicos. Se obtuvieron las aortas (para determina el contenido en calcio) y los riñones (para determinar la

expresión de renina). Se pesaron los animales y sus corazones, para determinar si existía hipertrofia ventricular izquierda.

Resultados: Las ratas sanas alimentadas con dietas con alto contenido en fósforo presentan un aumento en la presión arterial, que puede ser inhibido al añadir a la dieta un quelante de fósforo, el carbonato lantano. Este aumento es paralelo al incremento en los niveles séricos de PTH, la expresión de renina y los niveles de angiotensina II. No se aprecian diferencias significativas en el contenido de calcio de la aorta con dos meses de tratamiento ni existe evidencias de hipertrofia ventricular izquierda.

Conclusiones: El alto contenido en fósforo de la dieta provoca un aumento de la presión arterial al estimular la síntesis y secreción de PTH. Esta PTH estimula a la renina, responsable del aumento de la presión arterial.

High Phosphorus diet increases Blood pressure by PTH-renin stimulation in vivo

Sara Panizo MSc, Merce Ibarz MD, Eva Parisi PhD, Petya Valcheva MSc, Anna Cardús PhD; Elvira Fernandez Md, PhD, Jose M Valdivielso PhD

ABSTRACT

INTRODUCTION Phosphate is an essential element for life. However hyperphosphatemia has been associated with increased morbidity and mortality in dialysis patients. Lanthanum carbonate is a safe and effective binder with data demonstrating no toxic effects. The effect of inducing hyperphosphatemia diet in people with normal kidney function is not clear. Some studies suggest that higher serum phosphorus levels may be a risk factor for coronary artery atherosclerosis in healthy young adults and phosphate level may be a risk factor for left ventricular hypertrophy in community-dwelling young adults.

MATERIALS AND METHODS Sprague-Dawley rats were maintained during 8 weeks with different diets according to the phosphate content. After one month the groups of rats with high and very high phosphate diets were divided in 2 groups more, according to the addition or not of 3% lanthanum carbonate (Fosrenol® Shire) to the diet for four weeks more. Before the sacrifice blood pressure was measured. Urine was collected to obtain the concentration of calcium, phosphorus and creatinine, and water and food was measured for 24 hours. At the sacrifice a blood sample was extracted and blood biochemistry data were obtained. After death, abdominal aortas were collected to determine calcium content. Kidneys were collected to isolate RNA to determine de renin expression.

RESULTS. Our experiments demonstrated that rats with hyperphosphatemia inducing diets showed an increase in blood pressure, which can be inhibited using lanthanum carbonate. This increase was parallel to an increase in PTH and Angiotensin II levels.

We did not find significant differences in the calcium content of the aorta with two months of treatment.

CONCLUSIONS Our results demonstrate that healthy rats on high phosphate diets show an increase in blood pressure, which is abolished with Lanthanum Carbonate. Those data add to the body of evidence regarding high phosphorus as a cardiovascular risk factor.

INTRODUCTION

Phosphorus (P) is a key element in all known forms of life. Inorganic P in the form of phosphate (PO_4^{3-}) forms part of the structural framework in biological molecules such as DNA and RNA. It is used by the cells to transport cellular energy via adenosine triphosphate (ATP). Phospholipids are the main structural components of all cellular membranes. P is, together with calcium (Ca), one of the most abundant mineral elements in the human body.

The more important stores of P are fundamentally in the mineral skeleton, in the form of hydroxyapatite. An average adult human contains a little less than 1 kg of P, about 85% of which is present in bones and teeth in the form of hydroxyapatite. These reservations are very finely regulated by three hormones (PTH, Vitamin D and FGF23) at three levels: absorption from the intestine, storage in the bone and excretion by the kidney. The failure of this regulation causes that the excesses of P is deposited in soft tissues provoking extraosseus calcifications, including vascular calcifications. An increase in plasmatic P acts promoting PTH's secretion, gene expression and cellular proliferation in the parathyroid gland in a direct way¹⁻³. Besides the direct action that P has on the parathyroid gland, it also inhibits the synthesis of the active form of the vitamin D, 1,25 (OH) 2D3, through an increase in FGF23^{4;5}.

P is absorbed in the intestine by sodium-dependent phosphate transporters⁶. The majority of the plasmatic P is ultrafilterable but more than 85 % of the filtered P is re-absorbed, fundamentally in the proximal tubule and mainly by sodium-dependent phosphate transporters⁷. In vertebrates, two unrelated families of Na⁺-dependent Pi transporters carry out this task: type II Na⁺/Pi cotransporters (SCL34) and type III Na⁺/Pi cotransporters (SLC20). Three closely related type II Na⁺/Pi cotransporters are expressed in the apical membrane of absorptive/reabsorptive epithelia: type IIa⁸, type IIb⁹, and type IIc¹⁰. Type IIa is more abundant in kidneys of adult animals and type IIc in kidneys of young animals and is not detected in the intestine¹⁰. Type IIb is expressed in small intestine and type II in alveolar cells, but not in kidney⁹.

P levels have been associated with mortality in CKD patients¹¹⁻¹⁴. Elevated P levels have been related with cardiovascular changes in CKD patients¹⁵⁻¹⁸ and in patients without renal disease^{19;20}. An animal model of CKD showed that mortality decreased with a low protein and P diet²¹. However the restriction of P in the diet and conventional dialysis are generally not effective controlling hyperphosphatemia in many patients on dialysis, requiring the use of P binders. Aluminum-based binders were once used extensively, but its use was abandoned after it found that prolonged use of them has a high risk of aluminium intoxication that cause anaemia, myopathy, dementia and low turnover bone disease²². They were replaced by the use of calcium-based binders, which were characterized by their poor digestive tolerance, and were associated with calcification in dialysis patients²³. Binders that do not currently provide calcium or aluminium like Lanthanum carbonate are being introduced in clinical practice.

Hypertension represents a powerful risk factor for cardiovascular disease in CKD and is almost invariably present in patients with renal failure. Sodium retention and activation of the renin-angiotensin system have been considered the most important mechanisms involved in the elevation of blood pressure in subjects with kidney disease²⁴. The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) is a hormone system that

regulates blood pressure and water balance. When blood volume is low, the juxtaglomerular cells in the kidneys secrete renin. Renin is released into the blood, and it acts upon a circulating substrate, angiotensinogen (inactive form), that undergoes proteolytic cleavage to form the decapeptide angiotensin I. Vascular endothelium expresses the angiotensin converting enzyme (ACE), that cleaves off two amino acids to form the octapeptide, angiotensin II. Angiotensin II is a hormone, and can act directly on blood vessels to cause blood pressure increases. It also has another even more important function - stimulating the release of aldosterone. Aldosterone is a very powerful vasoconstrictor, it acts in the tubules of the kidneys to retain sodium and water, increasing the volume of fluid in the body, which also increases blood pressure.

In the present study we analyze the effect of diets rich in P in cardiac function of animals with normal renal function.

MATERIALS AND METHODS

In vivo studies

Experimental animals

Sprague-Dawley rats (200-225 g) were maintained during 8 weeks in different diets according of the P content. During the first month rats were divided in 3 groups of diet: Maintenance diet (Harlam) (n=8), high P diet (Altromin) (n=16) and very high P diet (Altromin) (n=16). P content in each diet was: maintenance diet 0.60%, high P diet 1.2% and very high diet 2%. After 4 weeks systolic (SAP) and diastolic arterial pressures (DAP) were measured by the tail-cuff method (LSI Letica, Barcelona, Spain). After one month, half of the animals in the high and very high diets were divided in 2 more groups, by the addition of 3% lanthanum carbonate (Fosrenol® Shire) to the diet.

Therefore 5 different groups of rats were maintained during four weeks more with different diets: Maintenance diet (n=8), high P diet (n=8), high P diet plus lanthanum carbonate (n=8), very high P diet (n=8) and very high P diet plus lanthanum carbonate (n=8). During the last week SAP and DAP were measured again, and urine from 24 hours was collected to obtain biochemistry data, and water and food intake was measured. At sacrifice a blood sample was extracted and blood biochemistry data were obtained. After death, abdominal aortas were collected to determine Ca content. Kidneys were collected to isolate RNA.

Aortic Calcium Content

Aortas were washed with saline and homogenized in 0.6 N HCl for 24 hours. After centrifugation, the debris was transferred to lysis buffer (125 mM Tris, 2% SDS, pH 6.8), and total protein was extracted. Ca content was determined in the HCl solution by the O-cresolphthalein complexone method and total protein by the Lowry method (Bio-Rad)²⁵.

Blood pressure determination

Systolic arterial pressure (SAP), diastolic arterial pressure (DAP) and media pulse pressure (PP) were measured by the tail-cuff method (LSI Letica, Barcelona, Spain)

Real Time PCR

Total cellular RNA was isolated from kidney samples by Trizol (Sigma) method. Reverse transcription was performed with the first-strand DNA synthesis kit for RT-PCR (Roche Diagnostics). We used Taqman real time-PCR amplification with gene-specific primer for Renin (Gene Expression Assays from Applied Biosystems), using rat glyceraldehyd-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) as a reference, with an ABI Prism

7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). The relative RNA amount was calculated by standard formulae. Average and standard error from three experiments were calculated.

ELISA

Circulating levels of 1,25(OH)₂D₃, PTH and Angiotensin II were determined by commercially available ELISAs Kits (Immunodiagnosics Systems, Immunotopics and Spibio respectibily)

Biochemistry data

Blood and urine obtained at the end of the experiment was analyzed for Ca, P, Na and creatinine. Biochemistry was analyzed using a multichannel autoanalyzer (Roche/Hitachi Modular Analytics), using the following methods: 1) for calcium the o-cresolphthalein complexone method, 2) for P the ammonium molybdate method, 3) for sodium sensitive electrodes and 4) for creatinine the Jaffé reaction.

Statistical Analysis

Differences between groups were assessed by ANOVA, followed by the Dunnet posthoc test. A $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Effect of high P diet on blood pressure

High P diets significantly increased SAP (Fig 1A), DAP (Fig 1B) and MAP (Fig 1C). The addition of the P binder Lanthanum carbonate on the diet abrogated these effects on blood pressure. Pulse pressure (Fig 1D) and heart rate (data not shown) were not modified by the diet.

Effect of high P diet on ions levels in blood o urine

Serum P concentration significantly increased in serum in all the special diets at the end of the treatments (Fig 2A). Ca levels in serum are higher in animals maintained in diets with elevated P (Figure 2D). Lanthanum carbonate addition was able to decrease the Ca levels in the high P diet but not in the very high P diet. CaxP product (Fig 2G) product was elevated in all the groups that contained high P in the diet, independently of the addition of the P binder. Urinary (Fig2B) and fractional excretion of P (Fig 2C) increased with both diets, and this excretion decreased when the P binder was added. Urinary excretion of Calcium did not show any differences between groups (Figure 2E), however fractional excretion of calcium decreased lightly in all the groups (Figure2F)

Urinary excretion of sodium was also increased in all the groups (Figure 3A). There were not significant differences in creatinine clearance between groups (3B). However, diuresis was increased in the animals in both diets, independently of the addition of the P binder (Figure 3C).

Effects of high P diets on PTH and vitamin D.

PTH levels increased in animals with high P diet, however, addition of the binder induced a decrease in PTH levels (Fig 4A). 1,25(OH)₂D₃ concentration in serum is significantly increased in all the diets, independently of the addition of the binder (Fig 4B).

Effect of high P diet on the Renin-Angiotensin system

In order to determine whether the changes in blood pressure were related to the Renin-Angiotensin system we analyzed the expression of renin by Real Time PCR (Fig 5A) and the levels of angiotensin II by ELISA (Fig 5B). were increased the in groups

with high and very high P diets. Lanthanum carbonate addition to the diet provokes a decrease in both.

Effect of high P diet on vascular calcification

We analyzed the level of calcification in the aortas of rats of different groups and we did not find significant differences between groups (Fig 6A), despite the increase in serum P levels observed.

Effect of high P diet on water and food intake, weight gain and in the ratio heart weight / body weight

There are not differences between groups in grams of food and water intake (Fig 7A, 7B), neither in the ratio heart weight / body weight (7D) However we can find and significant increase of the weight in rats with high and very high P diets (Fig 7C).

DISCUSSION

In this study we demonstrated that high P diet provokes an increase in blood pressure in healthy animals. This increase disappears by the addition to the diet of a P binder, lanthanum carbonate, suggesting a direct effect of P load on blood pressure. Huang et al²⁶ studied the relation between serum P levels and blood pressure in haemodialysis patients in a prospective cohort study. They concluded that serum P level is strongly and independently associated with blood pressure in haemodialysis patients. In our study the increase in blood pressure was parallel to an increase in PTH levels that is also blunted by the addition of the P binder. Hyperparathyroidism is also related to arterial hypertension and activation of the RAAS system. Parathyroidectomy reverses the effects, suggesting the high PTH levels can increase blood pressure by a direct effect²⁷⁻³⁴. The study from Genary shows that blood pressure, plasma renin

activity (PRA) and plasma aldosterone levels became normal in 8 of 10 hypertensive primary hyperparathyroidism patients after the surgery. These results are consistent with the hypothesis of a direct effect of PTH on renin secretion which could contribute to the pathogenesis of hypertension and to the vessels sensitization to pressor agents. A similar study from Bernini et al³⁵ shows how after the surgery in hypertensive patients with primary hyperparathyroidism, PTH and PRA did not differ from the values in normotensive primary hyperparathyroidism. Smith et al³⁶ studied the interaction between PTH and the RAAS in dogs. An intravenous infusion of bovine PTH provoked an important increase in plasma renin activity. Sodium and P excretion also increased. The endogenous secretion of PTH was stimulated by infusion of citrate to determine if the stimulatory effect on renin occurred with endogenous secretion of PTH. P excretion increased, which confirmed PTH secretion. There was a significant rise in both plasma renin activity and sodium excretion, the magnitude of the sodium response modulating the increase in PRA. Data from Evenepoel³⁷ in kidney transplant patients are in agreement with a stimulatory effect of PTH on plasma renin activity. Glomeruli have PTH receptors that are stimulatory coupled to adenylate cyclase. PTH increases cAMP levels which increase renin secretion³⁸. In summary all these studies explain the relation between PTH and the RAAS system. Thus, in our experimental settings, high P intake stimulates PTH secretion. The increase in PTH levels could be the responsible for the elevation of the renin and angiotensin II and, thus for the increases in blood pressure. In our experiments the addition of Lanthanum carbonate to the diet blunted the increase PTH and Angiotensin II serum levels and renin expression in the kidney. SBP and DBP followed the same pattern. These effects suggest that the increase of blood pressure is an effect of the increase in PTH induced by the high P diet. Although the addition of the P binder reduces the serum level of angiotensin II they do not reach basal levels and remain elevated. However, renin expression goes down to basal levels. This effect has been observed before³⁹ and could be due to the fact that renin is synthesized and

stored in substantial quantities in the granules of juxtaglomerular cells and is released in response to various stimuli^{40;41}. Thus, large changes in plasma renin levels can occur rapidly, leading to changes in angiotensin generation with no changes in renin mRNA.

Our results also show that $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ levels were also increased. This increase is probably due to the stimulatory effect that the PTH has on 1 alpha hydroxylase activity in the kidney. 1 alpha hydroxylase is the enzyme responsible to obtain the active form of the vitamin D. It is described that vitamin D receptor (VDR) activation suppresses the expression of angiotensinogen, angiotensin II type 1 receptor, and renin receptor in the kidneys⁴². Clinical observations show an inverse relationship among plasma vitamin D3 levels and blood pressure and plasma renin activity⁴³⁻⁴⁵, furthermore vitamin D supplementation reduces blood pressure in hypertensive patients^{46;47}. Li et al⁴⁸ showed that VDR is a primary negative regulator of renin expression⁴⁹. In our case, it seems that the effect of vitamin D decreasing renin expression is not enough to overcome the stimulation induced by PTH, at least when the P binder is absent. When lanthanum carbonate was added to the diet the levels of PTH are lower with no effect on vitamin D levels. In those cases renin expression is down to normal, suggesting that the stimulatory effect of the PTH can be eliminated by the high levels of vitamin D.

P levels correlate with vascular calcification in both animal and humans models with advanced chronic kidney disease, but whether this relationship exists among individuals with normal kidney function is not clear. Some authors refer to calcium and P as "passive mechanisms of calcification." Elevated levels of Ca, P and CaxP (prevalent in patients with CKD and significantly associated with death from cardiovascular disease in these patients¹¹) promote the formation of nuclei of bioapatite crystals and their growth¹³. In vitro studies found that when VSMC were incubated with high concentrations of calcium and P, bioapatite accumulates in the extracellular matrix. This process is not just a passive precipitation of divalent ions, but it involves a phenotypic

change of VSMC and up-regulation of genes commonly associated with bone differentiation⁵⁰⁻⁵². High P levels stimulate the activity of a phosphate sodium cotransporter (Pit-1), and also high calcium increases the expression of Pit-1. This transporter allows the accumulation of P within the cell, which serves as a signal for the expression of osteogenic genes. The combination of these factors leads to the transformation of the cell to become susceptible to calcification⁵³. More over studies from Foley^{54;55} et al determined the association between P levels and coronary artery calcium levels in a community-based cohort of healthy young adults. They conclude that higher serum P levels, even within the normal range, may be a risk factor for coronary artery atherosclerosis in healthy young adults and P level may be a risk factor for left ventricular hypertrophy in community-dwelling young adults. Vascular calcification is associated with increases in blood pressure and pulse pressure, due to changes in the stiffness of the artery. Recent studies indicate that pulse pressure is an independent risk factor for left ventricular hypertrophy, myocardial infarction, congestive heart failure and stroke⁵⁶. In hypertension, left ventricular hypertrophy is initially a useful compensatory process that represents an adaptation to increased ventricular wall stress⁵⁷. In our animals, the stiffness of the artery did not suffer any significant change although a small, but we detected an not significant increase in calcium content in the artery of the animals with high P diet. was detected in our animals fed with high P diets. In addition, no increase in the ratio heart/body weight was detected, suggesting the absence of left ventricular hypertrophy.

Our animals with high P diets show higher serum levels of this ion. P binder has not effect over blood levels, probably due to the fact that vitamin D levels were still high in those animals. Renal excretion of P is regulated by the glomerular filtration rate and the maximal rate of tubular reabsorption. P reabsorption in the proximal tubule is mediated by Na⁺-dependent, secondary-active transport mechanisms⁵⁸, P absorption is accompanied by sodium. The major hormonal regulator of the reabsorption of P is PTH,

which decreases the rate of tubular reabsorption, increasing renal excretion of P. As we show in the results, high P diet groups shows a PTH increases that it could affect urinary excretion of P with an increase in the Na excretion. The principal physiological effect of PTH is on the regulation of renal tubular electrolyte and water transport⁵⁹. It is well known that an increase in the endogenous secretion of PTH can decrease sodium reabsorption by the proximal tubule⁶⁰ and induces dysregulation in the activity, traffic and expression of renal sodium transporters⁶¹. Elevated PTH levels produce an increase in natriuresis that is followed by polyuria. Urinary excretion of sodium and urine volume is increase in all the groups with high P diets. This increase is due to the elevation in PTH. However the addition of the P binder does not produce a decrease of the urinary sodium excretion although PTH levels go down. This may be due to the fact that, in parallel to a reduction of PTH, there is also a reduction of Angiotensin II levels. Thus, a decrease in angiotensin II will reduce the tubular reabsorption of sodium and water, thereby compensating the effect of an increase in tubular reabsorption induced by the decrease in PTH⁶².

Serum P plays a vital role in maintaining calcium homeostasis: a high concentration of P stimulates the secretion of PTH, which increases the release of calcium from bone and reduces renal excretion of this ion⁶³⁻⁶⁵. In our experiments we show that diets with high P induce an increase in serum levels of calcium, together with a reduction of the fractional excretion of the same ion, indicating an increase in calcium reabsorption. All these effects are probably due to the action of PTH. Lanthanum carbonate decreases blood calcium level in the group fed with high P diet but not in the very high one. This effect could be due to the higher levels of vitamin D in the very high P diet plus lanthanum carbonate which will induce a higher calcium absorption by the gut.

In conclusion hyperphosphatemia-inducing diets in healthy animals provoke and increase in systolic, diastolic and media pressure, probably due to the elevation of PTH and the consequent activation of the RAAS system. The use of a phosphate binder, Lanthanum carbonate, inhibits this effect.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Changes of blood pressure in rats fed with high P (dark blue), high P plus Lanthanum carbonate (pink), very high P (yellow) and very high P plus Lanthanum carbonate (light blue) diets. Effect in systolic blood pressure (A), diastolic blood pressure (B), media blood pressure (C) and pulse pressure (D). *p < 0.05 rat fed with high/very high P diet; versus rats fed with same diet plus Lanthanun carbonate.

Figure 2. Serum levels of P (A), Ca (D) and CaxP product (G), urinary (B) and fractional excretion of P (C), and urinary (E) and fractional excretion of Ca (F). *p < 0.05 vs. rats fed with normal diet; # p < 0.05 vs. rats fed with same diet plus Lanthanun carbonate

Figure 3. Urinary excretion of Na (A), creatinine clearance (B) and diuresis were determined in all the groups *p < 0.05 vs. rats fed with normal diet.

Figure 4 Serum levels of PTH (A) and 1,25(OH)2D3 (B) in the 5 groups. *p < 0.05 vs. rats fed with normal diet. # p < 0.05 vs. rats fed with same diet plus Lanthanun carbonate.

Figure 5 Renin expression (A) and Angiotensin II levels in serum (B) determined in all groups. *p < 0.05 vs. rats fed with normal diet: # p < 0.05 vs. rats fed with same diet plus Lanthanun carbonate

Figure 6. Aortic calcium content were determined in all the groups Dara are means +- SEM

Figure 7. Intake of food (A) and water (B) determined in metabolic jails for 24h; increase in weight during the 2 months of the experiment (7C), and in ratio heart weight / body weight (7D) *p < 0.05 vs. rats fed with normal diet.

BIBLIOGRAPHY

1. Almaden Y, Canalejo A, Hernandez A, Ballesteros E, Garcia-Navarro S, Torres A, Rodriguez M: Direct effect of phosphorus on PTH secretion from whole rat parathyroid glands in vitro. *J Bone Miner Res* 11:970-976, 1996
2. Kilav R, Silver J, Naveh-Many T: Parathyroid hormone gene expression in hypophosphatemic rats. *J Clin Invest* 96:327-333, 1995
3. Slatopolsky E, Finch J, Denda M, Ritter C, Zhong M, Dusso A, MacDonald PN, Brown AJ: Phosphorus restriction prevents parathyroid gland growth. High phosphorus directly stimulates PTH secretion in vitro. *J Clin Invest* 97:2534-2540, 1996
4. Berndt TJ, Craig TA, McCormick DJ, Lanske B, Sitara D, Razzaque MS, Pragnell M, Bowe AE, O'Brien SP, Schiavi SC, Kumar R: Biological activity of FGF-23 fragments. *Pflugers Arch* 454:615-623, 2007
5. Krajcnik T, Bjorklund P, Marsell R, Ljunggren O, Akerstrom G, Jonsson KB, Westin G, Larsson TE: Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1alpha-hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *J Endocrinol* 195:125-131, 2007
6. Hildmann B, Storelli C, Danisi G, Murer H: Regulation of Na⁺-Pi cotransport by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in rabbit duodenal brush-border membrane. *Am J Physiol* 242:G533-G539, 1982
7. Berndt TJ, Schiavi S, Kumar R: "Phosphatonins" and the regulation of phosphorus homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol* 289:F1170-F1182, 2005
8. Magagnin S, Werner A, Markovich D, Sorribas V, Stange G, Biber J, Murer H: Expression cloning of human and rat renal cortex Na/Pi cotransport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5979-5983, 1993
9. Hilfiker H, Hattenhauer O, Traebert M, Forster I, Murer H, Biber J: Characterization of a murine type II sodium-phosphate cotransporter expressed in mammalian small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14564-14569, 1998
10. Segawa H, Kaneko I, Takahashi A, Kuwahata M, Ito M, Ohkido I, Tatsumi S, Miyamoto K: Growth-related renal type II Na/Pi cotransporter. *J Biol Chem* 277:19665-19672, 2002
11. Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK: Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: A national study. *Am J Kidney Dis* 31:607-617, 1998
12. Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie EG, Chertow GM: Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 15:2208-2218, 2004

13. Block GA, Port FK: Re-evaluation of risks associated with hyperphosphatemia and hyperparathyroidism in dialysis patients: Recommendations for a change in management. *Am J Kidney Dis* 35:1226-1237, 2000
14. Kestenbaum B, Sampson JN, Rudser KD, Patterson DJ, Seliger SL, Young B, Sherrard DJ, Andress DL: Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 16:520-528, 2005
15. Marchais SJ, Metivier F, Guerin AP, London GM: Association of hyperphosphataemia with haemodynamic disturbances in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 14:2178-2183, 1999
16. Marco MP, Craver L, Betriu A, Belart M, Fibla J, Fernandez E: Higher impact of mineral metabolism on cardiovascular mortality in a European hemodialysis population. *Kidney Int* 63:S111-S114, 2003
17. Young EW, Akiba T, Albert JM, McCarthy JT, Kerr PG, Mendelssohn DC, Jadoul M: Magnitude and impact of abnormal mineral metabolism in hemodialysis patients in the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Am J Kidney Dis* 44:34-38, 2004
18. Craver L, Marco MP, Martinez I, Rue M, Borrás M, Martín ML, Sarro F, Valdivielso JM, Fernandez E: Mineral metabolism parameters throughout chronic kidney disease stages 1-5 - achievement of K/DOQI target ranges. *Nephrology Dialysis Transplantation* 22:1171-1176, 2007
19. Muray S, Parisi E, Cardus A, Craver L, Fernandez E: Influence of vitamin D receptor gene polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D on blood pressure in apparently healthy subjects. *J Hypertens* 21:2069-2075, 2003
20. Dhingra R, Sullivan LM, Fox CS, Wang TJ, D'Agostino RB, Sr., Gaziano JM, Vasan RS: Relations of serum phosphorus and calcium levels to the incidence of cardiovascular disease in the community. *Arch Intern Med* 167:879-885, 2007
21. Barsotti G, Moriconi L, Cupisti A, Dani L, Ciardella F, Lupetti S, Giovannetti S: Protection of renal function and of nutritional status in uremic rats by means of a low-protein, low-phosphorus supplemented diet. *Nephron* 49:197-202, 1988
22. Wills MR, Savory J: Aluminium poisoning: dialysis encephalopathy, osteomalacia, and anaemia. *Lancet* 2:29-34, 1983
23. Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, Yoon C, Gales B, Sider D, Wang Y, Chung J, Emerick A, Greaser L, Elashoff RM, Salusky IB: Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med* 342:1478-1483, 2000
24. Guyton AC, Coleman TG: Quantitative analysis of the pathophysiology of hypertension. 1969. *J Am Soc Nephrol* 10:2248-2258, 1999
25. Cardus A, Panizo S, Parisi E, Fernandez E, Valdivielso JM: Differential Effects of Vitamin D Analogues on Vascular Calcification. *J Bone Miner Res* 2007

26. Huang CX, Plantinga LC, Fink NE, Melamed ML, Coresh J, Powe NR: Phosphate levels and blood pressure in incident hemodialysis patients: a longitudinal study. *Adv Chronic Kidney Dis* 15:321-331, 2008
27. Gennari C, Nami R, Gonnelli S: Hypertension and primary hyperparathyroidism: the role of adrenergic and renin-angiotensin-aldosterone systems. *Miner Electrolyte Metab* 21:77-81, 1995
28. Vazquez-Diaz O, Castillo-Martinez L, Orea-Tejeda A, Orozco-Gutierrez JJ, sensio-Lafuente E, Reza-Albarran A, Silva-Tinoco R, Rebollar-Gonzalez V: Reversible changes of electrocardiographic abnormalities after parathyroidectomy in patients with primary hyperparathyroidism. *Cardiol J* 16:241-245, 2009
29. Andersson P, Rydberg E, Willenheimer R: Primary hyperparathyroidism and heart disease--a review. *Eur Heart J* 25:1776-1787, 2004
30. Silverberg SJ: Editorial: cardiovascular disease in primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3513-3514, 2000
31. Nappi S, Saha H, Virtanen V, Limnell V, Sand J, Salmi J, Pasternack A: Left ventricular structure and function in primary hyperparathyroidism before and after parathyroidectomy. *Cardiology* 93:229-233, 2000
32. Marx SJ: Hyperparathyroid and hypoparathyroid disorders. *N Engl J Med* 343:1863-1875, 2000
33. Lafferty FW: Primary hyperparathyroidism. Changing clinical spectrum, prevalence of hypertension, and discriminant analysis of laboratory tests. *Arch Intern Med* 141:1761-1766, 1981
34. Kovacs L, Goth MI, Szabolcs I, Dohan O, Ferencz A, Szilagyi G: The effect of surgical treatment on secondary hyperaldosteronism and relative hyperinsulinemia in primary hyperparathyroidism. *Eur J Endocrinol* 138:543-547, 1998
35. Bernini G, Moretti A, Lonzi S, Bendinelli C, Miccoli P, Salvetti A: Renin-angiotensin-aldosterone system in primary hyperparathyroidism before and after surgery. *Metabolism* 48:298-300, 1999
36. Smith JM, Mouw DR, Vander AJ: Effect of parathyroid hormone on plasma renin activity and sodium excretion. *Am J Physiol* 236:F311-F319, 1979
37. Evenepoel P, Claes K, Kuypers D, Maes B, Vanrenterghem Y: Impact of parathyroidectomy on renal graft function, blood pressure and serum lipids in kidney transplant recipients: a single centre study. *Nephrol Dial Transplant* 20:1714-1720, 2005
38. Dworkin LD, Ichikawa I, Brenner BM: Hormonal modulation of glomerular function. *Am J Physiol* 244:F95-104, 1983
39. Morishita R, Higaki J, Nagano M, Nakamura F, Tomita N, Zhao Y, Mikami H, Miyazaki M, Ogihara T: Discrepancy between renin mRNA and plasma renin

- level in angiotensin-converting enzyme inhibitor-treated rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 20:15-20, 1993
40. Schweda F, Kurtz A: Cellular mechanism of renin release. *Acta Physiol Scand* 181:383-390, 2004
 41. Paul M, Poyan MA, Kreutz R: Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 86:747-803, 2006
 42. Porsti IH: Expanding targets of vitamin D receptor activation: downregulation of several RAS components in the kidney. *Kidney Int* 74:1371-1373, 2008
 43. Kristal-Boneh E, Froom P, Harari G, Ribak J: Association of calcitriol and blood pressure in normotensive men. *Hypertension* 30:1289-1294, 1997
 44. Lind L, Hanni A, Lithell H, Hvarfner A, Sorensen OH, Ljunghall S: Vitamin D is related to blood pressure and other cardiovascular risk factors in middle-aged men. *Am J Hypertens* 8:894-901, 1995
 45. Burgess ED, Hawkins RG, Watanabe M: Interaction of 1,25-dihydroxyvitamin D and plasma renin activity in high renin essential hypertension. *Am J Hypertens* 3:903-905, 1990
 46. Lind L, Wengle B, Wide L, Ljunghall S: Reduction of blood pressure during long-term treatment with active vitamin D (alphacalcidol) is dependent on plasma renin activity and calcium status. A double-blind, placebo-controlled study. *Am J Hypertens* 2:20-25, 1989
 47. Pfeifer M, Begerow B, Minne HW, Nachtigall D, Hansen C: Effects of a short-term vitamin D(3) and calcium supplementation on blood pressure and parathyroid hormone levels in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1633-1637, 2001
 48. Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP: 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 110:229-238, 2002
 49. Yuan W, Pan W, Kong J, Zheng W, Szeto FL, Wong KE, Cohen R, Klopot A, Zhang Z, Li YC: 1,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses renin gene transcription by blocking the activity of the cyclic AMP response element in the renin gene promoter. *J Biol Chem* 282:29821-29830, 2007
 50. Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebersold R, Schinke T, Karsenty G, Giachelli CM: Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res* 89:1147-1154, 2001
 51. Moe SM, O'Neill KD, Duan D, Ahmed S, Chen NX, Leapman SB, Fineberg N, Kopecky K: Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins. *Kidney Int* 61:638-647, 2002

52. Moe SM, Duan D, Doehle BP, O'Neill KD, Chen NX: Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels. *Kidney Int* 63:1003-1011, 2003
53. Giachelli CM: Vascular calcification mechanisms. *J Am Soc Nephrol* 15:2959-2964, 2004
54. Foley RN, Collins AJ, Herzog CA, Ishani A, Kalra PA: Serum phosphate and left ventricular hypertrophy in young adults: the coronary artery risk development in young adults study. *Kidney Blood Press Res* 32:37-44, 2009
55. Foley RN, Collins AJ, Herzog CA, Ishani A, Kalra PA: Serum phosphorus levels associate with coronary atherosclerosis in young adults. *J Am Soc Nephrol* 20:397-404, 2009
56. Di B, V, Pedrinelli R, Giorgi D, Bertini A, Caputo MT, Cioppi A, Talini E, Leonardo M, Dell'Omo G, Paterni M, Giusti C: Microalbuminuria, pulse pressure, left ventricular hypertrophy, and myocardial ultrasonic tissue characterization in essential hypertension. *Angiology* 52:175-183, 2001
57. Gabiti-Rosei E, Muiesan ML, Salvetti M: New approaches to the assessment of left ventricular hypertrophy. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 1:119-128, 2007
58. Murer H, Hernando N, Forster I, Biber J: Proximal tubular phosphate reabsorption: molecular mechanisms. *Physiol Rev* 80:1373-1409, 2000
59. Kimmel, PL, Rivera, A, and Khatri, P. Effects of nonrenal hormones on the normal kidney. In: *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*. Becker KL. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 1885-1895. 2001.
Ref Type: Generic
60. Schneider EG: Effect of parathyroid hormone secretion on sodium reabsorption by the proximal tubule. *Am J Physiol* 229:1170-1173, 1975
61. Wang W, Li C, Kwon TH, Miller RT, Knepper MA, Frokiaer J, Nielsen S: Reduced expression of renal Na⁺ transporters in rats with PTH-induced hypercalcemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 286:F534-F545, 2004
62. Schrier, R W. Diseases of the kidney & urinary tract. Lippincott Williams & Wilkins. 2007.
Ref Type: Generic
63. Silver J, Kilav R, Naveh-Many T: Mechanisms of secondary hyperparathyroidism. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F367-F376, 2002
64. Naveh-Many T, Silver J: Regulation of parathyroid hormone gene expression by hypocalcemia, hypercalcemia, and vitamin D in the rat. *J Clin Invest* 86:1313-1319, 1990
65. Moallem E, Kilav R, Silver J, Naveh-Many T: RNA-Protein binding and post-transcriptional regulation of parathyroid hormone gene expression by calcium and phosphate. *J Biol Chem* 273:5253-5259, 1998

FIGURES

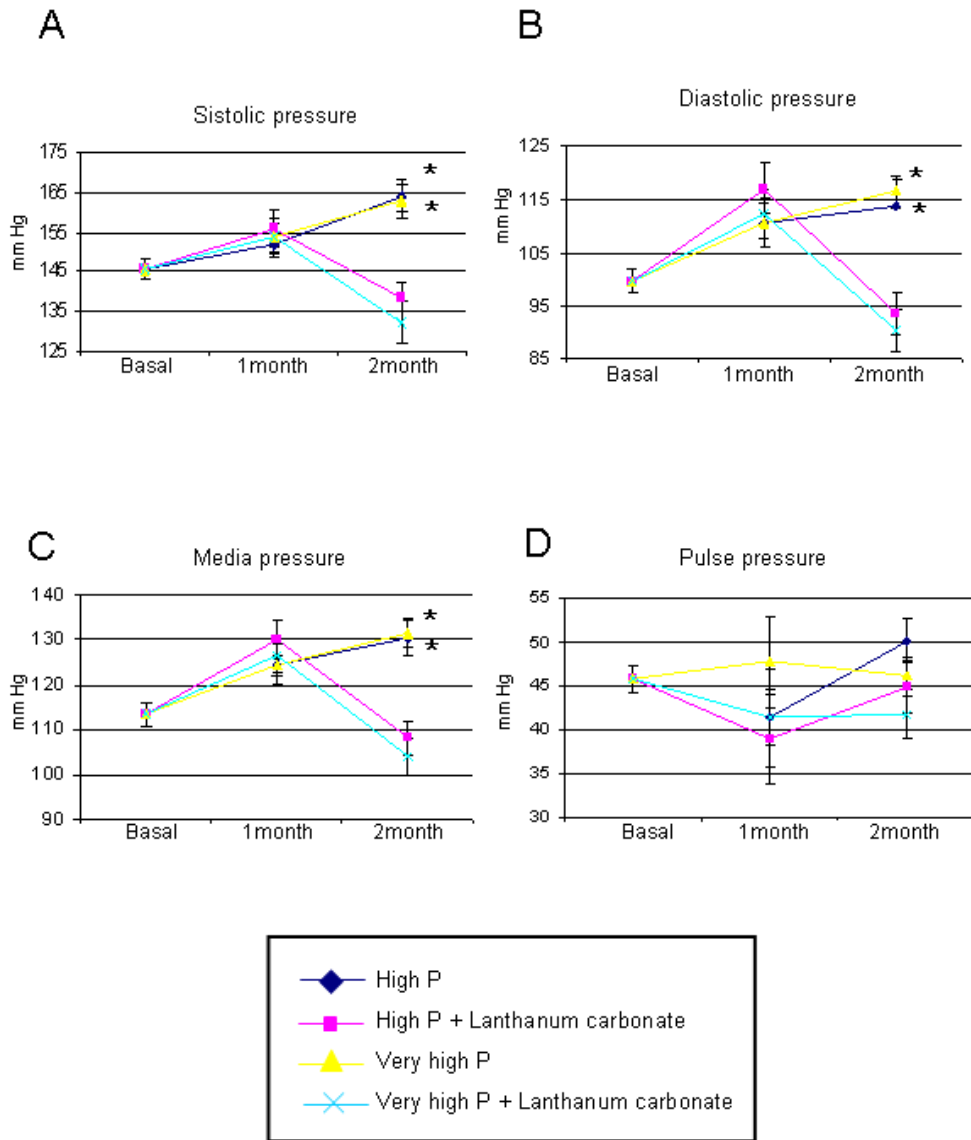


Figure 1

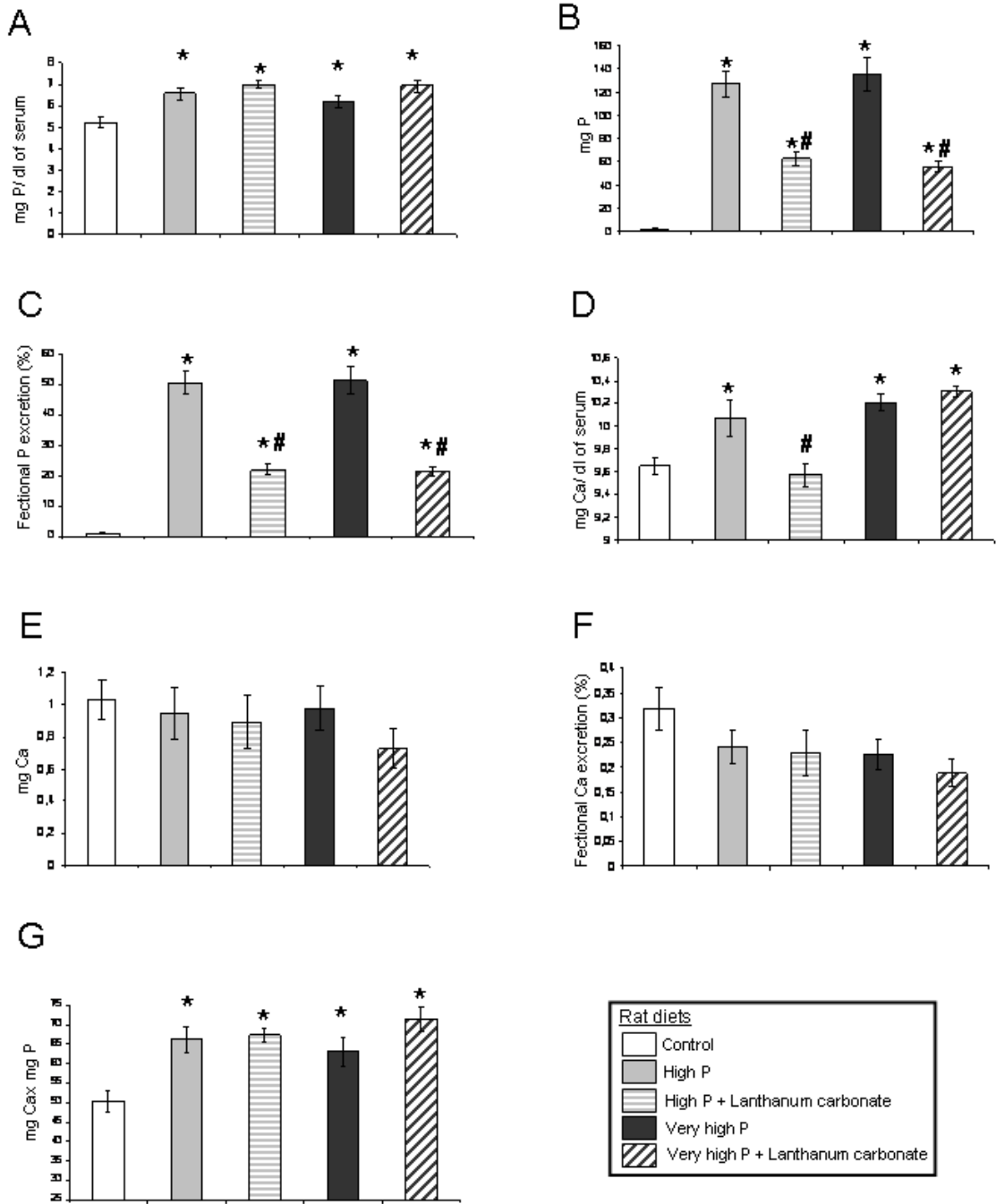


Figure 2

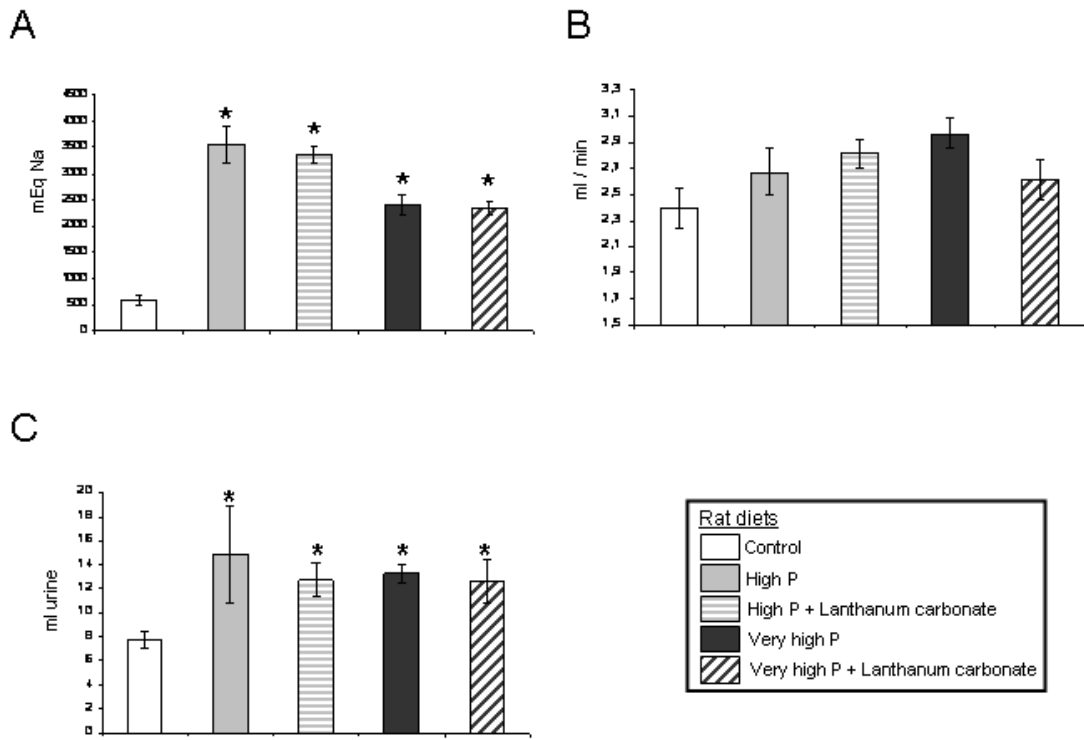


Figure 3

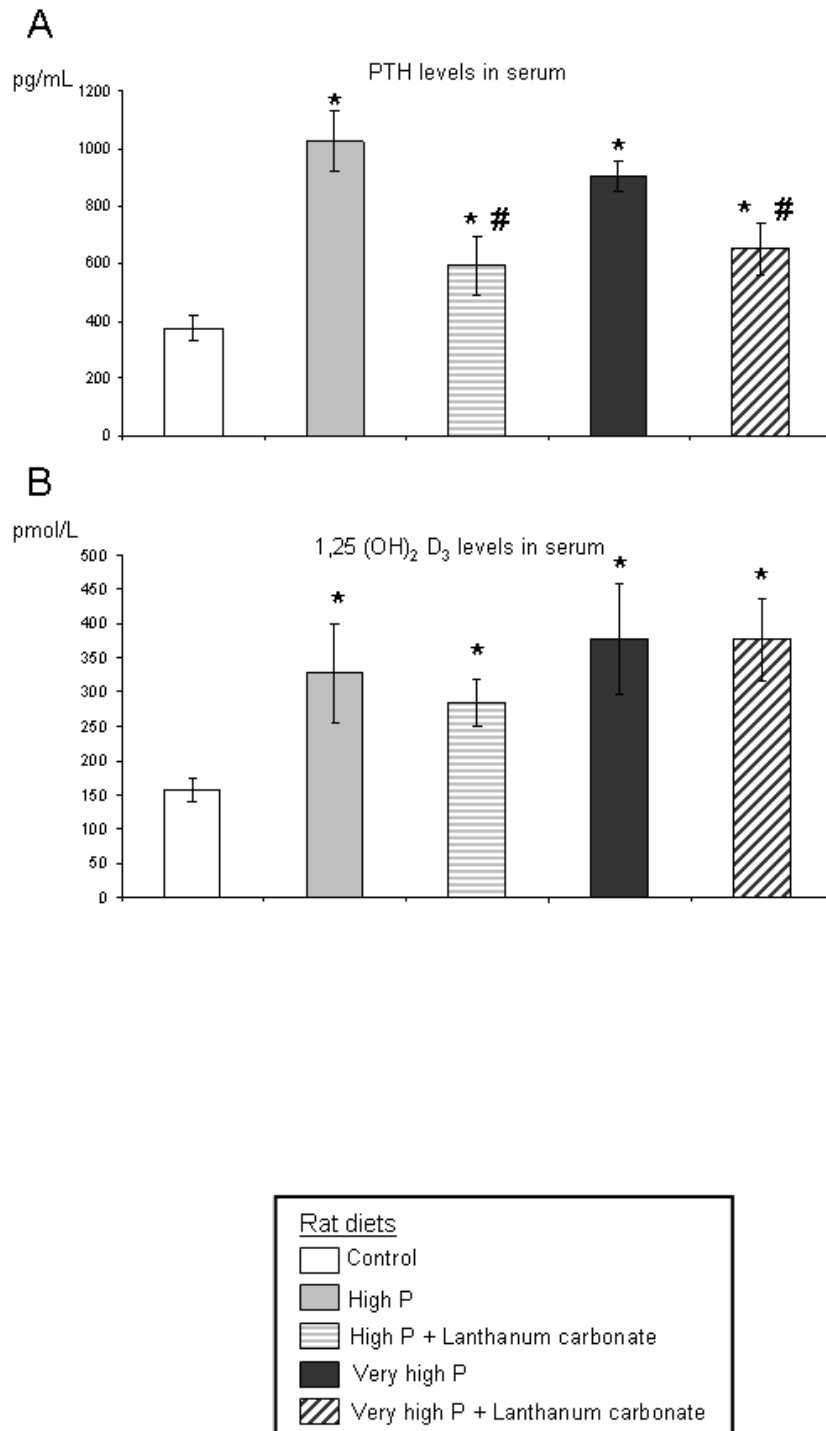


Figure 4

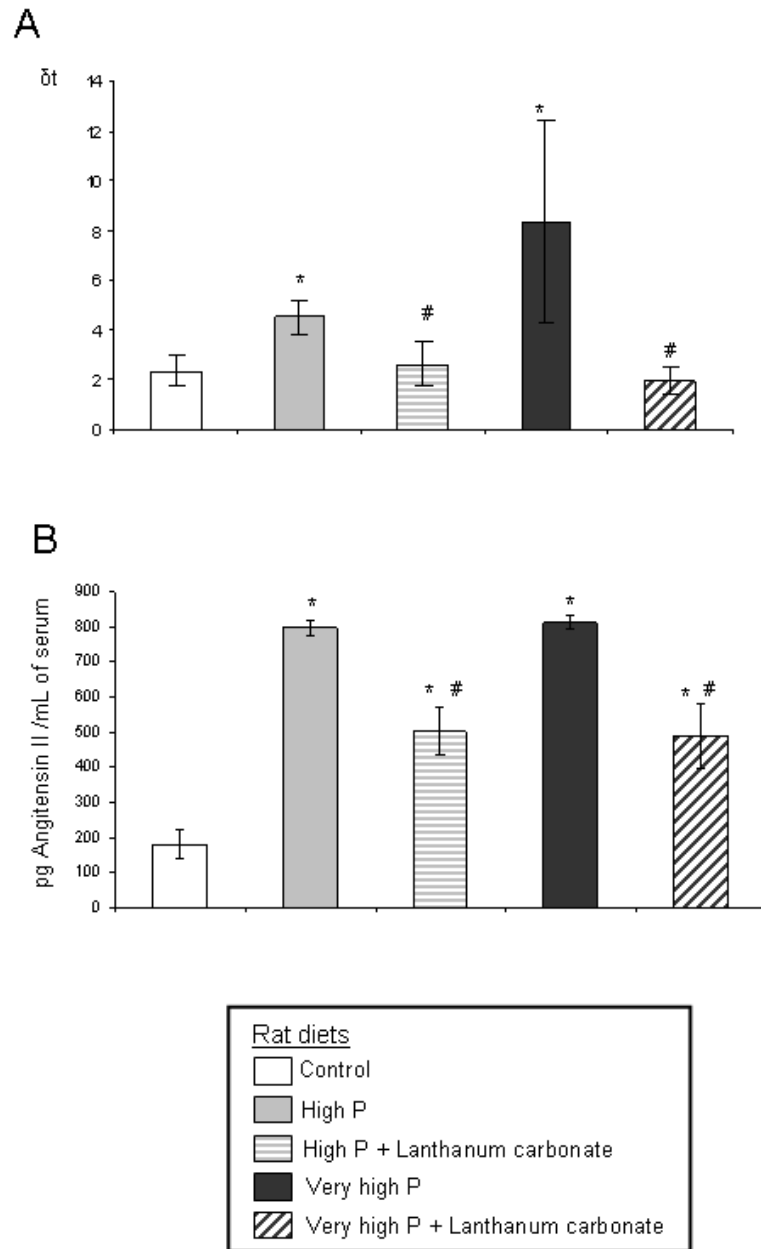


Figure 5

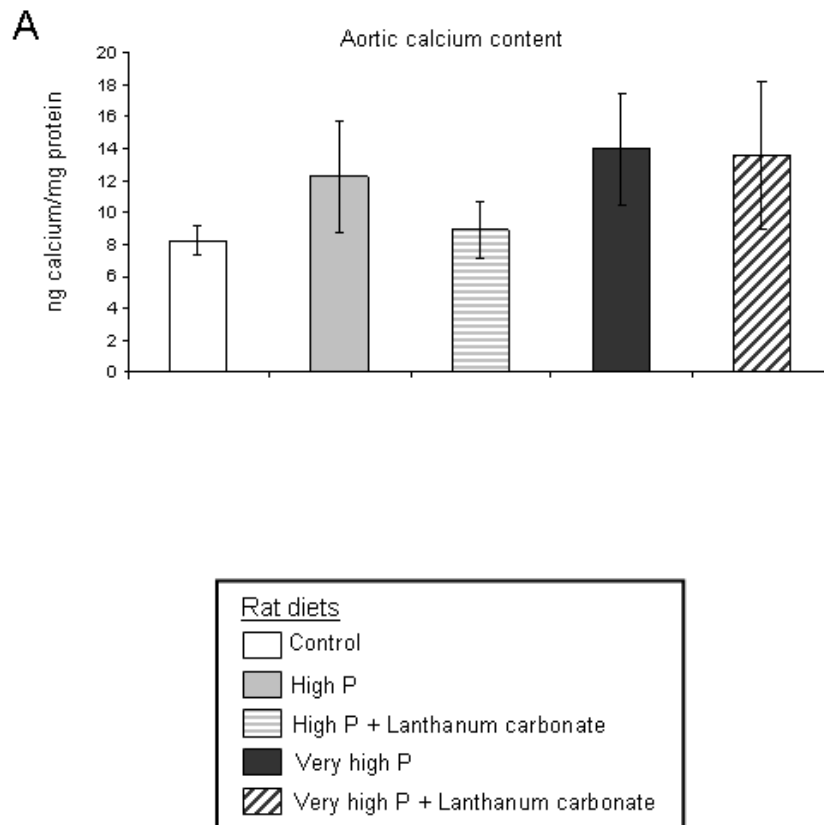


Figure 6

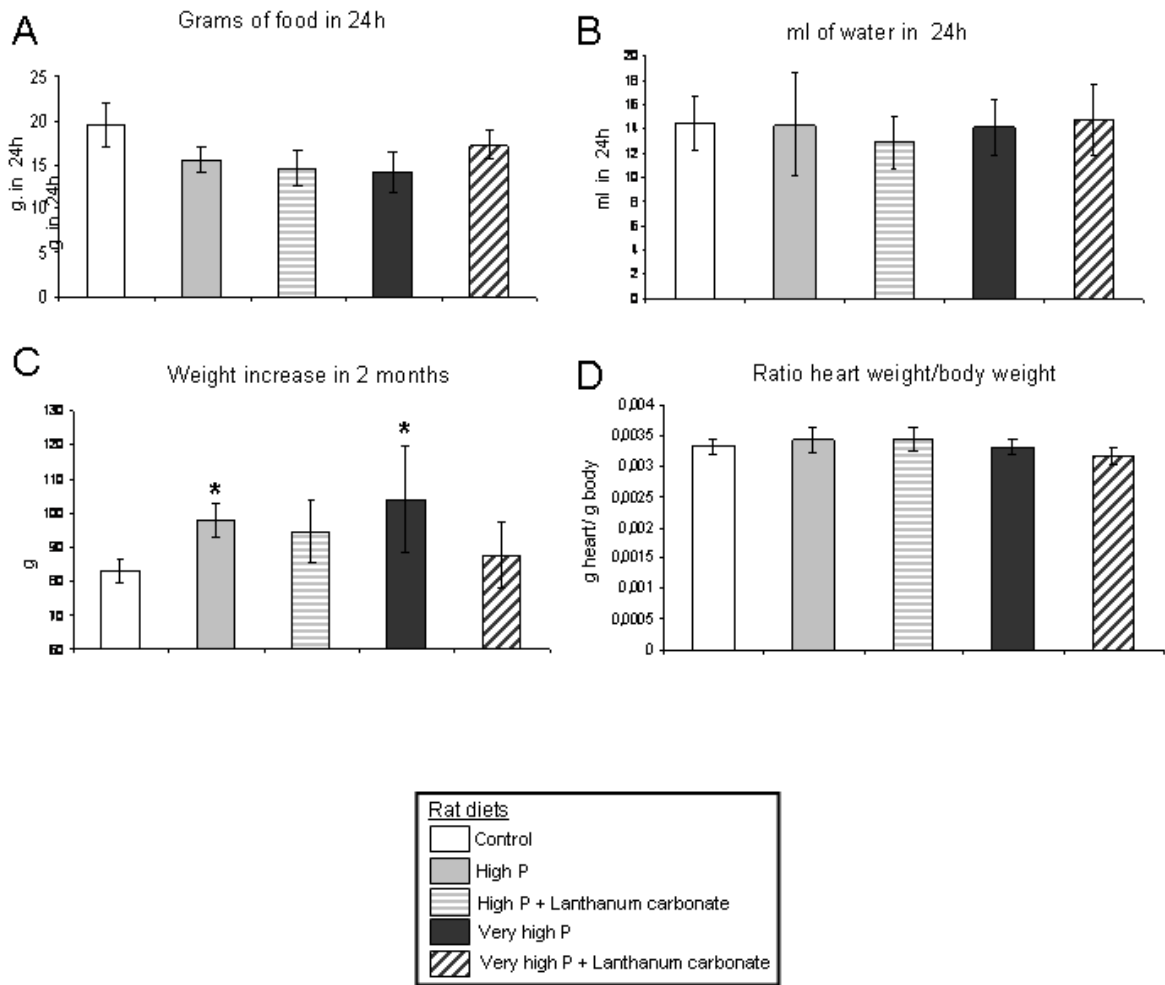


Figure 7

_____ Anexo

RESULTADOS COMPLEMENTARIOS

Este anexo pretende agrupar todos aquellos resultados que guardan relación con los artículos de esta tesis pero que por distintos motivos no se han incluido en ellos. Son resultados que complementan y facilitan la comprensión de los resultados y conclusiones obtenidas.

1. Expresión de los genes implicados en el metabolismo de la vitamina D (VDR, 1 α hidroxilasa y 24 hidroxilasa) en arterias procedentes de sanas tratadas con Calcitriol.

Durante 8 semanas tratamos a un grupo de ratas sanas (n=4) con la misma concentración de Calcitriol que a las ratas uremicas (1 μ g/kg). Extrajimos el RNA de las arterias, del que obtuvimos el cDNA, que empleamos para realizar una RT PCR para determinar la expresión de VDR, 1 α hidroxilasa y 24 hidroxilasa. Comprobamos que el comportamiento era el esperado: la expresión de VDR y 24 hidroxilasa aumenta, mientras que la de 1 α hidroxilasa disminuye. Este comportamiento no se mantiene durante las condiciones de uremia.

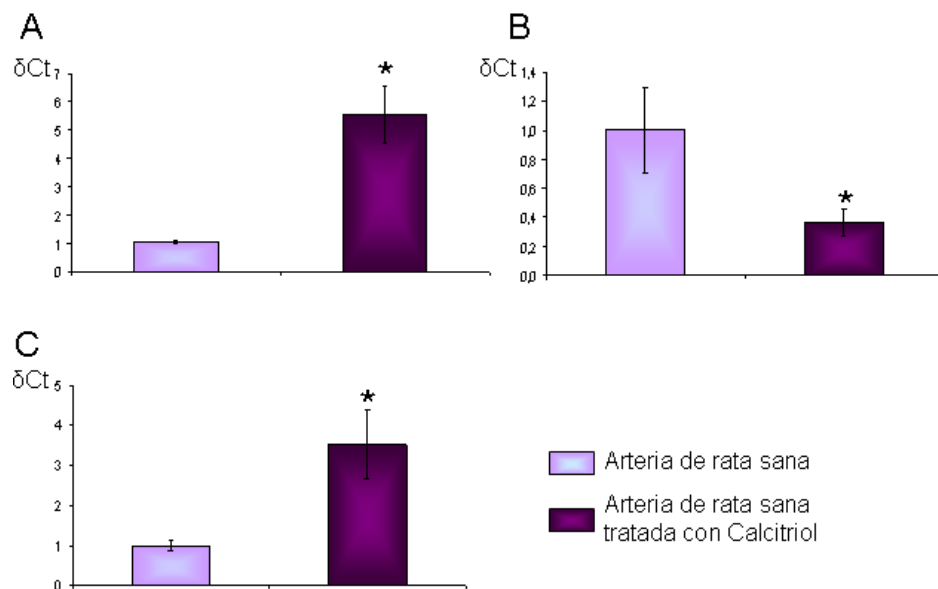


Figura 19: Expresión determinada por RT-PCR de VDR(A), 1 α hidroxilasa (B) y 24 hidroxilasa (C) en arterias de ratas sanas y sanas tratadas con Calcitriol $p \geq 0.05$ respecto al control

2. Calcificación de las células de músculo liso vascular de ratones Knockout y Wild Type para VDR.

Obtuvimos CMLV procedentes de aortas de ratones Wild Type (WT) y Knockout (KO) para VDR. Utilizamos la cepa Tokyo de estos ratones que fue generada por la ablación específica de exón 2 que codifica el primer dedo de zinc del dominio de unión de DNA. Nuestras iniciales parejas reproductoras de estos ratones fueron una generosa donación del Dr. S. Kato (Universidad de Tokio, Tokio, Japón). Los ratones fueron destetados y genotipados a las 3 semanas de edad y luego se alimentaron con dieta de mantenimiento. A las 4 semanas los sacrificamos y obtuvimos las aortas, que empleamos para obtener cultivos de CMLV, del mismo modo que obtuvimos los cultivos procedentes de rata y al igual que en las CMLV de rata verificamos que se trataban de estas células por su patrón de crecimiento y por inmunocitoquímica de alfa actina. Comprobamos el genotipo de las células mediante Western Blot de VDR (figura 20). Los experimentos los realizamos entre pase 2 y pase 8.

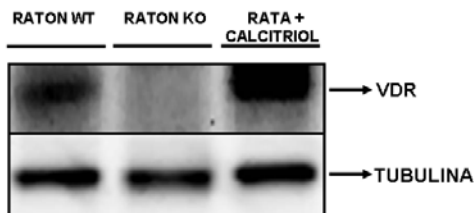


Figura 20 :Western Blot de VDR, para comprobar el genotipo Wild Type o Knockout de las CMLV procedentes de explantes de aortas de ratón. Las CMLV de rata tratadas con Calcitriol se han usado como control positivo, ya que se sabe que al Calcitriol aumenta la expresión de VDR en estas células. La tubulina se empleó como control de carga.

Para realizar los experimentos de calcificación, procedimos de igual modo que en las CMLV de rata, utilizando el método de la o-cresolftaleína complexona. Como era de suponer las CMLV de ratones KO para VDR no calcificaban al tratarlas con Calcitriol, sin embargo y tal como sucedía con las CMLV de rata, las WT si que lo hacían. El Paricalcitol no provocaba un aumento de la calcificación (Figura 21).

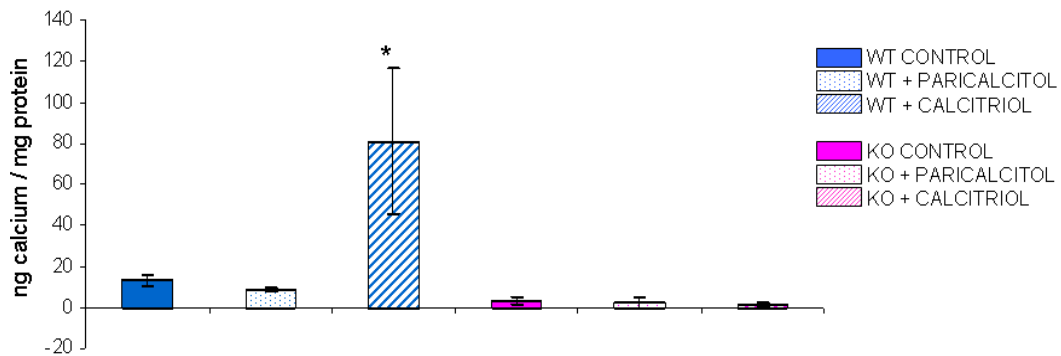


Figura 21: Calcificación de CMLV de ratones KO y WT para VDR al añadir al medio calcificante 300nM de Paricalcitol y 100nM de Calcitriol* $p \geq 0.05$ respecto a su control

Al añadir 100pM de RANKL al medio de cultivo pudimos comprobar que las células KO y WT aumentaban su nivel de calcificación.

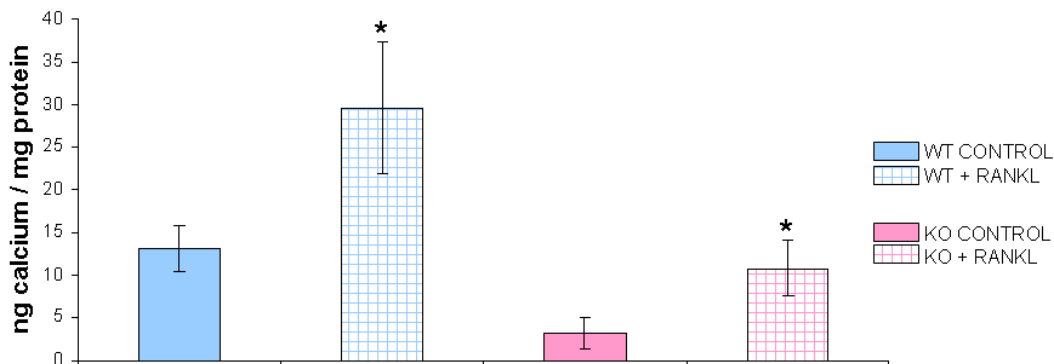


Figura 22: Calcificación de CMLV de ratones KO y WT al añadir al medio calcificante 100pM de RANKL. * $p \geq 0.05$ respecto a su control.

3. Calcificación de las células de músculo liso vascular humanas.

También obtuvimos CMLV de arterias renales de humanos. Procedimos de igual modo para obtener los cultivos (método de explantes), y para verificar que eran CMLV que en los casos de rata y ratón. Los experimentos también los realizamos entre pase 2 y pase 8. El motivo de no utilizar siempre CMLV humanas reside en la dificultad para que se nos proporcionen arterias humanas, que además deben ser recogidas dentro de unas condiciones higiénicas y debe realizarse el cultivo tras su obtención. Por ello utilizamos estas células para comprobar si ciertos resultados obtenidos en otros modelos se reproducen en el humano.

Determinamos si las CMLV humanas incrementaban su nivel de calcificación al tratarlas con Paricalcitol (300nM) y Calcitriol (100nM). Comprobamos que se comportaban siguiendo el mismo patrón que las de rata.

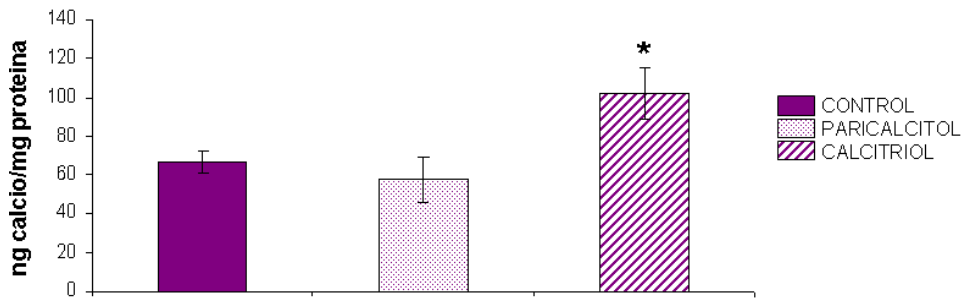


Figura 23: Calcificación de CMLV humanas al añadir al medio calcificante 300nM de Paricalcitol y 100nM de Calcitriol. * $p \geq 0.05$ respecto al control.

Además al igual que sucedía con las CMLV de rata, al añadir RANKL (en este caso humano) se incrementa su calcificación. Dicha calcificación también puede ser inhibida al coincubar con OPG (también humano).

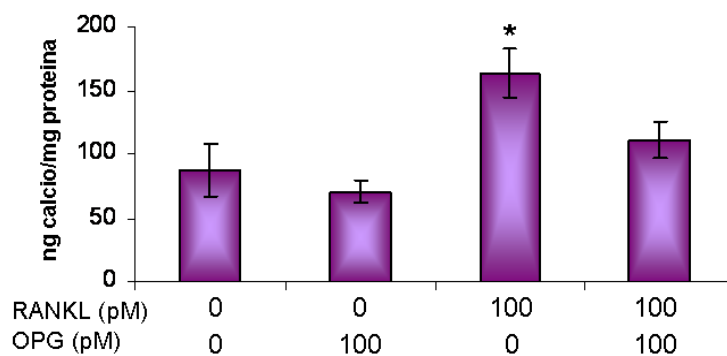


Figura 24: Efecto de la adición de OPG (100pM) sobre la calcificación de CMLV humanas provocada por RANKL(100pM). * $p \geq 0.05$ respecto al control

4. La calcificación de las células de músculo liso vascular de rata provocada por el Calcitriol se inhibe mediante la adición de OPG *in vitro*.

Como ya hemos comentado en resultados anteriores OPG inhibe la calcificación provocada por RANKL en las CMLV de rata. También hemos hecho referencia a que el Calcitriol aumenta la expresión de RANKL, por lo que pensamos en añadir OPG al medio calcificante más Calcitriol para ver si así se inhibía la calcificación, proporcionándonos este resultado una prueba más de que el aumento en RANKL era el responsable de la calcificación. Como se puede observar en la figura, el incremento en la calcificación de las CMLV producido por la vitamina D se puede inhibir mediante la adicción al medio de cultivo de OPG

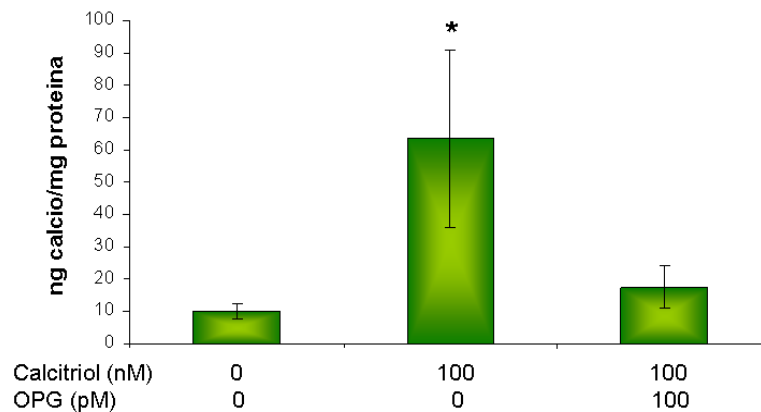


Figura 25: Efecto de la adición de OPG (100pM) sobre la calcificación de CMLV de rata producida por el Calcitriol(100nM). * $p \geq 0.05$ respecto al control.

5. La incubación con RANKL no incrementan los niveles de Caspasa 3 activa en las células de musculos liso vascular.

OPG es un receptor soluble señuelo de RANKL, pero también es receptor de TRAIL⁷⁸. Las CMLV expresan RANKL, OPG¹²¹ y TRAIL¹⁰⁰. La unión de TRAIL a su receptor induce apoptosis, la cual esta relacionada con la calcificación vascular. La incubación con RANKL podría aumentar la calcificación vascular al provocar el agotamiento del OPG, que permitiría que el TRAIL libre indujera apoptosis. Sin embargo en el Western Blot de la figura 26 se observa que la incubación de CMLV con

RANKL no incrementa los niveles de caspasa 3 activa, que interviene en la calcificación inducida por TRAIL.

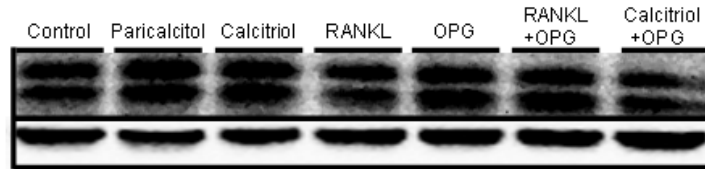


Figura 26 : Western Blot de Caspasa 3 activa en CMLV con diferentes tratamientos. No se observan diferencias entre los tratamientos.

6. BMP2 no varía significativamente al incubar las células de músculo liso vascular con RANKL.

Como ya se mostró en los resultados, RANKL provoca un aumento de la expresión de BMP4, responsable del incremento de la calcificación. Resulta obvio plantearse el porqué de elegir para su estudio esa molécula y no otra. De hecho sería muy común pensar primero en otra *Bone Morphogenic Protein*, la BMP2, una molécula de la misma familia que BMP4, que presentan un comportamiento similar y frecuentemente asociada con la calcificación vascular. Nosotros en un primer momento pensamos en BMP2 como posible mediador en la calcificación de las CMLV. Sin embargo al analizar su expresión tanto por RT-PCR como por ELISA al incubar las células en medio calcificante más 100pM de RANKL, comprobamos que no aumenta significativamente (Figuras 27 A y B). Este resultado nos hizo descartar BMP2 y pensar en BMP4 como responsable.

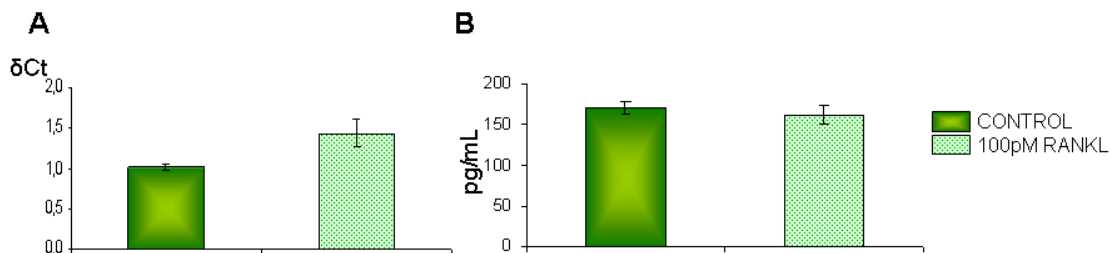


Figura 27: Expresión de BMP2 determinada por RT-PCR (A) y ELISA (B) en CMLV y su medio de cultivo, respectivamente, incubadas con medio calcificante (control) y medio calcificante más 100pM de RANKL. n.s.

7. La inhibición de la vía clásica de NF-κB utilizando el súper-represor de IκBα tampoco inhibe la calcificación producida por RANKL.

Como ya se mostró en los resultados, la vía alternativa de NF-κB y no la clásica es la implicada en el aumento de la expresión de BMP4 y por tanto de la calcificación. Además de inhibir ambas vías mediante sh RNA de las quinasas IKKα e IKKβ, la vía clásica la inhibimos de una segunda manera mediante la utilización del super-represor de IκBα, que también fue una generosa donación de Dr Xavier Dolcet. El resultado obtenido confirmó que la vía clásica de NF-κB no está implicada en la calcificación producida por RANKL (Figura 29).

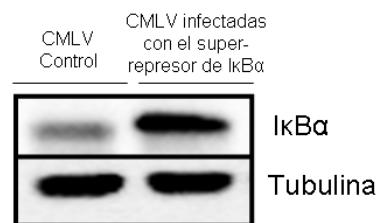


Figura 28. Western blot de comprobación de la infección de CMLV con el super-represor de IκBα. La tubulina se ha utilizado como control de carga

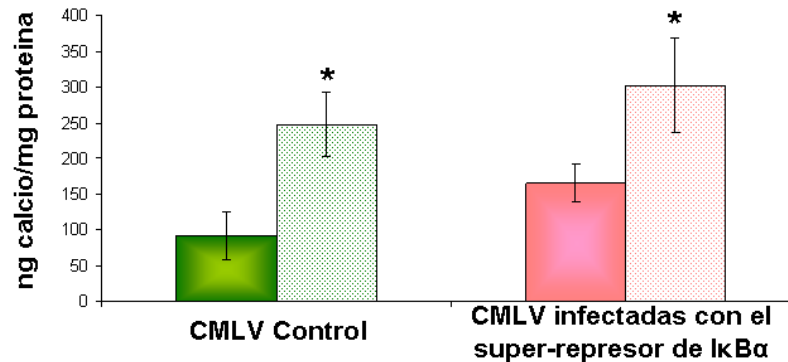


Figura 29: Calcificación de CMLV silvestres e infectadas con el super-represor de IκBα al añadir al medio calcificante 100pM de RANKL (columna de puntos). No se produce una inhibición del incremento de la calcificación producida por RANKL al mantener la inhibición de la vía clásica de NF-κB con el super-represor de IκBα * $p \geq 0.05$ CMLV tratadas con 100pM de RANKL respecto a su control.

8. La coincubación de las células de músculos liso vascular con OPG bloquea el aumento de los niveles de BMP4 inducido por RANKL

Con el fin de aportar más evidencias al link entre RANKL y BMP4 que establecimos al silenciar RANK y ver como disminuía la expresión de BMP4, coincubamos las CMLV con RANKL y OPG. El resultado confirma esta asociación ya que la incubación con OPG (100pM) bloquea el incremento de BMP4 inducido por RANKL.

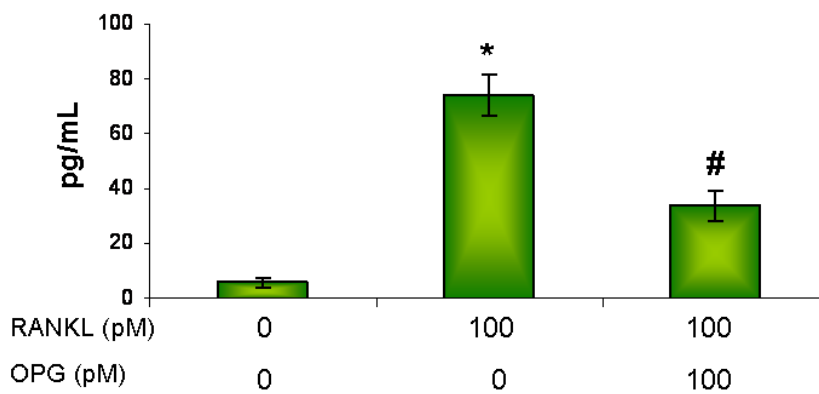


Figura 30: Expresión de BMP4 determinada ELISA (B) en el medio de cultivo de CMLV incubadas con medio calcificante con 100pM de RANKL con o sin 100pM de OPG. * $p \geq 0.05$ respecto al control (0pM RANKL, 0pM OPG). # $p \geq 0.05$ CMLV tratadas con 100pM RANKL versus CMLV con tratamiento de 100pM de RANKL, 100pM OPG.

9. El silenciamiento de BMP4 inhibe el incremento de calcificación provocado por RANKL.

En el artículo mostramos como la coincubación de RANKL con nogina (un inhibidor de las BMPs) inhibía la calcificación producida por RANKL. Ante este resultado podría plantearse alguna duda sobre si realmente es BMP4 el mediador de la calcificación y no alguna otra molécula de las BMPs, por lo que para asegurarlo procedimos al silenciamiento de BMP4 mediante la técnica de shRNA. Las secuencias de los primers que utilizamos fueron: forward CCG GCC GGA TTA CAT GAG GGA TCT TTT CAA GAG AAA GAT CCC TCA TGT AAT CCG GTT TTT y reverse GAT CAA AAA CCG GAT TAC ATG AGG GAT CTT TCT CTT GAA AAG ATC CCT CAT GTA ATC CGG. Tras infectar las CMLV Comprobamos la inhibición mediante RT-PCR

y ELISA. Incubamos las células infectadas con RANKL y determinamos su nivel de calcificación del mismo modo que en otras ocasiones: tras 5 días de tratamiento y por el método de la o-cresolftaleína complexona. Comprobamos que la calcificación producida por RANKL disminuye significativamente en la CMLV BMP4- (figura 31)

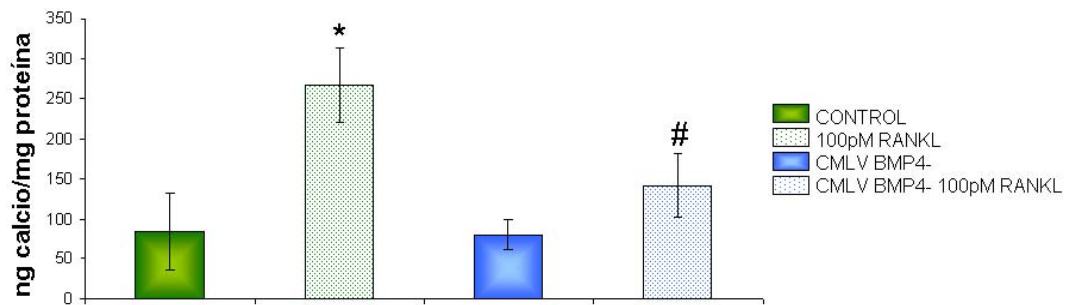


Figura 31: Calcificación de CMLV silvestres y BMP4- al añadir al medio calcificante 100pM de RANKL. * $p \geq 0.05$ respecto a su control. # $p \geq 0.05$ CMLV silvestres tratadas con RANKL versus CMLV BMP4- con el mismo tratamiento.

Discusión

En la enfermedad renal crónica, la disminución de la función renal tiene una serie de consecuencias importantes: síndrome urémico, hiperfosfatemia, hiperparatiroidismo secundario (HPT2) y enfermedades cardiovasculares, incluyendo en ellas las calcificaciones vasculares. Las enfermedades cardiovasculares son la mayor causa de morbimortalidad en pacientes con ERC. La aterosclerosis acelerada y la calcificación de la media son procesos comunes en los pacientes en diálisis. Los mecanismos por los que la uremia promueve la calcificación vascular y su relación con la aterosclerosis plantean aun muchos interrogantes. Son muchas las células implicadas en la formación de la lesión aterosclerótica¹⁸⁵ pero nosotros hemos centrado nuestros estudios en las CMLV. Estas células en respuesta a una gran variedad de estímulos aterogénicos pueden pasar de un fenotipo contráctil a uno sintético, en el que migran y proliferan más. Estas CMLV pueden sintetizar más colágeno y proteínas de matriz, que estarían involucradas en la iniciación y desarrollo temprano de la placa aterosclerótica^{70;254}. Los pacientes con ERC sufren un incremento de la proliferación de las CMLV que puede desencadenar complicaciones arteriales⁴. El tratamiento con Calcitriol y su análogo el Paricalcitol es una práctica común en el tratamiento del HPT2 que sufren los pacientes en diálisis. El Calcitriol aumenta la proliferación de las CMLV⁴¹. Sin embargo el Paricalcitol induce una menor respuesta proliferativa en las CMLV⁴⁰. En nuestros estudios nos interesamos por saber que sucedía durante la uremia especialmente en las CMLV y como el tratamiento con Calcitriol o con su análogo el Paricalcitol podrían influir sobre el proceso aterosclerótico o sobre la calcificación vascular.

Comprobamos como la uremia provoca tanto *in vitro* como *in vivo* una desregulación de los enzimas del metabolismo de la vitamina D en las CMLV aumentando con ello la síntesis local de esta hormona. Esta desregulación ya había sido descrita en otros tejidos durante la uremia por distintos autores. Como ya explicamos en la introducción, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ejerce sus acciones a través de la unión a su receptor el VDR. Diferentes autores han observado una disminución del VDR en las glándulas paratiroides de ratas⁶⁶, perros²⁷ y humanos¹⁶² con fracaso renal. Además el efecto estimulador de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre los niveles de VDR está atenuado en el duodeno de las ratas urémicas¹⁶⁵. La interacción del receptor con los elementos de respuesta del DNA también es más débil en estos pacientes^{126;259;297;304} e incluso se ha demostrado *in vitro* que el ultrafiltrado urémico es capaz de bloquear la inducción de genes por Calcitriol²³⁸. Las toxinas urémicas se han asociado a esta resistencia a la

1,25(OH)₂D₃ en pacientes con ERC⁷³. Todos estos estudios concuerdan con nuestros resultados. El descenso del contenido en VDR y de su capacidad de unión al DNA podrían ser los responsables de incremento en las 1 α hidroxilasa, ya que se elimina el feedback negativo, que observamos en las CMLV *in vitro* y en las arterias *in vivo* en las condiciones de uremia. El resultado de esta alteración es el incremento a nivel local de la síntesis de 1,25(OH)₂D₃ durante la uremia, que ejercería sus acciones de manera auto-paracrina. Posiblemente guarde relación con los cambios en proliferación y calcificación tantas veces descritos en los pacientes urémicos.

Existen en la bibliografía referencias a una regulación de la 1 α hidroxilasa específica de tejido y diferente de la del riñón¹⁵. La uremia puede modificar su expresión y actividad. Estudios de Dusso et al⁷⁵ demostraron que los macrófagos de individuos normales sintetizaban 1,25(OH)₂D₃ y que en los individuos con ERC su actividad 1 α hidroxilasa estaba incrementada y la capacidad de degradar 1,25(OH)₂D₃ se encontraba disminuida. En la uremia los niveles circulantes de vitamina D se encuentran disminuidos y los de PTH elevados, lo que sirve de estímulo para incrementar la síntesis extrarrenal de 1,25(OH)₂D₃. Nuestros animales experimentan un aumento de la expresión de la 1 α hidroxilasa en la arteria, pero un descenso en el riñón. La síntesis extrarrenal de 1,25(OH)₂D₃ esta elevada en las CMLV.

La desregulación de los genes del metabolismo de la vitamina D durante la uremia también afecta a la 24 hidroxilasa. Koyama et al¹⁶⁴ mostraron como la uremia induce la expresión duodenal de 24 hidroxilasa en ratas urémicas, y Hsu et al¹²⁷ estudiaron como las toxinas urémicas estaban involucradas en la supresión de la degradación de 1,25(OH)₂D₃. En nuestro trabajo la expresión de 24 hidroxilasa no se modifica significativamente.

Como hemos ido explicando la consecuencia de todas estas alteraciones es el aumento de la síntesis de la 1,25(OH)₂D₃ durante la uremia en la arteria, concretamente en las CMLV. Incremento que pudimos medir *in vitro* al cultivar las CMLV con suero de ratas normales y de ratas urémicas. La producción de 1,25(OH)₂D₃ era superior en las células cultivadas con suero urémico. También podemos afirmar que el metabolismo de la vitamina D no se comporta de la misma manera en la arteria que en el riñón durante la uremia.

El HPT2 que desarrollan los pacientes con ERC, requiere de terapia para minimizar los efectos de la PTH sobre los huesos y otros tejidos¹⁹². Los bajos niveles de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en sangre juegan un papel importante en la iniciación y mantenimiento de este HPT2. La terapia para el HPT2 en pacientes con ERC consiste en diferentes activadores de receptor de la vitamina D (VDRA), como el Calcitriol o su análogo el Paricalcitol, que suprimen los efectos en la glándula paratiroides, y regulan la absorción intestinal de calcio y fósforo y su movilización en el hueso. Los estudios observacionales también demuestran como en pacientes en hemodialisis el Paricalcitol está asociado a una mejora en supervivencia comparado con el Calcitriol^{7;52;69;302}. En este trabajo comprobamos como ambos tratamientos son igual de eficaces a la hora de suprimir la secreción de PTH inducida por la nefrectomía 5/6 y al final de los tratamientos, los animales tratados con Calcitriol o Paricalcitol mostraban niveles similares de calcio y fósforo séricos, así como del producto calcio-fósforo.

Nosotros hemos observado en los diferentes estudios que hemos realizado un efecto diferencial de ambos compuestos. En la parte que nos ocupa en este momento y que se refiere a la regulación de la síntesis extrarrenal de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en las CMLV, pudimos constatar que mientras que el Paricalcitol no tiene efecto sobre la uremia, el Calcitriol dispara la expresión de 1α hidroxilasa y la producción de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Las arterias de ratas sanas, sin embargo siguen el comportamiento esperado al tratar a los animales con Calcitriol: VDR y 24hidroxilasa aumentan, mientras que la 1α hidroxilasa disminuye. Estas diferencias entre tratamientos, ponen de manifiesto la importancia de su elección a la hora de tratar a los pacientes.

Estos efectos diferenciales entre ambos compuestos no se observan solo en las alteraciones en el metabolismo de la vitamina D, sino que también encontramos diferencias en la presión arterial de estos animales sometidos a nefrectomía subtotal. Observamos un incremento de la presión arterial tras el tratamiento con vitamina D que ya había sido descrito por diversos autores tanto en animales^{35;36;109} como en pacientes¹⁴⁰. El tratamiento con ambos análogos tiene un efecto significativo sobre la presión sanguínea. Sin embargo, aunque ambos tratamientos aumentan la presión arterial sistólica, la diastólica solo se eleva en el grupo tratado con Paricalcitol. Esto da lugar a que el aumento en la presión de pulso solo tenga lugar en los animales tratados con Calcitriol. Este incremento parece ser similar al observado en el envejecimiento, donde se produce un aumento en la presión de pulso causado por elevaciones de la

presión arterial sistólica con pequeñas variaciones en la diastólica. En nuestro trabajo el incremento en la presión de pulso podría explicarse por la rigidez de la arteria debida a un proceso de calcificación. Este aumento en la presión de pulso podría ser un efecto deletéreo del tratamiento con Calcitriol ya que se ha visto que la presión de pulso es un importante indicador para predecir mortalidad cardiovascular y cerebrovascular^{82;199}.

La calcificación vascular guarda mucha relación con los puntos anteriores y nosotros le dedicamos una parte importante de nuestros estudios. La uremia potencia la calcificación y estimula la expresión de marcadores osteogénicos en las CMLV^{46;47;206}. Además el efecto del Calcitriol y Paricalcitol en la calcificación CMLV tanto *in vivo* como *in vitro* es diferente. Mientras que los animales tratados con Paricalcitol mostraban una pequeña calcificación aórtica similar a la de los animales sin tratamiento, los tratados con Calcitriol presentaban extensas calcificaciones de la capa media de la aorta, a pesar de un producto calcio-fósforo similar. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Wu-Wong et al³²⁷ cuando comparaban el Paricalcitol con las 1 α hidroxivitamina D2. En dicho artículo se mostraba como con un incremento similar en los niveles en suero de calcio y fósforo, el efecto de ambos compuestos sobre la calcificación era diferente. Es más, este efecto en la calcificación provocado por el Calcitriol podía observarse ya con dosis no hipercalcemiantes de Calcitriol¹⁰⁹. Por tanto, el efecto del Calcitriol induciendo la calcificación vascular parece ser directo e independiente de los niveles séricos de calcio.

Calcitriol induce un aumento de la calcificación de las CMLV en medio calcificante a partir de la concentración de 100 nM. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Jono et al¹⁴⁶, que observaban un efecto directo del Calcitriol incrementando la calcificación de las CMLV. El efecto directo del Calcitriol *in vitro* aumentando el contenido de calcio en CMLV de ratas, no tiene lugar en las células tratadas con Paricalcitol, incluso en concentraciones tres veces superiores a las de Calcitriol. En este caso, los niveles de incorporación de calcio no se incrementaron en comparación con células control incubadas solo con medio calcificante. Desde hace algunos años se ha empezado a aceptar que la calcificación vascular es un proceso activo y regulado. En las primeras etapas de este proceso las CMLV sufren un cambio fenotípico y empiezan a expresar marcadores osteoblásticos. Comienzan expresar proteínas asociadas a hueso que permiten la mineralización de la matriz extracelular¹⁴⁷. Una de estas proteínas asociadas a hueso es RANKL. RANKL es una proteína de 316

aminoácidos, que se expresa abundantemente en osteoblastos, especialmente en áreas donde se produce un activo remodelado óseo^{117;120;258;318}. Normalmente se detecta en bajos niveles en las CMLV, pero su expresión aumenta en las lesiones arteriales calcificadas. En nuestros experimentos podemos observar que la uremia aumenta la expresión de RANKL en estas células. Además tanto la expresión como la secreción de RANKL al medio de cultivo es significativamente superior en las células incubadas con Calcitriol, y no cambia en las células incubadas con Paricalcitol. Además está descrito que la administración OPG inhibe la calcificación vascular inducida por Warfarina y por vitamina D *in vivo*²⁴². OPG, es una proteína que actúa como receptor soluble señuelo de RANKL y que inhibe la formación de osteoclastos²³². Los ratones deficientes en OPG padecen una disminución de la densidad mineral ósea, sufren una alta incidencia de fracturas de hueso y presentan calcificaciones de la aorta y de las arterias renales^{34;261}. En nuestros experimentos *in vivo* los niveles de OPG no se incrementan ni con Calcitriol ni con Paricalcitol. En general, los casos de calcificación vascular con pequeño o ningún cambio en OPG y aumentos de RANKL (en lesiones ateroscleróticas o valvulares en humanos y en ratones OPG^{-/-}) han conducido a la hipótesis de que los niveles elevados de RANKL podrían favorecer de algún modo la calcificación de los vasos^{67;149;203}.

En la uremia el aumento local de 1,25(OH)₂D₃ podría tener un efecto paracrino sobre las células del vaso. La actuación de la 1,25(OH)₂D₃ sobre las CMLV incrementa la expresión de RANKL. La adición de Calcitriol dispararía aun más el incremento de RANKL en las CMLV y con ello la calcificación. Más aun, una parte importante de la calcificación inducida por el suero urémico se puede inhibir adicionando OPG o usando CMLV RANK⁻. Esto nos demuestra que el incremento local de RANKL es un importante mediador de la calcificación vascular observada en la uremia y que se dispara con el tratamiento con Calcitriol. Además este RANKL, tal y como describió van Driel³¹¹ en osteoblastos, parece ser el responsable del incremento de los niveles de RNAm de la 1α hidroxilasa. No podemos olvidar que estas CMLV que empiezan a calcificar se asemejan cada vez más a osteoblastos.

Parece entonces que un elemento clave en la calcificación de las CMLV es RANKL. El posible efecto de RANKL sobre la calcificación de la CMLV había sido puesto de manifiesto por varios autores^{258;265}, si bien aun nadie había demostrado su relación directa. Se había observado que la expresión de RANKL aumentaba en las

áreas calcificadas de animales de experimentación y pacientes. En ratones OPG^{-/-}, que presentan osteoporosis y calcificación vascular, Min et al²⁰³ pudieron comprobar que el RNAm de RANKL se localizaba asociado a las lesiones arteriales calcificadas. La presencia de RANKL también se ha podido encontrar asociada a matriz extracelular rodeando los depósitos de calcio en las placas ateroscleróticas humanas⁶⁷ y en válvulas aórticas calcificadas¹⁴⁹. Además, la expresión de OPG en un ratón OPG^{-/-} prevenía las aparición de calcificaciones vasculares²⁰³. Más aún, Price et al²⁴² demostraron que la administración de OPG podía inhibir la calcificación vascular inducida por Warfarina y vitamina D en animales de experimentación. Nuestros resultados muestran como las CMLV incubadas con medio calcificante al que se añade RANKL incrementan tanto su contenido de calcio, como la actividad fosfatasa alcalina, enzima indicadora de turnover óseo. Este incremento también los pudimos visualizar mediante tinción de Von Kossa, que pone de manifiesto las áreas calcificadas. Con todo ello demostramos el efecto directo de RANKL como inductor de la calcificación de las CMLV.

El hecho de que OPG inhiba la calcificación vascular en modelos experimentales podría atribuirse diferentes mecanismos. Uno de ellos se explica por el hecho de que OPG inhibe la resorción ósea, y algunos autores han establecido un link entre resorción ósea y calcificación vascular. Sugieren que una desregulación en la localización del calcio permitiría su movimiento desde el hueso hasta la pared vascular, estando implicado en este proceso el OPG¹¹⁹. Esta hipótesis se apoyaba a su vez por la relación existente entre calcificación arterial y enfermedades que suponían una alta tasa de resorción ósea como la osteoporosis^{34;241}, y porque los tratamientos utilizados para inhibir la resorción ósea podían inhibir la calcificación vascular en modelos experimentales²⁴¹. Sin embargo parece que los altos niveles de OPG que presentan los pacientes con ERC no son suficientes para proteger contra la calcificación vascular^{227;312}. La significación de estos estudios podría considerarse limitada por el hecho que los niveles de RANKL no han sido determinados, impidiendo así determinar el ratio RANKL/OPG. El otro mecanismo implica la actuación directa sobre las propias células de la arteria impidiendo el efecto de los estimuladores de la calcificación. Como ya hemos dicho en numerosas ocasiones OPG es un receptor soluble señuelo de RANKL, pero también es receptor de TRAIL⁷⁸. Las CMLV expresan RANKL, OPG¹²¹ y TRAIL¹⁰⁰. La unión de TRAIL a su receptor induce apoptosis, la cual esta relacionada con la calcificación vascular. Modelos *in vitro* de CMLV calcificantes muestran que

desequilibrios minerales inducen apoptosis y liberación de vesículas²⁵¹. Estos cuerpos apoptóticos y vesículas forman nidos de deposición de fosfato cálcico²⁵¹. Por este motivo podría ser que la inhibición de TRAIL podría inhibir la calcificación vascular. Sin embargo no hemos encontrado evidencias directas de apoptosis en modelos de calcificación vascular que podrían ser inhibidas con el tratamiento con OPG²⁴². Existe una tercera posibilidad que consistiría en que OPG inhibiera la calcificación vascular inhibiendo directamente a RANKL. Nuestros resultados muestran claramente que la coincubación con OPG inhibe la calcificación inducida por RANKL en las CMLV. Llegados a este punto podríamos hipotetizar que la incubación con RANKL podría aumentar la calcificación vascular al provocar el agotamiento del OPG, lo cual permitiría que el TRAIL libre indujera apoptosis. Nuestros resultados demuestran que la incubación de CMLV con RANKL no incrementa los niveles de caspasa 3 activa, que interviene en la calcificación inducida por TRAIL.

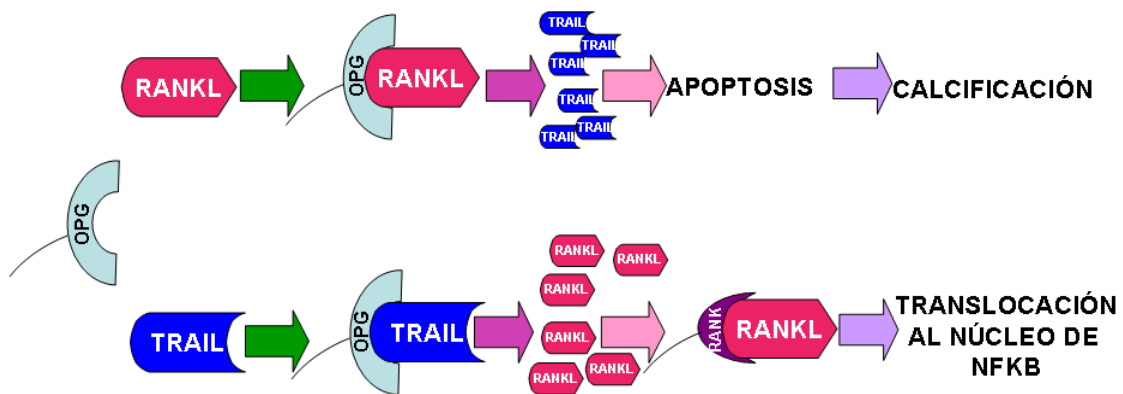


Figura 16: OPG, sus ligandos RANKL y TRAIL y su posible relación con la calcificación vascular. OPG es receptor tanto de RANKL como de TRAIL. La unión RANKL-OPG permitiría que el TRAIL libre provocara apoptosis, responsable de la calcificación vascular. La unión TRAIL-OPG permitiría la unión RANKL-RANK, lo que provocaría la translocación al núcleo de NF-kB, modulando la tasa de transcripción de diferentes genes, algunos implicados en la calcificación vascular

Además desarrollamos experimentos en los que inhibimos la expresión de receptor RANK mediante shRNA en CMLV. En estas células la incubación con RANKL no incrementa su calcificación, lo que nos permite afirmar que directamente RANKL incrementa la calcificación de las CMLV a través de su unión a RANK. La unión de RANKL a su receptor RANK active tanto la vía canónica como la alternativa de NF-kB^{43;229}. Para estudiar como RANK promueve calcificación vascular inhibimos ambas vías de la cascada de NF-kB. El resultado nos mostró que la inhibición de la vía canónica no tiene efecto sobre la calcificación vascular, mientras que el silenciamiento

de la vía alternativa bloqueaba la calcificación de las CMLV inducida por RANKL. La incubación con RANKL provocaría un aumento de la translocación al núcleo de Rel B, prueba de la activación de la vía alternativa de NF- κ B.

La activación de RANKL aumentaba la producción de BMP4. BMP4 es un miembro de la familia de las *bone morphogenic proteins*, llamadas así porque inicialmente fueron identificadas por su capacidad para inducir la formación de hueso endocondral¹⁷¹. Además BMP4 ha sido implicado en la transición osteogénica de la CMLV permitiendo con ello la calcificación vascular¹¹². Se ha observado que BMP4 aumenta la calcificación de las CMLV *in vitro*²⁰² y que está upregulado en las lesiones ateroscleróticas calcificadas⁶⁷. Nuestros resultados muestran como paralelamente al descenso en la calcificación vascular con la inhibición de la vía alternativa de NF- κ B, tiene lugar el descenso de BMP4. También comprobamos que la adición de nogina (un inhibidor farmacológico de las BMPs) al medio de cultivo de las CMLV, inhibía la calcificación inducida por RANKL, sugiriendo que dicha calcificación era mediada por el incremento en la expresión de BMP4. Este resultado se confirmó mediante el silenciamiento de BMP4 en las CMLV, y el tratamiento con RANKL. La calcificación inducida por RANKL no ocurría en las células en las que se había silenciado BMP4, confirmando con ello nuestros resultados anteriores.

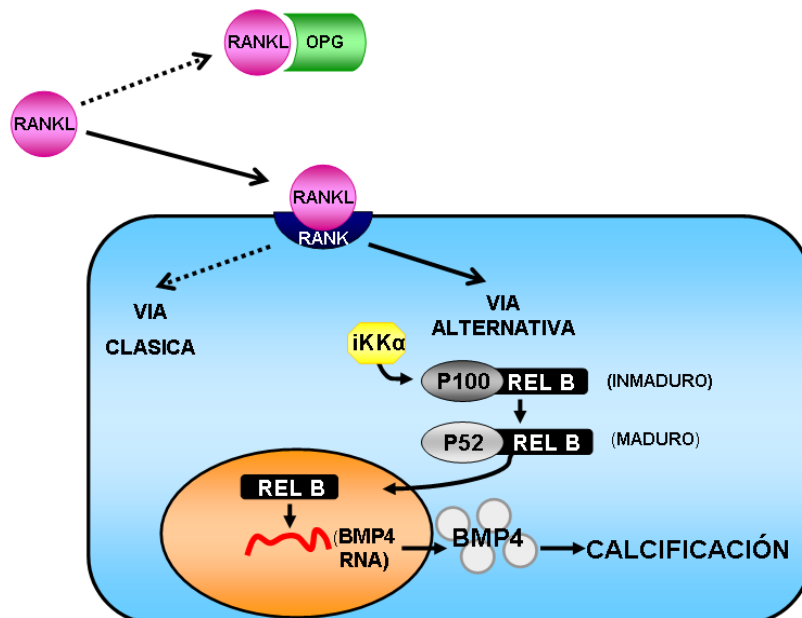


Figura 17: Vía por la que RANKL induce calcificación en las CMLV. La unión de RANKL a su receptor RANK provoca la activación de la vía alternativa de NF- κ B, con la translocación al núcleo de Rel B. Esto modula la tasa de transcripción de BMP4, aumentando su expresión a niveles de RNA y proteína. El BMP4 provoca la calcificación de las CMLV *in vitro*.

Los resultados *in vivo* muestran que la administración de Calcitriol a ratas normales no elevaba la expresión de RANKL/OPG y BMP4 en arterias o en sangre, y que estos animales no presentan incrementos en la calcificación vascular. Sin embargo la uremia induce un aumento de ratio RANKL/OPG y de la expresión de BMP4 en las arterias. Como era de esperar los niveles de calcificación vascular están aumentados en estos animales. El incremento de la calcificación vascular es aún mayor en los animales urémicos tratados con vitamina D, acompañado de un aumento de la expresión arterial de RANKL y BMP4. Este hallazgo sugiere que hay otros factores con efecto en la calcificación vascular *in vivo* asociada al tratamiento con Calcitriol. Las ratas urémicas tratadas con Calcitriol presentan niveles más altos de fósforo en sangre, un parámetro que es considerado como inductor de la calcificación vascular⁹⁷.

La expresión de RANKL y BMP4 se localiza en las áreas calcificadas, apoyando la conclusión de RANKL como promotor de la calcificación vascular. La tinción para TRAP (marcador de macrófagos) es negativa estas áreas calcificadas de la media, coincidiendo con lo que explican artículos previos, y contrario a la calcificación de la placa aterosclerótica. En la calcificación de la media no están implicados macrófagos infiltrados²⁷⁴.

Analizamos además el posible papel de los niveles circulantes de RANKL como marcador de calcificación vascular en nuestro modelo. Sin embargo, aunque observamos un aumento de su expresión en las áreas calcificadas los niveles circulantes de RANKL no se modifican. La asociación entre niveles circulantes de OPG con diversos factores de riesgo cardiovascular está ampliamente estudiada^{114;156;266}, pero el posible uso de la determinación de los niveles de RANKL planteaba cierta controversia. Schett et al²⁶⁰ vieron que los niveles séricos de RANKL no estaban asociados con los factores de riesgo vascular tradicionales. En general, los niveles séricos de RANKL aparecen inalterados, aunque en otras ocasiones de han en otras ocasiones se encuentran disminuidos con aumento de los de OPG^{149;258;267}. En un reciente trabajo, Kiechl et al¹⁵⁵ mostraron un estudio epidemiológico en el que observaban que los niveles séricos de RANKL no correlacionaban con aterosclerosis, sin embargo los niveles de partida a comienzo del estudio si que parecen ser predictivos de riesgo vascular. Entonces, parece que el uso de los niveles séricos de RANKL para predecir el riesgo cardiovascular, no está claro. En nuestro modelo experimental pudimos observar que aunque la expresión de RANKL en el vaso se veía

incrementada, los niveles circulantes no variaban. Por lo tanto, cambios en los niveles circulantes de RANKL no reflejan cambios en los niveles vasculares. De acuerdo con estudios previos, los niveles de OPG aumentan en los animales urémicos, provocando así el descenso del ratio RANKL/OPG.

Se ha desarrollado un fármaco, el Denosumab, que es un anticuerpo monoclonal humano con alta afinidad (K_d $3 \times 10^{-12} M$) y especificidad para RANKL que neutraliza la actividad de RANKL de manera similar a la acción de OPG. Denosumab no tiene reacciones cruzadas con TNF- α , TNF- β , TRAIL, o el ligando CD40. Se utiliza para el tratamiento y prevención de la osteoporosis posmenopáusica, el tratamiento de erosiones óseas asociadas con la artritis reumatoide, prevenir la pérdida de hueso en pacientes con ciertos cánceres y en la enfermedad metastásica ósea¹⁵². Como se puede apreciar, sus aplicaciones van principalmente encaminadas a evitar la pérdida de hueso asociada a distintas causas. Nuestros estudios podrían abrir un nuevo campo de aplicación de este fármaco, ya que podría contribuir a evitar la calcificación vascular que se observa en la ERC.

Por otro lado, los pacientes con ERC suelen desarrollar hiperfosfatemia. El fósforo elevado se ha asociado con riesgo cardiovascular elevado y un aumento de la morbimortalidad por eventos cardiovasculares en estos individuos. En la ERC la elevación de los niveles de fósforo sérico se asocia con HPT2, alteraciones en el remodelado óseo y calcificaciones extra óseas, como la inducción de calcificaciones vasculares^{18;86;101}. También se le ha considerado por diversos autores como una “toxina urémica”. Existen multitud de estudios sobre este ion en la ERC, pero no están del todo claras las consecuencias que tendría una elevación de la ingesta de fósforo en individuos con una función renal normal. Se sabe lo perjudicial que resulta el fósforo en pacientes con ERC, de hecho, es de vital importancia para los nefrólogos el control de los niveles séricos de este ion (empezando por su ingesta en la dieta y siguiendo por el uso de quelantes del fósforo) en los pacientes en diálisis⁷⁷, pero ¿cuáles son sus efectos en animales con función renal normal? ¿Es suficiente el fósforo elevado, aunque se conserve una función renal normal, para desencadenar el resto de consecuencias que se desencadenan en la ERC? ¿Cuál es el efecto del fósforo *per se*? En teoría en las personas y animales con función renal normal, la homeostasis del calcio y del fósforo se mantiene mediante la interacción de la hormona paratiroidea (PTH) y la $1,25(OH)_2D_3$ a pesar de las variaciones de la ingesta de fósforo y calcio. Tanto el fósforo como el calcio ingeridos se absorben en el intestino y llegan al torrente

sanguíneo, para excretarse por los riñones o almacenarse en el tejido óseo (reservorio óseo). Por lo que parecería sencillo pensar que con función normal, una ingesta elevada de fósforo no conllevaría grandes problemas. Sin embargo, nuestro estudio nos mostró como la ingesta elevada de fósforo provocaba un aumento de la presión arterial, y la hipertensión es un importante factor de riesgo cardiovascular. Ya existían estudios como el de Huang¹²⁹ et al que establecían la existencia de una fuerte e independiente asociación entre los niveles de fosfato sérico y la presión sanguínea, eso sí, en pacientes en hemodiálisis. Nosotros hemos observado que la ingesta elevada de fósforo provoca la elevación de la presión tanto sistólica como diastólica y media, y que este incremento se elimina al incluir en la dieta el uso de un quelante de fósforo: el carbonato de lantano, indicando que la elevación en la P arterial es un efecto de la ingesta de fósforo. En nuestro estudio el incremento en la presión sanguínea es paralelo a la elevación de los niveles de PTH, elevación que también se bloquea con la adicción del quelante de fósforo. El hiperparatiroidismo se ha asociado a la hipertensión arterial por la activación del eje renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), pero este efecto es reversible tras la paratiroidectomía^{6;14;94;163;170;196;219;280;313}. Tras la extirpación de la glándula la presión sanguínea, la actividad plasmática de la renina y los niveles séricos de aldosterona vuelven a la normalidad en un porcentaje muy elevado de los pacientes hipertensos con hiperparatiroidismo. Los estudios de Smith et al²⁸⁷ lo comprobaron al realizar una infusión intravenosa de PTH bovina en perros, que provocaba un importante aumento de la actividad plasmática de la renina. Además, entre otros efectos, aumentaba la excreción de fosfato, lo que confirmaba la secreción de PTH. Nuestros resultados se encuentran apoyados por todos estos trabajos: el fósforo estimula la secreción de PTH, que es responsable del incremento de los niveles de renina y angiotensina II que elevan la presión arterial (figura 18). Además, al añadir a la dieta el carbonato de lantano comprobamos que se inhibe la elevación de los niveles séricos de PTH, la expresión renina y los niveles de Angiotensina II, tanto la presión arterial sistólica como la diastólica que siguen ese mismo patrón. Todo ello confirma que el aumento de la presión arterial es un efecto del incremento del incremento de los niveles de PTH en el suero. Aunque la adicción del carbonato de lantano disminuye los niveles sericos de Angiotensin II, estos no regresan al nivel basal y permanecen algo elevados, a pesar de que la expresión de renina si que disminuye hasta su nivel original. Este efecto ya había sido observado con anterioridad²¹³ y podría deberse al hecho de que la renina se sintetiza y almacena en cantidades considerables en granulos en las celulas yuxtglomerulares, para poder responder asi rapidamente a

los estímulos^{239;272}. Por ello, puede suceder que se produzcan importantes cambios en los niveles plasmáticos de renina que permitirían cambios en lo de angiotensina, sin que se produzca ninguna afectación en el RNAm de la renina.

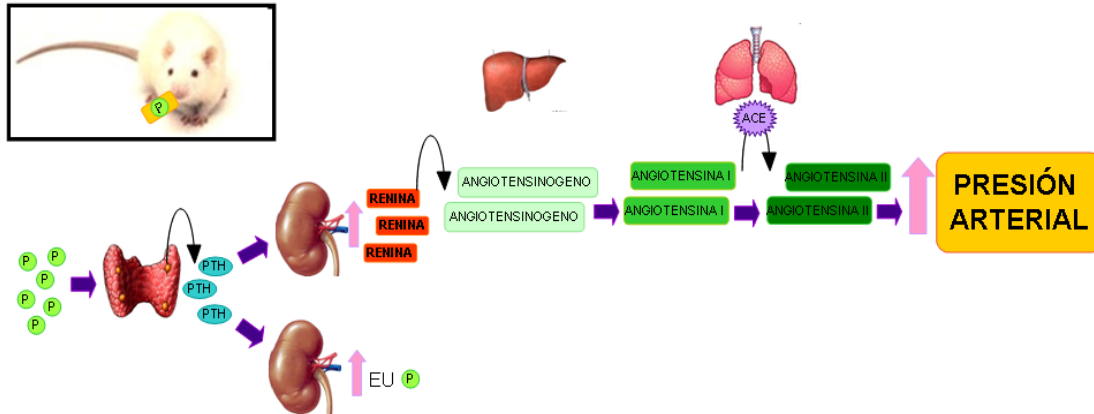


Figura18: El aumento en la ingesta de fósforo desencadena un aumento de la presión arterial. El fósforo estimula la síntesis y secreción de PTH, que provoca un aumento de la fosfaturia. Además la PTH estimula la secreción renal de renina. La renina activa el sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona al fragmentar la molécula de angiotensinógeno (producida por el hígado), produciendo angiotensina I que será convertida en angiotensina II por la enzima convertidora de angiotensina (ECA), producida en capilares pulmonares. La angiotensina II lleva a cabo una serie de acciones encaminadas al aumento de la presión arterial.

Pero por otro lado el incremento en los niveles de PTH induce la conversión de la forma activa de la vitamina D, la 1,25 (OH)₂D₃ por la acción del enzima 1 α hidroxilasa renal. Observaciones clínicas mostraron una relación inversa entre los niveles plasmáticos de vitamina D y la presión sanguínea y actividad plasmática de la renina^{37;167;178}. El VDR es un regulador negativo de la expresión de renina¹⁷⁴. Sin embargo, hay estudios que muestran el efecto directo de la PTH sobre la secreción de renina^{6;94;163;170;196;219;280;313} sin intervención de la vitamina D. Por ello podemos afirmar que el efecto de la vitamina D no es suficiente para contrarrestar el efecto que la PTH tiene sobre el sistema renina-angiotensina-aldosterona y con ello sobre la presión arterial de nuestro modelo experimental.

Por otro lado quisimos estudiar cual era la relación entre esta ingesta elevada de fosforo y la calcificación vascular. Los niveles de fósforo siempre se han asociado a calcificación vascular tanto en modelos humanos como animales de ERC¹⁷, sin embargo su relación en sujetos con función renal normal no está clara. Algunos autores se han referido al calcio y al fósforo como los “mecanismos pasivos de calcificación”. Los niveles elevados de Ca, P y CaxP (en pacientes con ERC y

asociados con ECV en estos pacientes¹⁷) promueven la formación y crecimiento de núcleos de cristales de bioapatita¹⁸. En estudios *in vitro* se encontró que cuando las CMLV se incuban con altas concentraciones de calcio y fósforo, se acumula bioapatita en la matriz extracelular. Pero este proceso no es solo una precipitación pasiva de iones divalentes, sino que, como ya comentamos anteriormente, implica una serie de cambios fenotípicos en las CMLV, y la up-regulación de los marcadores osteogénicos^{206;207;293}. El alto fósforo estimula la actividad de cotransportador de Na-P (Pit-1), mientras que el alto calcio incrementa su expresión. Este transporte permite la acumulación de fósforo dentro de la célula, lo que sirve de señal para la expresión de los factores osteogénicos. La combinación de estos factores conlleva que la célula sea susceptible de calcificación⁹⁵. Además los estudios de Foley^{87;88} determinaron la asociación entre los niveles de fósforo y los de calcio de la arteria coronaria en una población de adultos sanos. Pudieron concluir que los altos niveles séricos de fósforo, incluso dentro de un rango normal, eran un factor de riesgo de aterosclerosis de la arteria coronaria en adultos sanos.

Como comentamos previamente, la calcificación vascular se asocia con un incremento en la presión sanguínea y en la presión de pulso, debido a cambios en la elasticidad de las arterias. Estudios recientes indican que la presión de pulso es un factor de riesgo de HVI e infarto⁶⁸. Las ratas de nuestro trabajo no experimentan cambio en la elasticidad de las arterias, aunque se puede apreciar un pequeño, pero no significativo, cambio en el contenido de calcio de las arterias de los animales alimentados con dietas altas en fósforo. Tampoco detectamos ningún cambio en el ratio peso de corazón/peso del cuerpo, lo que indica ausencia de HVI.

Los animales alimentados con las dietas altas en fósforo presentan altos niveles plasmáticos de este ión. El quelante del fósforo no tiene efecto sobre ello, lo que se debe probablemente al hecho de que los niveles de vitamina D estén todavía altos en estos animales. La excreción renal de fósforo esta regulada por la tasa de filtración glomerular y la de reabsorción tubular. La reabsorción de fósforo en el tubulo proximal está mediada por mecanismos de transporte activo Na dependientes²¹⁴, con lo que la absorción de fósforo va acompañada de la de Na. El regulador hormonal de la reabsorción de fósforo mas importante es la PTH, la cual disminuye la reabsorción tubular e incrementa su excreción renal. Como se puede ver en los resultados, la PTH aumenta la excreción urinaria de P en las dietas con alto contenido en P, lo que va

acompañado del incremento en la excreción de Na. El principal efecto fisiológico de la PTH es la regulación del transporte renal de electrolitos y agua¹⁵⁸. Es de sobra conocido que un incremento en la secreción endógena de PTH puede disminuir la reabsorción de Na en el tubulo proximal²⁶³ e induce una desregulación en la actividad, tráfico y expresión de los transportadores de Na³²¹. La elevación de la PTH produce un aumento de la natriuresis seguido de poliuria. La excreción urinaria de Na y el volumen de orina son más altos en todos los grupos alimentados con dietas ricas en fósforo, lo que se debe a la elevación de la PTH. Sin embargo la adición del quelante no produce un descenso de la excreción urinaria de Na a pesar de la bajada en los niveles de PTH. Esto podría deberse al efecto de la Angiotensina II. Un descenso en los niveles de Angiotensina II reducen la reabsorción tubular de Na y agua, compensando el efecto contrario debido al descenso de PTH²⁶⁹.

Los niveles séricos de fósforo juegan un papel fundamental en la homeostasis del calcio: una alta concentración de fósforo estimula la secreción de PTH, que estimula la liberación de calcio del hueso y reduce su excreción^{205;220;279}. Las dietas con alto fósforo inducen un incremento en los niveles séricos de calcio junto con una reducción de la excreción fraccional de este ion, indicando un aumento en su reabsorción. Todos estos efectos son debidos probablemente a la acción de la PTH. El carbonato de lantano provoca un descenso en los niveles sanguíneos de Ca en el grupo alimentado con dieta alta en P pero no en la muy alta. Esto podría deberse a los altos niveles de vitamina D en la dieta con muy alto P más el quelante, que induciría una mayor absorción de Ca en el intestino.

En resumen, las desregulaciones producidas por la uremia en el metabolismo de la vitamina D en las células del vaso juegan un importante papel en el desarrollo de la aterosclerosis y de las calcificaciones vasculares, a la vez que son fundamentales a la hora de elegir tratamiento para estos pacientes. La 1,25(OH)₂D₃ induce la expresión de RANKL que desencadenará una serie de señales cuyo resultado final es la calcificación de las CMLV. El fósforo resulta, ya en animales sanos, perjudicial ya que provoca un aumento de la PTH y de presión arterial, de ahí la vital importancia de su control en los pacientes con ERC.

_____ Conclusiones

1. El Calcitriol y su análogo el Paricalcitol tienen una respuesta diferencial en la calcificación vascular tanto *in vitro* como *in vivo*. El Calcitriol incrementa la calcificación vascular y el Paricalcitol no.
2. El diferente efecto en la calcificación del Calcitriol y el Paricalcitol es independiente de los niveles de calcio y fósforo.
3. La vitamina D induce la expresión de RANKL en las CMLV. RANKL a través de la unión a su receptor RANK y de la activación de la vía alternativa de NF-κB, induce la expresión BMP4 que promueve la calcificación vascular
4. Los niveles circulantes de RANKL no se pueden utilizar como indicadores del nivel de calcificación vascular de pacientes. No son indicadores de la situación real del vaso.
5. La uremia provoca una desregulación de las proteínas implicadas en el metabolismo de la vitamina D en las CMLV. Esta desregulación produce un incremento local de la síntesis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, que podría tener un efecto autocrino-paracrino sobre las células del vaso. La aterosclerosis acelerada que sufren los pacientes urémicos podría estar relacionada con este incremento.
6. El aumento de la síntesis local de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ estimula la producción de RANKL en las CMLV y con ello la calcificación.
7. El tratamiento con diferentes activadores del VDR tiene un efecto diferente sobre la síntesis local de calcitriol.
8. La regulación de las proteínas involucradas en el metabolismo de la vitamina D parece ser diferente en el tejido renal y arterial.
9. El fósforo de la dieta estimula la producción de PTH, que permite la elevación de la expresión de renina, con el consecuente incremento en los niveles séricos de angiotensina II y de la presión arterial tanto sistólica como diastólica.

10. A corto plazo la ingesta elevada de fósforo en animales con función renal normal no provoca un aumento de las calcificaciones vasculares

Bibliografía

1. **A**dams JS, Gacad MA: Characterization of 1 alpha-hydroxylation of vitamin D3 sterols by cultured alveolar macrophages from patients with sarcoidosis. *J Exp Med* 161:755-765, 1985
2. Adroque HJ, Frazier MR, Zeluff B, Suki WN: Systemic calciphylaxis revisited. *Am J Nephrol* 1:177-183, 1981
3. Almaden Y, Canalejo A, Hernandez A, Ballesteros E, Garcia-Navarro S, Torres A, Rodriguez M: Direct effect of phosphorus on PTH secretion from whole rat parathyroid glands in vitro. *J Bone Miner Res* 11:970-976, 1996
4. Amann K, Wolf B, Nichols C, Tornig J, Schwarz U, Zeier M, Mall G, Ritz E: Aortic changes in experimental renal failure - Hyperplasia or hypertrophy of smooth muscle cells? *Hypertension* 29:770-775, 1997
5. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L: A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390:175-179, 1997
6. Andersson P, Rydberg E, Willenheimer R: Primary hyperparathyroidism and heart disease--a review. *Eur Heart J* 25:1776-1787, 2004
7. Andress D: Nonclassical aspects of differential vitamin D receptor activation: implications for survival in patients with chronic kidney disease. *Drugs* 67:1999-2012, 2007
8. Andress DL, Norris KC, Coburn JW, Slatopolsky EA, Sherrard DJ: Intravenous calcitriol in the treatment of refractory osteitis fibrosa of chronic renal failure. *N Engl J Med* 321:274-279, 1989
9. Autissier V, Damment SJ, Henderson RA: Relative in vitro efficacy of the phosphate binders lanthanum carbonate and sevelamer hydrochloride. *J Pharm Sci* 96:2818-2827, 2007

10. **B**aker SJ, Reddy EP: Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 17:3261-3270, 1998
11. Barsony J, McKoy W: Molybdate increases intracellular 3',5'-guanosine cyclic monophosphate and stabilizes vitamin D receptor association with tubulin-containing filaments. *J Biol Chem* 267:24457-24465, 1992

12. Berndt T, Craig TA, Bowe AE, Vassiliadis J, Reczek D, Finnegan R, Jan De Beur SM, Schiavi SC, Kumar R: Secreted frizzled-related protein 4 is a potent tumor-derived phosphaturic agent. *J Clin Invest* 112:785-794, 2003
13. Berndt TJ, Craig TA, McCormick DJ, Lanske B, Sitara D, Razzaque MS, Pragnell M, Bowe AE, O'Brien SP, Schiavi SC, Kumar R: Biological activity of FGF-23 fragments. *Pflugers Arch* 454:615-623, 2007
14. Bernini G, Moretti A, Lonzi S, Bendinelli C, Miccoli P, Salvetti A: Renin-angiotensin-aldosterone system in primary hyperparathyroidism before and after surgery. *Metabolism* 48:298-300, 1999
15. Bikle, D. D. Extra Renal Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D and its Health Implications. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism* . 2009.
16. Bikle DD: Clinical counterpoint: vitamin D: new actions, new analogs, new therapeutic potential. *Endocr Rev* 13:765-784, 1992
17. Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK: Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: A national study. *Am J Kidney Dis* 31:607-617, 1998
18. Block GA, Port FK: Re-evaluation of risks associated with hyperphosphatemia and hyperparathyroidism in dialysis patients: Recommendations for a change in management. *Am J Kidney Dis* 35:1226-1237, 2000
19. Bostrom K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL: Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 91:1800-1809, 1993
20. Bouillon R, Okamura WH, Norman AW: Structure-Function-Relationships in the Vitamin-D Endocrine System. *Endocr Rev* 16:200-257, 1995
21. Boukhris R, Becker KL: Calcification of the aorta and osteoporosis. A roentgenographic study. *JAMA* 219:1307-1311, 1972
22. Bourdeau A, Atmani F, Grosse B, Lieberherr M: Rapid effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and extracellular Ca²⁺ on phospholipid metabolism in dispersed porcine parathyroid cells. *Endocrinology* 127:2738-2743, 1990
23. Boyce BF, Xing L: Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther* 9 Suppl 1:S1, 2007
24. Brahimi M, Dahan M, Dabire H, Levy BI: Impact of pulse pressure on degree of cardiac hypertrophy in patients with chronic uraemia. *J Hypertens* 18:1645-1650, 2000
25. Brandstrom H, Bjorkman T, Ljunggren O: Regulation of osteoprotegerin secretion from primary cultures of human bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 280:831-835, 2001

26. Brandstrom H, Jonsson KB, Ohlsson C, Vidal O, Ljunghall S, Ljunggren O: Regulation of osteoprotegerin mRNA levels by prostaglandin E2 in human bone marrow stroma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 247:338-341, 1998
27. Brown AJ, Dusso A, Lopez-Hilker S, Lewis-Finch J, Grooms P, Slatopolsky E: 1,25-(OH)₂D receptors are decreased in parathyroid glands from chronically uremic dogs. *Kidney Int* 35:19-23, 1989
28. Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E: Selective vitamin D analogs and their therapeutic applications. *Semin Nephrol* 14:156-174, 1994
29. Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E: Vitamin D. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 277:F157-F175, 1999
30. Brown AJ, Krits I, Armbrecht HJ: Effect of age, vitamin D, and calcium on the regulation of rat intestinal epithelial calcium channels. *Arch Biochem Biophys* 437:51-58, 2005
31. Brown AJ, Ritter C, Slatopolsky E, Muralidharan KR, Okamura WH, Reddy GS: 1Alpha,25-dihydroxy-3-epi-vitamin D₃, a natural metabolite of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃, is a potent suppressor of parathyroid hormone secretion. *J Cell Biochem* 73:106-113, 1999
32. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, Hebert SC: Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 366:575-580, 1993
33. Brumbaugh PF, Haussler MR: 1 Alpha,25-dihydroxycholecalciferol receptors in intestine. I. Association of 1 alpha,25-dihydroxycholecalciferol with intestinal mucosa chromatin. *J Biol Chem* 249:1251-1257, 1974
34. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu WL, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS: osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes & Development* 12:1260-1268, 1998
35. Bukoski RD, Li JY, Bo J: Effect of Long-Term Administration of 125 (Oh)₂ Vitamin-D(3) on Blood-Pressure and Resistance Artery Contractility in the Spontaneously Hypertensive Rat. *Am J Hypertens* 6:944-950, 1993
36. Bukoski RD, Xue H: On the Vascular Inotropic Action of 1,25-(Oh)₂ Vitamin-D₃. *Am J Hypertens* 6:388-396, 1993
37. Burgess ED, Hawkins RG, Watanabe M: Interaction of 1,25-dihydroxyvitamin D and plasma renin activity in high renin essential hypertension. *Am J Hypertens* 3:903-905, 1990
38. Burke AP, Taylor A, Farb A, Malcom GT, Virmani R: Coronary calcification: insights from sudden coronary death victims. *Z Kardiol* 89 Suppl 2:49-53, 2000
39. Burtis WJ, Wu T, Bunch C, Wysolmerski JJ, Insogna KL, Weir EC, Broadus AE, Stewart AF: Identification of a novel 17,000-dalton parathyroid hormone-like

adenylate cyclase-stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *J Biol Chem* 262:7151-7156, 1987

40. **C**ardus A, Gallego C, Muray S, Marco MP, Parisi E, Aldea M, Fernandez E: [Differential effect of vitamin D analogues on the proliferation of vascular smooth muscle cells]. *Nefrologia* 23 Suppl 2:117-121, 2003
41. Cardus A, Parisi E, Gallego C, Aldea M, Fernandez E, Valdivielso JM: 1,25-dihydroxyvitamin D-3 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through a VEGF-mediated pathway. *Kidney Int* 69:1377-1384, 2006
42. Carlberg C: The concept of multiple vitamin D signaling pathways. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1:10-14, 1996
43. Chaisson ML, Branstetter DG, Derry JM, Armstrong AP, Tometsko ME, Takeda K, Akira S, Dougall WC: Osteoclast differentiation is impaired in the absence of inhibitor of kappa B kinase alpha. *J Biol Chem* 279:54841-54848, 2004
44. Chen AL, Fang C, Liu C, Leslie MP, Chang E, Di Cesare PE: Expression of bone morphogenetic proteins, receptors, and tissue inhibitors in human fetal, adult, and osteoarthritic articular cartilage. *J Orthop Res* 22:1188-1192, 2004
45. Chen D, Zhao M, Mundy GR: Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 22:233-241, 2004
46. Chen NX, Duan D, O'Neill KD, Wolisi GO, Koczman JJ, Laclair R, Moe SM: The mechanisms of uremic serum-induced expression of bone matrix proteins in bovine vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* 70:1046-1053, 2006
47. Chen NX, O'Neill KD, Duan D, Moe SM: Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* 62:1724-1731, 2002
48. Chertow BS, Sivitz WI, Baranetsky NG, Clark SA, Waite A, Deluca HF: Cellular Mechanisms of Insulin Release - the Effects of Vitamin-D Deficiency and Repletion on Rat Insulin-Secretion. *Endocrinology* 113:1511-1518, 1983
49. Coates T, Kirkland GS, Dymock RB, Murphy BF, Brealey JK, Mathew TH, Disney AP: Cutaneous necrosis from calcific uremic arteriolopathy. *Am J Kidney Dis* 32:384-391, 1998
50. Collin-Osdoby P: Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circ Res* 95:1046-1057, 2004
51. Collin-Osdoby P, Rothe L, Anderson F, Nelson M, Maloney W, Osdoby P: Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human

- microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 276:20659-20672, 2001
52. Cozzolino M, Brancaccio D: Emerging role for the vitamin D receptor activator (VDRA), paricalcitol, in the treatment of secondary hyperparathyroidism. *Expert Opin Pharmacother* 9:947-954, 2008
53. Cozzolino M, Gallieni M, Corsi C, Bastagli A, Brancaccio D: Management of calcium refilling post-parathyroidectomy in end-stage renal disease. *J Nephrol* 17:3-8, 2004
54. Cross HS, Bareis P, Hofer H, Bischof MG, Bajna E, Kriwanek S, Bonner E, Peterlik M: 25-Hydroxyvitamin D(3)-1alpha-hydroxylase and vitamin D receptor gene expression in human colonic mucosa is elevated during early cancerogenesis. *Steroids* 66:287-292, 2001
55. Csiszar A, Smith KE, Koller A, Kaley G, Edwards JG, Ungvari Z: Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression in endothelial cells: role of nuclear factor-kappaB activation by tumor necrosis factor-alpha, H2O2, and high intravascular pressure. *Circulation* 111:2364-2372, 2005
56. Culeton BF, Wilson PW: Cardiovascular disease: risk factors, secular trends, and therapeutic guidelines. *J Am Soc Nephrol* 9:S5-15, 1998
57. **D**'Amour P: Circulating PTH molecular forms: what we know and what we don't. *Kidney Int Suppl*S29-S33, 2006
58. D'Amour P, Brossard JH, Rousseau L, Roy L, Gao P, Cantor T: Amino-terminal form of parathyroid hormone (PTH) with immunologic similarities to hPTH(1-84) is overproduced in primary and secondary hyperparathyroidism. *Clin Chem* 49:2037-2044, 2003
59. Danielsson C, Mathiasen IS, James SY, Nayeri S, Bretting C, Hansen CM, Colston KW, Carlberg C: Sensitive induction of apoptosis in breast cancer cells by a novel 1,25-dihydroxyvitamin D3 analogue shows relation to promoter selectivity. *J Cell Biochem* 66:552-562, 1997
60. Dao HH, Essalihi R, Bouvet C, Moreau P: Evolution and modulation of age-related medial elastocalcinosis: impact on large artery stiffness and isolated systolic hypertension. *Cardiovasc Res* 66:307-317, 2005
61. de la PC, Fernandez E, Gonzalez Casaus ML, Gonzalez PE: [Different biological functions in PTH molecules. What are we measuring?]. *Nefrologia* 28:123-128, 2008

62. Delissalde F, Hernandez MA, Barron A, Bermejo L, Arias J, Halhali A, Castro I: [Vitamin D induces proliferation in rat endometrium cultured cells]. *Rev Invest Clin* 50:113-118, 1998
63. Delmez JA, Slatopolsky E: Hyperphosphatemia: its consequences and treatment in patients with chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 19:303-317, 1992
64. Demer LL: A skeleton in the atherosclerosis closet. *Circulation* 92:2029-2032, 1995
65. Demer LL: Vascular calcification and osteoporosis: inflammatory responses to oxidized lipids. *Int J Epidemiol* 31:737-741, 2002
66. Denda M, Finch J, Brown AJ, Nishii Y, Kubodera N, Slatopolsky E: 1,25-dihydroxyvitamin D3 and 22-oxacalcitriol prevent the decrease in vitamin D receptor content in the parathyroid glands of uremic rats. *Kidney Int* 50:34-39, 1996
67. Dhore CR, Cleutjens JPM, Lutgens E, Cleutjens KBJM, Geusens PPM, Kitslaar PJEH, Tordoir JHM, Spronk HMH, Vermeer C, Daemen MJAP: Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 21:1998-2003, 2001
68. Di B, V, Pedrinelli R, Giorgi D, Bertini A, Caputo MT, Cioppi A, Talini E, Leonardo M, Dell'Omo G, Paterni M, Giusti C: Microalbuminuria, pulse pressure, left ventricular hypertrophy, and myocardial ultrasonic tissue characterization in essential hypertension. *Angiology* 52:175-183, 2001
69. Dobrez DG, Mathes A, Amdahl M, Marx SE, Melnick JZ, Sprague SM: Paricalcitol-treated patients experience improved hospitalization outcomes compared with calcitriol-treated patients in real-world clinical settings. *Nephrology Dialysis Transplantation* 19:1174-1181, 2004
70. Doran AC, Meller N, McNamara CA: Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:812-819, 2008
71. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G: Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89:747-754, 1997
72. Dunlop TW, Vaisanen S, Frank C, Molnar F, Sinkkonen L, Carlberg C: The human peroxisome proliferator-activated receptor delta gene is a primary target of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and its nuclear receptor. *J Mol Biol* 349:248-260, 2005
73. Dusso AS: Vitamin D receptor: mechanisms for vitamin D resistance in renal failure. *Kidney Int Suppl* S6-S9, 2003
74. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E: Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 289:F8-28, 2005

75. Dusso AS, Finch J, Brown A, Ritter C, Delmez J, Schreiner G, Slatopolsky E: Extrarenal Production of Calcitriol in Normal and Uremic Humans. *J Clin Endocrinol Metab* 72:157-164, 1991

- E**
76. Edmonds ME, Morrison N, Laws JW, Watkins PJ: Medial arterial calcification and diabetic neuropathy. *Br Med J (Clin Res Ed)* 284:928-930, 1982
77. Eknoyan G: Meeting the challenges of the new K/DOQI guidelines. *Am J Kidney Dis* 41:3-10, 2003
78. Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR: Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 273:14363-14367, 1998
79. Eriksson AE, Cousens LS, Weaver LH, Matthews BW: Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3441-3445, 1991
80. Evans, C. H. In biochemistry of the lanthanides. Plenum Press, New York . 1990.

- F**
81. Fagugli RM, Pasini P, Quintaliani G, Pasticci F, Ciao G, Cicconi B, Ricciardi D, Santirosi PV, Buoncristiani E, Timio F, Valente F, Buoncristiani U: Association between extracellular water, left ventricular mass and hypertension in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 18:2332-2338, 2003
82. Fang J, Madhavan S, Alderman MH: Pulse pressure: A predictor of cardiovascular mortality among young normotensive subjects. *Am J Hypertens* 12:12A, 1999
83. Farzaneh-Far A, Shanahan CM: Biology of vascular calcification in renal disease. *Nephron Exp Nephrol* 101:e134-e138, 2005
84. Finch JL, Brown AJ, Slatopolsky E: Differential effects of 1,25-dihydroxy-vitamin D-3 and 19-nor-1,25-dihydroxy-vitamin D-2 on calcium and phosphorus resorption in bone. *Journal of the American Society of Nephrology* 10:980-985, 1999

85. Fitzpatrick LA, Severson A, Edwards WD, Ingram RT: Diffuse calcification in human coronary arteries. Association of osteopontin with atherosclerosis. *J Clin Invest* 94:1597-1604, 1994
86. Floege J, Ketteler M: Vascular calcification in patients with end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 19 Suppl 5:V59-V66, 2004
87. Foley RN, Collins AJ, Herzog CA, Ishani A, Kalra PA: Serum phosphate and left ventricular hypertrophy in young adults: the coronary artery risk development in young adults study. *Kidney Blood Press Res* 32:37-44, 2009
88. Foley RN, Collins AJ, Herzog CA, Ishani A, Kalra PA: Serum phosphorus levels associate with coronary atherosclerosis in young adults. *J Am Soc Nephrol* 20:397-404, 2009
89. Fuster, V., Ross, R., and Tropol E.J. Atherosclerosis y enfermedad arterial coronaria. Springer Science & Bussines . 1997.

90. **G**allieni M, Brancaccio D, Padovese P, Rolla D, Bedani P, Colantonio G, Bronzieri C, Bagni B, Tarolo G: Low-dose intravenous calcitriol treatment of secondary hyperparathyroidism in hemodialysis patients. Italian Group for the Study of Intravenous Calcitriol. *Kidney Int* 42:1191-1198, 1992
91. Gallieni M, Kamimura S, Ahmed A, Bravo E, Delmez J, Slatopolsky E, Dusso A: Kinetics of Monocyte 1-Alpha-Hydroxylase in Renal-Failure. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 37:F746-F753, 1995
92. Garland CF, Garland FC, Gorham ED: Calcium and vitamin D. Their potential roles in colon and breast cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci* 889:107-119, 1999
93. Gascon-Barre M, Demers C, Ghrab O, Theodoropoulos C, Lapointe R, Jones G, Valiquette L, Menard D: Expression of CYP27A, a gene encoding a vitamin D-25 hydroxylase in human liver and kidney. *Clin Endocrinol (Oxf)* 54:107-115, 2001
94. Gennari C, Nami R, Gonnelli S: Hypertension and primary hyperparathyroidism: the role of adrenergic and renin-angiotensin-aldosterone systems. *Miner Electrolyte Metab* 21:77-81, 1995
95. Giachelli CM: Vascular calcification mechanisms. *J Am Soc Nephrol* 15:2959-2964, 2004
96. Giachelli CM, Bae N, Almeida M, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz SM: Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 92:1686-1696, 1993

97. Giachelli CM, Speer MY, Li X, Rajachar RM, Yang H: Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin. *Circ Res* 96:717-722, 2005
98. Giachelli CM, Steitz S: Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol* 19:615-622, 2000
99. Glisson F. De Raquitide sive Morbo Puerili que vulgo. The rickets dicitur tractatus. Adscitis in operis societatem Georgio date et Ahasuero Regemortero. London, g Du-Gardi. 1650.
100. Gochuico BR, Zhang J, Ma BY, Marshak-Rothstein A, Fine A: TRAIL expression in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278:L1045-L1050, 2000
101. Goldsmith D, Ritz E, Covic A: Vascular calcification: a stiff challenge for the nephrologist: does preventing bone disease cause arterial disease? *Kidney Int* 66:1315-1333, 2004
102. Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, Yoon C, Gales B, Sider D, Wang Y, Chung J, Emerick A, Greaser L, Elashoff RM, Salusky IB: Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med* 342:1478-1483, 2000
103. Graham TR, Odero-Marah VA, Chung LW, Agrawal KC, Davis R, bdel-Mageed AB: PI3K/Akt-dependent transcriptional regulation and activation of BMP-2-Smad signaling by NF-kappaB in metastatic prostate cancer cells. *Prostate* 69:168-180, 2009
104. Green EA, Flavell RA: TRANCE-RANK, a new signal pathway involved in lymphocyte development and T cell activation. *J Exp Med* 189:1017-1020, 1999
105. Guerin AP, London GM, Marchais SJ, Metivier F: Arterial stiffening and vascular calcifications in end-stage renal disease. *Nephrology Dialysis Transplantation* 15:1014-1021, 2000
106. Guillemant J, Guillemant S: Early rise in cyclic GMP after 1,25-dihydroxycholecalciferol administration in the chick intestinal mucosa. *Biochem Biophys Res Commun* 93:906-911, 1980
107. Gurlek A, Pittelkow MR, Kumar R: Modulation of growth factor/cytokine synthesis and signaling by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3): implications in cell growth and differentiation. *Endocr Rev* 23:763-786, 2002
108. Guyton A.C. Fisiologia Médica, 11ª edición. 914-917. 2006.
Ref Type: Generic

109. **H**affner D, Hocher B, Muller D, Simon K, Konig K, Richter CM, Eggert B, Schwarz J, Godes M, Nissel R, Querfeld U: Systemic cardiovascular disease in uremic rats induced by 1,25(OH)(2)D-3. *J Hypertens* 23:1067-1075, 2005
110. Hak AE, Pols HA, van Hemert AM, Hofman A, Witteman JC: Progression of aortic calcification is associated with metacarpal bone loss during menopause: a population-based longitudinal study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1926-1931, 2000
111. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, Dominguez CE, Jurutka PW: The nuclear vitamin D receptor: Biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* 13:325-349, 1998
112. Hayashi K, Nakamura S, Nishida W, Sobue K: Bone morphogenetic protein-induced MSX1 and MSX2 inhibit myocardin-dependent smooth muscle gene transcription. *Mol Cell Biol* 26:9456-9470, 2006
113. Heiss A, DuChesne A, Denecke B, Grotzinger J, Yamamoto K, Renne T, Jahnen-Dechent W: Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles. *J Biol Chem* 278:13333-13341, 2003
114. Hermann-Arnhof KM, Kastenbauer T, Publig T, Novotny P, Loho N, Schwarz S, Koller U, Fitzgerald R: Initially elevated osteoprotegerin serum levels may predict a perioperative myocardial lesion in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Crit Care Med* 34:76-80, 2006
115. Hirota S, Imakita M, Kohri K, Ito A, Morii E, Adachi S, Kim HM, Kitamura Y, Yutani C, Nomura S: Expression of osteopontin messenger RNA by macrophages in atherosclerotic plaques. A possible association with calcification. *Am J Pathol* 143:1003-1008, 1993
116. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S: Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 140:4382-4389, 1999
117. Hofbauer LC, Heufelder AE: Role of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *Journal of Molecular Medicine-Jmm* 79:243-253, 2001
118. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL: Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 140:4367-4370, 1999
119. Hofbauer LC, Schoppet M: Osteoprotegerin: a link between osteoporosis and arterial calcification? *Lancet* 358:257-259, 2001

120. Hofbauer LC, Schoppet M: Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *Jama-Journal of the American Medical Association* 292:490-495, 2004
121. Hofbauer LC, Shui C, Riggs BL, Dunstan CR, Spelsberg TC, O'Brien T, Khosla S: Effects of immunosuppressants on receptor activator of NF-kappaB ligand and osteoprotegerin production by human osteoblastic and coronary artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 280:334-339, 2001
122. Holick MF: Vitamin D: A millenium perspective. *J Cell Biochem* 88:296-307, 2003
123. Holliday LS, Gluck SL, Slatopolsky E, Brown AJ: 1,25-Dihydroxy-19-nor-vitamin D(2), a vitamin D analog with reduced bone resorbing activity in vitro. *J Am Soc Nephrol* 11:1857-1864, 2000
124. Hruska KA, Bar-Shavit Z, Malone JD, Teitelbaum S: Ca²⁺ priming during vitamin D-induced monocytic differentiation of a human leukemia cell line. *J Biol Chem* 263:16039-16044, 1988
125. Hruska KA, Mathew S, Saab G: Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circ Res* 97:105-114, 2005
126. Hsu CH, Patel SR, Vanholder R: Mechanism of decreased intestinal calcitriol receptor concentration in renal failure. *Am J Physiol* 264:F662-F669, 1993
127. Hsu CH, Patel SR, Young EW: Mechanism of Decreased Calcitriol Degradation in Renal-Failure. *Am J Physiol* 262:F192-F198, 1992
128. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ: Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3540-3545, 1999
129. Huang CX, Plantinga LC, Fink NE, Melamed ML, Coresh J, Powe NR: Phosphate levels and blood pressure in incident hemodialysis patients: a longitudinal study. *Adv Chronic Kidney Dis* 15:321-331, 2008
130. Huang DC, Papavasiliou V, Rhim JS, Horst RL, Kremer R: Targeted disruption of the 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene in ras-transformed keratinocytes demonstrates that locally produced 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses growth and induces differentiation in an autocrine fashion. *Mol Cancer Res* 1:56-67, 2002
131. Hunt JL, Fairman R, Mitchell ME, Carpenter JP, Golden M, Khalapyan T, Wolfe M, Neschis D, Milner R, Scoll B, Cusack A, Mohler ER, III: Bone formation in carotid plaques: a clinicopathological study. *Stroke* 33:1214-1219, 2002
132. Hutchison AJ, Speake M, Al-Baaj F: Reducing high phosphate levels in patients with chronic renal failure undergoing dialysis: a 4-week, dose-finding, open-label study with lanthanum carbonate. *Nephrol Dial Transplant* 19:1902-1906, 2004

133. **L**ibels LS, Alfrey AC, Huffer WE, Craswell PW, Anderson JT, Weil R, III: Arterial calcification and pathology in uremic patients undergoing dialysis. *Am J Med* 66:790-796, 1979
134. Ichikawa F, Sato K, Nanjo M, Nishii Y, Shinki T, Takahashi N, Suda T: Mouse primary osteoblasts express vitamin D3 25-hydroxylase mRNA and convert 1 alpha-hydroxyvitamin D3 into 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Bone* 16:129-135, 1995
135. Ichikawa Y, Hiwatashi A, Nishii Y: Tissue and subcellular distributions of cholecalciferol 25-hydroxylase: cytochrome P-450D25-linked monooxygenase system. *Comp Biochem Physiol B* 75:479-488, 1983
136. Iglesias A. Del raquitismo a la vitamina D. *Rev Mex Reumat* 19, 259-274. 2004.
137. Ikeda T, Shirasawa T, Esaki Y, Yoshiki S, Hirokawa K: Osteopontin mRNA is expressed by smooth muscle-derived foam cells in human atherosclerotic lesions of the aorta. *J Clin Invest* 92:2814-2820, 1993
138. Inoue T, Kawashima H: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -uptake by cultured vascular smooth muscle cells derived from rat aorta. *Biochem Biophys Res Commun* 152:1388-1394, 1988
139. Israel DI, Nove J, Kerns KM, Moutsatsos IK, Kaufman RJ: Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells. *Growth Factors* 7:139-150, 1992
140. **J**espersen B, Randlov A, Abrahamsen J, Fogh-Andersen N, Olsen NV, Kanstrup IL: Acute cardiovascular effect of 1,25-dihydroxycholecalciferol in essential hypertension. *Am J Hypertens* 11:659-666, 1998
141. Jimi E, Akiyama S, Tsurukai T, Okahashi N, Kobayashi K, Udagawa N, Nishihara T, Takahashi N, Suda T: Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. *J Immunol* 163:434-442, 1999
142. Jono S, Ikari Y, Shioi A, Mori K, Miki T, Hara K, Nishizawa Y: Serum osteoprotegerin levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circulation* 106:1192-1194, 2002

143. Jono S, Ikari Y, Vermeer C, Dissel P, Hasegawa K, Shioi A, Taniwaki H, Kizu A, Nishizawa Y, Saito S: Matrix Gla protein is associated with coronary artery calcification as assessed by electron-beam computed tomography. *Thromb Haemost* 91:790-794, 2004
144. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, Giachelli CM: Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 87:E10-E17, 2000
145. Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, Morii H: Parathyroid hormone-related peptide as a local regulator of vascular calcification. Its inhibitory action on in vitro calcification by bovine vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:1135-1142, 1997
146. Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, Morii H: 1,25-dihydroxyvitamin D-3 increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide. *Circulation* 98:1302-1306, 1998
147. Jono S, Shioi A, Ikari Y, Nishizawa Y: Vascular calcification in chronic kidney disease. *J Bone Miner Metab* 24:176-181, 2006

148. **K**/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. Kidney Disease Outcome Quality Initiative. *Am J Kidney Dis.* 39 (suppl 1). 2002. c
149. Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R, Haase KK, Sartkoc A, Kilic R, Brueckmann M, Lang S, Zahn I, Vahl C, Hagl S, Dempfle CE, Borggrefe M: Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *J Mol Cell Cardiol* 36:57-66, 2004
150. Kado DM, Browner WS, Blackwell T, Gore R, Cummings SR: Rate of bone loss is associated with mortality in older women: a prospective study. *J Bone Miner Res* 15:1974-1980, 2000
151. Kanegae Y, Tavares AT, Izpisua Belmonte JC, Verma IM: Role of Rel/NF-kappaB transcription factors during the outgrowth of the vertebrate limb. *Nature* 392:611-614, 1998
152. Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ: Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev* 29:155-192, 2008
153. Ketteler M: Fetuin-A and extraosseous calcification in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14:337-342, 2005
154. Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R, Wildberger JE, Mahnken AH, Bohm R, Metzger T, Wanner C, Jahnke-Dechent W, Floege J: Association of low fetuin-A

- (AHS) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet* 361:827-833, 2003
155. Kiechl S, Schett G, Schwaiger J, Seppi K, Eder P, Egger G, Santer P, Mayr A, Xu Q, Willeit J: Soluble receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and risk for cardiovascular disease. *Circulation* 116:385-391, 2007
156. Kiechl S, Schett G, Wenning G, Redlich K, Oberhollenzer M, Mayr A, Santer P, Smolen J, Poewe W, Willeit J: Osteoprotegerin is a risk factor for progressive atherosclerosis and cardiovascular disease. *Circulation* 109:2175-2180, 2004
157. Kilav R, Silver J, Naveh-Many T: Parathyroid hormone gene expression in hypophosphatemic rats. *J Clin Invest* 96:327-333, 1995
158. Kimmel, PL, Rivera, A, and Khatri, P. Effects of nonrenal hormones on the normal kidney. In: *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*. Becker KL. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 1885-1895. 2001.
Ref Type: Generic
159. Kondo T, Kitazawa R, Maeda S, Kitazawa S: 1 alpha,25 dihydroxyvitamin D3 rapidly regulates the mouse osteoprotegerin gene through dual pathways. *J Bone Miner Res* 19:1411-1419, 2004
160. Kong YY, Boyle WJ, Penninger JM: Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology. *Immunol Today* 21:495-502, 2000
161. Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ, Penninger JM: Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 402:304-309, 1999
162. Korkor AB: Reduced binding of [3H]1,25-dihydroxyvitamin D3 in the parathyroid glands of patients with renal failure. *N Engl J Med* 316:1573-1577, 1987
163. Kovacs L, Goth MI, Szabolcs I, Dohan O, Ferencz A, Szilagyi G: The effect of surgical treatment on secondary hyperaldosteronism and relative hyperinsulinemia in primary hyperparathyroidism. *Eur J Endocrinol* 138:543-547, 1998
164. Koyama H, Inaba M, Nishizawa Y, Ishimura E, Imanishi Y, Hini M, Furuyama T, Takagi H, Morii H: Potentiated 1,25(OH)2D3-induced 24-hydroxylase gene expression in uremic rat intestine. *Am J Physiol* 267:F926-F930, 1994
165. Koyama H, Nishizawa Y, Inaba M, Hino M, Prah J, Deluca HF, Morii H: Impaired homologous upregulation of vitamin D receptor in rats with chronic renal failure. *Am J Physiol* 266:F706-F712, 1994
166. Krajcsnik T, Bjorklund P, Marsell R, Ljunggren O, Akerstrom G, Jonsson KB, Westin G, Larsson TE: Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1alpha-hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *J Endocrinol* 195:125-131, 2007

167. Kristal-Boneh E, Froom P, Harari G, Ribak J: Association of calcitriol and blood pressure in normotensive men. *Hypertension* 30:1289-1294, 1997
168. Krohn K, Haffner D, Hugel U, Himmele R, Klaus G, Mehls O, Schaefer F: 1,25(OH)₂D₃ and dihydrotestosterone interact to regulate proliferation and differentiation of epiphyseal chondrocytes. *Calcif Tissue Int* 73:400-410, 2003
169. **L**acey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ: Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93:165-176, 1998
170. Lafferty FW: Primary hyperparathyroidism. Changing clinical spectrum, prevalence of hypertension, and discriminant analysis of laboratory tests. *Arch Intern Med* 141:1761-1766, 1981
171. Leboy PS: Regulating bone growth and development with bone morphogenetic proteins. *Ann N Y Acad Sci* 1068:14-18, 2006
172. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246:1306-1309, 1989
173. Levin A, Thompson CR, Ethier J, Carlisle EJ, Tobe S, Mendelssohn D, Burgess E, Jindal K, Barrett B, Singer J, Djurdjev O: Left ventricular mass index increase in early renal disease: impact of decline in hemoglobin. *Am J Kidney Dis* 34:125-134, 1999
174. Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP: 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 110:229-238, 2002
175. Lieberherr M: Effects of vitamin D₃ metabolites on cytosolic free calcium in confluent mouse osteoblasts. *J Biol Chem* 262:13168-13173, 1987
176. Lieberherr M, Grosse B, Duchambon P, Druke T: A functional cell surface type receptor is required for the early action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on the phosphoinositide metabolism in rat enterocytes. *J Biol Chem* 264:20403-20406, 1989
177. Lin R, White JH: The pleiotropic actions of vitamin D. *Bioessays* 26:21-28, 2004
178. Lind L, Hanni A, Lithell H, Hvarfner A, Sorensen OH, Ljunghall S: Vitamin D is related to blood pressure and other cardiovascular risk factors in middle-aged men. *Am J Hypertens* 8:894-901, 1995

179. Liu S, Quarles LD: How fibroblast growth factor 23 works. *J Am Soc Nephrol* 18:1637-1647, 2007
180. Llach F, Yudd M: Paricalcitol in dialysis patients with calcitriol-resistant secondary hyperparathyroidism. *Am J Kidney Dis* 38:S45-S50, 2001
181. London GM: Cardiovascular calcifications in uremic patients: clinical impact on cardiovascular function. *J Am Soc Nephrol* 14:S305-S309, 2003
182. Lucas PA, Roullet C, Duchambon P, Lacour B, Drueke T: Rapid stimulation of calcium uptake by isolated rat enterocytes by 1,25(OH)2D3. *Pflugers Arch* 413:407-413, 1989
183. Lum L, Wong BR, Josien R, Becherer JD, Erdjument-Bromage H, Schlondorff J, Tempst P, Choi Y, Blobel CP: Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J Biol Chem* 274:13613-13618, 1999
184. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G: Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 386:78-81, 1997
185. Lusis AJ: Atherosclerosis. *Nature* 407:233-241, 2000
- M**
186. Ma J, Stampfer MJ, Gann PH, Hough HL, Giovannucci E, Kelsey KT, Hennekens CH, Hunter DJ: Vitamin D receptor polymorphisms, circulating vitamin D metabolites, and risk of prostate cancer in United States physicians. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7:385-390, 1998
187. Maccarthy EP, Yamashita W, Hsu A, Ooi BS: 1,25-Dihydroxyvitamin-D3 and Rat Vascular Smooth-Muscle Cell-Growth. *Hypertension* 13:954-959, 1989
188. Makiishi-Shimobayashi C, Tsujimura T, Iwasaki T, Yamada N, Sugihara A, Okamura H, Hayashi S, Terada N: Interleukin-18 up-regulates osteoprotegerin expression in stromal/osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 281:361-366, 2001
189. Malyankar UM, Scatena M, Suchland KL, Yun TJ, Clark EA, Giachelli CM: Osteoprotegerin is an alpha vbeta 3-induced, NF-kappa B-dependent survival factor for endothelial cells. *J Biol Chem* 275:20959-20962, 2000
190. Marchais SJ, Guerin AP, London GM: Arterial calcinosis, chronic renal failure and calcium antagonism. *Drugs* 44 Suppl 1:119-122, 1992
191. Martin KJ, Gonzalez E, Lindberg JS, Taccetta C, Amdahl M, Malhotra K, Llach F: Paricalcitol dosing according to body weight or severity of

- hyperparathyroidism: a double-blind, multicenter, randomized study. *Am J Kidney Dis* 38:S57-S63, 2001
192. Martin KJ, Gonzalez EA: Vitamin D analogues for the management of secondary hyperparathyroidism. *Am J Kidney Dis* 38:S34-S40, 2001
193. Martin KJ, Gonzalez EA: Metabolic bone disease in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 18:875-885, 2007
194. Martinez ME, Willett WC: Calcium, vitamin D, and colorectal cancer: a review of the epidemiologic evidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7:163-168, 1998
195. Marx L., Sarac E. Armile A. Calciphilaxis: a poorly understood yet potentially fatal disorder. *Dialysis & Transplantation* 28, 142-158. 1999.
Ref Type: Generic
196. Marx SJ: Hyperparathyroid and hypoparathyroid disorders. *N Engl J Med* 343:1863-1875, 2000
197. Massague J, Wotton D: Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 19:1745-1754, 2000
198. Mathur RV, Shortland JR, el-Nahas AM: Calciphylaxis. *Postgrad Med J* 77:557-561, 2001
199. Mazza A, Pessina AC, Gianluca P, Tikhonoff V, Pavei A, Casiglia E: Pulse pressure: An independent predictor of coronary and stroke mortality in elderly females from the general population. *Blood Press* 10:205-211, 2001
200. McMahon LP, Roger SD, Levin A: Development, prevention, and potential reversal of left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 15:1640-1647, 2004
201. Mellon WS, Deluca HF: An equilibrium and kinetic study of 1,25-dihydroxyvitamin D3 binding to chicken intestinal cytosol employing high specific activity 1,25-dehydroxy[3H-26, 27] vitamin D3. *Arch Biochem Biophys* 197:90-95, 1979
202. Mikhaylova L, Malmquist J, Nurminskaya M: Regulation of in vitro vascular calcification by BMP4, VEGF and Wnt3a. *Calcif Tissue Int* 81:372-381, 2007
203. Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, Van G, Kaufman S, Kostenuik PJ, Lacey DL, Boyle TJ, Simonet WS: Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J Exp Med* 192:463-474, 2000
204. Miyamoto K, Tatsumi S, Morita K, Takeda E: Does the parathyroid 'see' phosphate? *Nephrol Dial Transplant* 13:2727-2729, 1998

205. Moallem E, Kilav R, Silver J, Naveh-Many T: RNA-Protein binding and post-transcriptional regulation of parathyroid hormone gene expression by calcium and phosphate. *J Biol Chem* 273:5253-5259, 1998
206. Moe SM, Duan D, Doehle BP, O'Neill KD, Chen NX: Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels. *Kidney Int* 63:1003-1011, 2003
207. Moe SM, O'Neill KD, Duan D, Ahmed S, Chen NX, Leapman SB, Fineberg N, Kopecky K: Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins. *Kidney Int* 61:638-647, 2002
208. Mohler ER, III, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane MG, Kaplan FS: Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation* 103:1522-1528, 2001
209. Monkawa T, Yoshida T, Hayashi M, Saruta T: Identification of 25-hydroxyvitamin D3 1 α -hydroxylase gene expression in macrophages. *Kidney Int* 58:559-568, 2000
210. Morelli S, de Boland AR, Boland RL: Generation of inositol phosphates, diacylglycerol and calcium fluxes in myoblasts treated with 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Biochem J* 289 (Pt 3):675-679, 1993
211. Morgan JW, Morgan DM, Lasky SR, Ford D, Kouttab N, Maizel AL: Requirements for induction of vitamin D-mediated gene regulation in normal human B lymphocytes. *J Immunol* 157:2900-2908, 1996
212. Mori K, Shioi A, Jono S, Nishizawa Y, Morii H: Expression of matrix Gla protein (MGP) in an in vitro model of vascular calcification. *FEBS Lett* 433:19-22, 1998
213. Morishita R, Higaki J, Nagano M, Nakamura F, Tomita N, Zhao Y, Mikami H, Miyazaki M, Ogihara T: Discrepancy between renin mRNA and plasma renin level in angiotensin-converting enzyme inhibitor-treated rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 20:15-20, 1993
214. Murer H, Hernando N, Forster I, Biber J: Proximal tubular phosphate reabsorption: molecular mechanisms. *Physiol Rev* 80:1373-1409, 2000
215. Murray TM, Rao LG, Divieti P, Bringham FR: Parathyroid hormone secretion and action: evidence for discrete receptors for the carboxyl-terminal region and related biological actions of carboxyl-terminal ligands. *Endocr Rev* 26:78-113, 2005
216. Myers DE, Collier FM, Minkin C, Wang H, Holloway WR, Malakellis M, Nicholson GC: Expression of functional RANK on mature rat and human osteoclasts. *FEBS Lett* 463:295-300, 1999

217. **N**akagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, Morinaga T, Higashio K: RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 253:395-400, 1998
218. Nakagawa N, Yasuda H, Yano K, Mochizuki S, Kobayashi N, Fujimoto H, Shima N, Morinaga T, Chikazu D, Kawaguchi H, Higashio K: Basic fibroblast growth factor induces osteoclast formation by reciprocally regulating the production of osteoclast differentiation factor and osteoclastogenesis inhibitory factor in mouse osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 265:158-163, 1999
219. Nappi S, Saha H, Virtanen V, Limnell V, Sand J, Salmi J, Pasternack A: Left ventricular structure and function in primary hyperparathyroidism before and after parathyroidectomy. *Cardiology* 93:229-233, 2000
220. Naveh-Many T, Silver J: Regulation of parathyroid hormone gene expression by hypocalcemia, hypercalcemia, and vitamin D in the rat. *J Clin Invest* 86:1313-1319, 1990
221. Nayeri S, Carlberg C: Functional conformations of the nuclear 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor. *Biochem J* 327 (Pt 2):561-568, 1997
222. Nayeri S, Danielsson C, Kahlen JP, Schrader M, Mathiasen IS, Binderup L, Carlberg C: The anti-proliferative effect of vitamin D₃ analogues is not mediated by inhibition of the AP-1 pathway, but may be related to promoter selectivity. *Oncogene* 11:1853-1858, 1995
223. Nemere I, Dormanen MC, Hammond MW, Okamura WH, Norman AW: Identification of a specific binding protein for 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in basal-lateral membranes of chick intestinal epithelium and relationship to transcaltachia. *J Biol Chem* 269:23750-23756, 1994
224. Nemere I, Yoshimoto Y, Norman AW: Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: enhancement within fourteen minutes of exposure to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology* 115:1476-1483, 1984
225. Niall HD, Keutmann H, Sauer R, Hogan M, Dawson B, Aurbach G, Potts J, Jr.: The amino acid sequence of bovine parathyroid hormone I. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 351:1586-1588, 1970
226. Nitta K, Akiba T, Uchida K, Otsubo S, Otsubo Y, Takei T, Ogawa T, Yumura W, Kabaya T, Nihei H: Left ventricular hypertrophy is associated with arterial stiffness and vascular calcification in hemodialysis patients. *Hypertens Res* 27:47-52, 2004
227. Nitta K, Akiba T, Uchida K, Otsubo S, Takei T, Yumura W, Kabaya T, Nihei H: Serum osteoprotegerin levels and the extent of vascular calcification in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 19:1886-1889, 2004

228. Norman AW, Roth J, Orci L: The Vitamin-D Endocrine System - Steroid-Metabolism, Hormone Receptors, and Biological Response (Calcium-Binding Proteins). *Endocr Rev* 3:331-366, 1982
229. Novack DV, Yin L, Hagen-Stapleton A, Schreiber RD, Goeddel DV, Ross FP, Teitelbaum SL: The IkappaB function of NF-kappaB2 p100 controls stimulated osteoclastogenesis. *J Exp Med* 198:771-781, 2003
230. Nussey, S. S. and Whitehead, S. A. *Endocrinology, an integrated approach*. 2001.
231. Nykjaer A, Dragun D, Walther D, Vorum H, Jacobsen C, Herz J, Melsen F, Christensen EI, Willnow TE: An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3. *Cell* 96:507-515, 1999
232. **O**'Brien EA, Williams JHH, Marshall MJ: Osteoprotegerin ligand regulates osteoclast adherence to the bone surface in mouse calvaria. *Biochem Biophys Res Commun* 274:281-290, 2000
233. Onyia JE, Miles RR, Yang X, Halladay DL, Hale J, Glasebrook A, McClure D, Seno G, Churgay L, Chandrasekhar S, Martin TJ: In vivo demonstration that human parathyroid hormone 1-38 inhibits the expression of osteoprotegerin in bone with the kinetics of an immediate early gene. *J Bone Miner Res* 15:863-871, 2000
234. Orloff JJ, Wu TL, Stewart AF: Parathyroid hormone-like proteins: biochemical responses and receptor interactions. *Endocr Rev* 10:476-495, 1989
235. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ: Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89:765-771, 1997
236. **P**arfitt AM: Soft-Tissue Calcification in Uremia. *Arch Intern Med* 124:544-546, 1969
237. Parfrey PS, Foley RN, Harnett JD, Kent GM, Murray D, Barre PE: Outcome and risk factors of ischemic heart disease in chronic uremia. *Kidney Int* 49:1428-1434, 1996

238. Patel SR, Ke HQ, Vanholder R, Koenig RJ, Hsu CH: Inhibition of calcitriol receptor binding to vitamin D response elements by uremic toxins. *J Clin Invest* 96:50-59, 1995
239. Paul M, Poyan MA, Kreutz R: Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 86:747-803, 2006
240. Portale AA, Booth BE, Halloran BP, Morris RC, Jr.: Effect of dietary phosphorus on circulating concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D and immunoreactive parathyroid hormone in children with moderate renal insufficiency. *J Clin Invest* 73:1580-1589, 1984
241. Price PA, Faus SA, Williamson MK: Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:817-824, 2001
242. Price PA, June HH, Buckley JR, Williamson MK: Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 21:1610-1616, 2001
243. Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, Weissberg PL: Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro - Evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res* 87:1055-1062, 2000
- Q**
244. Quarles LD, Yohay DA, Carroll BA, Spritzer CE, Minda SA, Bartholomay D, Lobaugh BA: Prospective trial of pulse oral versus intravenous calcitriol treatment of hyperparathyroidism in ESRD. *Kidney Int* 45:1710-1721, 1994
245. Quesada JM. Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral. Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral Capítulo 6: Vitamina D. 2004.
- R**
246. Racz A, Barsony J: Hormone-dependent translocation of vitamin D receptors is linked to transactivation. *J Biol Chem* 274:19352-19360, 1999
247. Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, Stock SR, Donovan J, Springett M, Orszulak T, Fullerton DA, Tajik AJ, Bonow RO, Spelsberg T: Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation* 107:2181-2184, 2003

248. Rajasree S, Umashankar PR, Lal AV, Sarma PS, Kartha CC: 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor is upregulated in aortic smooth muscle cells during hypervitaminosis D. *Life Sci* 70:1777-1788, 2002
249. Razzaque MS, Lanske B: The emerging role of the fibroblast growth factor-23-klotho axis in renal regulation of phosphate homeostasis. *J Endocrinol* 194:1-10, 2007
250. Rebsamen MC, Sun JX, Norman AW, Liao JK: 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3 induces vascular smooth muscle cell migration via activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Circ Res* 91:17-24, 2002
251. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, Jahnen-Dechent W, Weissberg PL, Shanahan CM: Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 15:2857-2867, 2004
252. Rosenbaum DP, Holmes-Farley SR, Mandeville WH, Pitruzzello M, Goldberg DI: Effect of RenaGel, a non-absorbable, cross-linked, polymeric phosphate binder, on urinary phosphorus excretion in rats. *Nephrol Dial Transplant* 12:961-964, 1997
253. Ross FP: RANKing the importance of measles virus in Paget's disease. *J Clin Invest* 105:555-558, 2000
254. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801-809, 1993
255. Ruggiero M, Pacini S, Aterini S, Fallai C, Ruggiero C, Pacini P: Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with metastatic breast cancer. *Oncol Res* 10:43-46, 1998
256. Rutsch F, Ruf N, Vaingankar S, Toliat MR, Suk A, Hohne W, Schauer G, Lehmann M, Roscioli T, Schnabel D, Eppelen JT, Knisely A, Superti-Furga A, McGill J, Filippone M, Sinaiko AR, Vallance H, Hinrichs B, Smith W, Ferre M, Terkeltaub R, Nurnberg P: Mutations in ENPP1 are associated with 'idiopathic' infantile arterial calcification. *Nat Genet* 34:379-381, 2003
257. **S**aika M, Inoue D, Kido S, Matsumoto T: 17beta-estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor-alpha. *Endocrinology* 142:2205-2212, 2001
258. Sattler AM, Schoppet M, Schaefer JR, Hofbauer LC: Novel aspects on RANK ligand and osteoprotegerin in osteoporosis and vascular disease. *Calcif Tissue Int* 74:103-106, 2004

259. Sawaya BP, Koszewski NJ, Qi Q, Langub MC, Monier-Faugere MC, Malluche HH: Secondary hyperparathyroidism and vitamin D receptor binding to vitamin D response elements in rats with incipient renal failure. *J Am Soc Nephrol* 8:271-278, 1997
260. Schett G, Kiechl S, Redlich K, Oberhollenzer F, Weger S, Egger G, Mayr A, Jocher J, Xu Q, Pietschmann P, Teitelbaum S, Smolen J, Willeit J: Soluble RANKL and risk of nontraumatic fracture. *JAMA* 291:1108-1113, 2004
261. Schinke T, Karsenty G: Vascular calcification - a passive process in need of inhibitors. *Nephrology Dialysis Transplantation* 15:1272-1274, 2000
262. Schinke T, McKee MD, Kiviranta R, Karsenty G: Molecular determinants of arterial calcification. *Ann Med* 30:538-541, 1998
263. Schneider EG: Effect of parathyroid hormone secretion on sodium reabsorption by the proximal tubule. *Am J Physiol* 229:1170-1173, 1975
264. Schoppet M, Al Fakhri N, Franke FE, Katz N, Barth PJ, Maisch B, Preissner KT, Hofbauer LC: Localization of osteoprotegerin, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand in Monckeberg's sclerosis and atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab* 89:4104-4112, 2004
265. Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC: RANK ligand and osteoprotegerin - Paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 22:549-553, 2002
266. Schoppet M, Sattler AM, Schaefer JR, Herzum M, Maisch B, Hofbauer LC: Increased osteoprotegerin serum levels in men with coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1024-1028, 2003
267. Schoppet M, Schaefer JR, Hofbauer LC: Low serum levels of soluble RANK ligand are associated with the presence of coronary artery disease in men. *Circulation* 107:e76, 2003
268. Schrader M, Kahlen JP, Carlberg C: Functional characterization of a novel type of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 response element identified in the mouse c-fos promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 230:646-651, 1997
269. Schrier, R W. Diseases of the kidney & urinary tract. Lippincott Williams & Wilkins . 2007.
270. Schwarz S, Trivedi BK, Kalantar-Zadeh K, Kovesdy CP: Association of disorders in mineral metabolism with progression of chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 1:825-831, 2006
271. Schwarz U, Buzello M, Ritz E, Stein G, Raabe G, Wiest G, Mall G, Amann K: Morphology of coronary atherosclerotic lesions in patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 15:218-223, 2000
272. Schweda F, Kurtz A: Cellular mechanism of renin release. *Acta Physiol Scand* 181:383-390, 2004

273. Shanahan CM, Cary NR, Metcalfe JC, Weissberg PL: High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 93:2393-2402, 1994
274. Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME: Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation* 100:2168-2176, 1999
275. Shimada T, Urakawa I, Yamazaki Y, Hasegawa H, Hino R, Yoneya T, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T: FGF-23 transgenic mice demonstrate hypophosphatemic rickets with reduced expression of sodium phosphate cotransporter type IIa. *Biochem Biophys Res Commun* 314:409-414, 2004
276. Shin V, Zebboudj AF, Bostrom K: Endothelial cells modulate osteogenesis in calcifying vascular cells. *J Vasc Res* 41:193-201, 2004
277. Shioi A, Katagi M, Okuno Y, Mori K, Jono S, Koyama H, Nishizawa Y: Induction of bone-type alkaline phosphatase in human vascular smooth muscle cells: roles of tumor necrosis factor-alpha and oncostatin M derived from macrophages. *Circ Res* 91:9-16, 2002
278. Silberberg JS, Barre PE, Prichard SS, Sniderman AD: Impact of left ventricular hypertrophy on survival in end-stage renal disease. *Kidney Int* 36:286-290, 1989
279. Silver J, Kilav R, Naveh-Many T: Mechanisms of secondary hyperparathyroidism. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F367-F376, 2002
280. Silverberg SJ: Editorial: cardiovascular disease in primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3513-3514, 2000
281. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ: Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89:309-319, 1997
282. Siu-Caldera ML, Sekimoto H, Peleg S, Nguyen C, Kissmeyer AM, Binderup L, Weiskopf A, Vouros P, Uskokovic MR, Reddy GS: Enhanced biological activity of 1alpha,25-dihydroxy-20-epi-vitamin D3, the C-20 epimer of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3, is in part due to its metabolism into stable intermediary metabolites with significant biological activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 71:111-121, 1999
283. Slatopolsky E, Brown A, Dusso A: Pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* 56:S14-S19, 1999
284. Slatopolsky E, Finch J, Denda M, Ritter C, Zhong M, Dusso A, MacDonald PN, Brown AJ: Phosphorus restriction prevents parathyroid gland growth. High phosphorus directly stimulates PTH secretion in vitro. *J Clin Invest* 97:2534-2540, 1996

285. Slatopolsky E, Finch J, Ritter C, Denda M, Morrissey J, Brown A, DeLuca H: A new analog of calcitriol, 19-nor-1,25-(OH)₂D₂, suppresses parathyroid hormone secretion in uremic rats in the absence of hypercalcemia. *Am J Kidney Dis* 26:852-860, 1995
286. Slatopolsky E, Weerts C, Thielan J, Horst R, Harter H, Martin KJ: Marked suppression of secondary hyperparathyroidism by intravenous administration of 1,25-dihydroxy-cholecalciferol in uremic patients. *J Clin Invest* 74:2136-2143, 1984
287. Smith JM, Mouw DR, Vander AJ: Effect of parathyroid hormone on plasma renin activity and sodium excretion. *Am J Physiol* 236:F311-F319, 1979
288. Somjen D, Weisman Y, Kohen F, Gayer B, Limor R, Sharon O, Jaccard N, Knoll E, Stern N: 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase is expressed in human vascular smooth muscle cells and is upregulated by parathyroid hormone and estrogenic compounds. *Circulation* 111:1666-1671, 2005
289. Speer MY, Giachelli CM: Regulation of cardiovascular calcification. *Cardiovascular Pathology* 13:63-70, 2004
290. Speer MY, McKee MD, Guldberg RE, Liaw L, Yang HY, Tung E, Karsenty G, Giachelli CM: Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *J Exp Med* 196:1047-1055, 2002
291. Sprague SM, Lerma E, McCormick D, Abraham M, Battle D: Suppression of parathyroid hormone secretion in hemodialysis patients: comparison of paricalcitol with calcitriol. *Am J Kidney Dis* 38:S51-S56, 2001
292. Stary HC: Natural history of calcium deposits in atherosclerosis progression and regression. *Z Kardiol* 89 Suppl 2:28-35, 2000
293. Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebersold R, Schinke T, Karsenty G, Giachelli CM: Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res* 89:1147-1154, 2001
294. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, Heimbürger O, Cederholm T, Girndt M: IL-10, IL-6, and TNF- α : central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int* 67:1216-1233, 2005
295. Strewler GJ: The parathyroid hormone-related protein. *Endocrinol Metab Clin North Am* 29:629-645, 2000
296. Sylvia VL, Schwartz Z, Ellis EB, Helm SH, Gomez R, Dean DD, Boyan BD: Nongenomic regulation of protein kinase C isoforms by the vitamin D metabolites 1 α ,25-(OH)₂D₃ and 24R,25-(OH)₂D₃. *J Cell Physiol* 167:380-393, 1996

297. Szabo A, Ritz E, Schmidt-Gayk H, Reichel H: Abnormal expression and regulation of vitamin D receptor in experimental uremia. *Nephron* 73:619-628, 1996
298. **T**akahashi F, Finch JL, Denda M, Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E: A new analog of 1,25-(OH)₂D₃, 19-NOR-1,25-(OH)₂D₂, suppresses serum PTH and parathyroid gland growth in uremic rats without elevation of intestinal vitamin D receptor content. *Am J Kidney Dis* 30:105-112, 1997
299. Takai H, Kanematsu M, Yano K, Tsuda E, Higashio K, Ikeda K, Watanabe K, Yamada Y: Transforming growth factor-beta stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J Biol Chem* 273:27091-27096, 1998
300. Tatsumi S, Segawa H, Morita K, Haga H, Kouda T, Yamamoto H, Inoue Y, Nii T, Katai K, Taketani Y, Miyamoto KI, Takeda E: Molecular cloning and hormonal regulation of PiT-1, a sodium-dependent phosphate cotransporter from rat parathyroid glands. *Endocrinology* 139:1692-1699, 1998
301. ten DP, Fu J, Schaap P, Roelen BA: Signal transduction of bone morphogenetic proteins in osteoblast differentiation. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 3:34-38, 2003
302. Teng M, Wolf M, Lowrie E, Ofsthun N, Lazarus JM, Thadhani R: Survival of patients undergoing hemodialysis with paricalcitol or calcitriol therapy. *N Engl J Med* 349:446-456, 2003
303. Tintut Y, Patel J, Parhami F, Demer LL: Tumor necrosis factor-alpha promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation* 102:2636-2642, 2000
304. Toell A, Degenhardt S, Grabensee B, Carlberg C: Inhibitory effect of uremic solutions on protein-DNA-complex formation of the vitamin D receptor and other members of the nuclear receptor superfamily. *J Cell Biochem* 74:386-394, 1999
305. Tohyama O, Imura A, Iwano A, Freund JN, Henrissat B, Fujimori T, Nabeshima Y: Klotho is a novel beta-glucuronidase capable of hydrolyzing steroid beta-glucuronides. *J Biol Chem* 279:9777-9784, 2004
306. Tomoyasu A, Goto M, Fujise N, Mochizuki S, Yasuda H, Morinaga T, Tsuda E, Higashio K: Characterization of monomeric and homodimeric forms of osteoclastogenesis inhibitory factor. *Biochem Biophys Res Commun* 245:382-387, 1998
307. Tukaj C, Kubasik-Juraniec J, Kraszpulski M: Morphological changes of aortal smooth muscle cells exposed to calcitriol in culture. *Med Sci Monit* 6:668-674, 2000

308. Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM: Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:489-494, 2003
309. **V**aisanen S, Dunlop TW, Frank C, Carlberg C: Using chromatin immunoprecipitation to monitor 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-dependent chromatin activity on the human CYP24 promoter. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90:277-279, 2004
310. Valderrabano F, Jones EH, Mallick NP: Report on management of renal failure in Europe, XXIV, 1993. *Nephrol Dial Transplant* 10 Suppl 5:1-25, 1995
311. van DM, Koedam M, Buurman CJ, Hewison M, Chiba H, Uitterlinden AG, Pols HA, van Leeuwen JP: Evidence for auto/paracrine actions of vitamin D in bone: 1 α -hydroxylase expression and activity in human bone cells. *FASEB J* 20:2417-2419, 2006
312. Vattikuti R, Towler DA: Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:E686-E696, 2004
313. Vazquez-Diaz O, Castillo-Martinez L, Orea-Tejeda A, Orozco-Gutierrez JJ, sensio-Lafuente E, Reza-Albarran A, Silva-Tinoco R, Rebollar-Gonzalez V: Reversible changes of electrocardiographic abnormalities after parathyroidectomy in patients with primary hyperparathyroidism. *Cardiol J* 16:241-245, 2009
314. Ventura JE, Tavella N, Romero C, Petraglia A, Baez A, Munoz L: Aortic valve calcification is an independent factor of left ventricular hypertrophy in patients on maintenance haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 17:1795-1801, 2002
315. Vesely DL, Juan D: Cation-dependent vitamin D activation of human renal cortical guanylate cyclase. *Am J Physiol* 246:E115-E120, 1984
316. Vidal NO, Brandstrom H, Jonsson KB, Ohlsson C: Osteoprotegerin mRNA is expressed in primary human osteoblast-like cells: down-regulation by glucocorticoids. *J Endocrinol* 159:191-195, 1998
317. Vidal ON, Sjogren K, Eriksson BI, Ljunggren O, Ohlsson C: Osteoprotegerin mRNA is increased by interleukin-1 α in the human osteosarcoma cell line MG-63 and in human osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 248:696-700, 1998

318. **W**alsh MC, Choi YW: Biology of the TRANCE axis. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 14:251-263, 2003
319. Wan M, Shi X, Feng X, Cao X: Transcriptional mechanisms of bone morphogenetic protein-induced osteoprotegerin gene expression. *J Biol Chem* 276:10119-10125, 2001
320. Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, LaPan P, .: Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2220-2224, 1990
321. Wang W, Li C, Kwon TH, Miller RT, Knepper MA, Frokiaer J, Nielsen S: Reduced expression of renal Na⁺ transporters in rats with PTH-induced hypercalcemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 286:F534-F545, 2004
322. Watson KE, Bostrom K, Ravindranath R, Lam T, Norton B, Demer LL: TGF-beta 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J Clin Invest* 93:2106-2113, 1994
323. Watson KE, Parhami F, Shin V, Demer LL: Fibronectin and collagen I matrixes promote calcification of vascular cells in vitro, whereas collagen IV matrix is inhibitory. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1964-1971, 1998
324. Wheeler DC, Townend JN, Landray MJ: Cardiovascular risk factors in predialysis patients: baseline data from the Chronic Renal Impairment in Birmingham (CRIB) study. *Kidney Int Suppl* S201-S203, 2003
325. Wills MR, Savory J: Aluminium poisoning: dialysis encephalopathy, osteomalacia, and anaemia. *Lancet* 2:29-34, 1983
326. Wong BR, Besser D, Kim N, Arron JR, Vologodskaja M, Hanafusa H, Choi Y: TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol Cell* 4:1041-1049, 1999
327. Wu-Wong JR, Noonan W, Ma JL, Dixon D, Nakane M, Bolin AL, Koch KA, Postl S, Morgan SJ, Reinhart GA: Role of phosphorus and vitamin D analogs in the pathogenesis of vascular calcification. *J Pharmacol Exp Ther* 318:90-98, 2006
328. **Y**amaguchi K, Kinosaki M, Goto M, Kobayashi F, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K: Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. *J Biol Chem* 273:5117-5123, 1998
329. Yang H, Curinga G, Giachelli CM: Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro. *Kidney Int* 66:2293-2299, 2004

330. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T: Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3597-3602, 1998
331. Yun TJ, Chaudhary PM, Shu GL, Frazer JK, Ewings MK, Schwartz SM, Pascual V, Hood LE, Clark EA: OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. *J Immunol* 161:6113-6121, 1998
- Z**
332. Zanello LP, Norman AW: 1 alpha,25(OH)₂ vitamin D₃-mediated stimulation of outward anionic currents in osteoblast-like ROS 17/2.8 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 225:551-556, 1996
333. Zebboudj AF, Imura M, Bostrom K: Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 277:4388-4394, 2002
334. Zehnder D, Bland R, Chana RS, Wheeler DC, Howie AJ, Williams MC, Stewart PM, Hewison M: Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D-3 by human endothelial cells is regulated by inflammatory cytokines: A novel autocrine determinant of vascular cell adhesion. *Journal of the American Society of Nephrology* 13: 2002
335. Zhang JD, Cousens LS, Barr PJ, Sprang SR: Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor, a structural homolog of interleukin 1 beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3446-3450, 1991
336. Zierold C, Darwish HM, Deluca HF: Identification of a vitamin D-response element in the rat calcidiol (25-hydroxyvitamin D₃) 24-hydroxylase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:900-902, 1994
337. Zoccali C, Benedetto FA, Mallamaci F, Tripepi G, Candela V, Labate C, Tassone F: Left ventricular hypertrophy and nocturnal hypoxemia in hemodialysis patients. *J Hypertens* 19:287-293, 2001

