



Universitat de Lleida

Efecte de la urèmia en el metabolisme de la vitamina D: implicacions en la calcificació vascular

Noèlia Torremadé Pascual

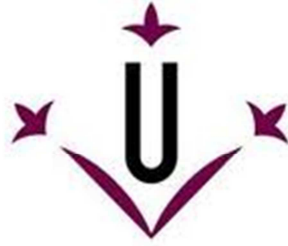
Dipòsit Legal: L.312-2014

<http://hdl.handle.net/10803/131162>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Lleida

Tesis Doctoral

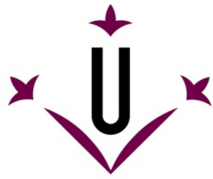
**Efecte de la urèmia en el metabolisme de la
vitaminaD: implicacions en la calcificació
vascular.**

Noèlia Torremadé Pascual

Coodirectors: Elvira Fernàndez Giràldez i

José Manuel Valdivielso Revilla

Lleida, Desembre de 2013.



Universitat de Lleida



José Manuel Valdivielso Revilla, PhD, Investigador principal i director del grup de recerca de Nefrologia Experimental de l'Institut de Recerca Biomèdica de Lleida, i **Elvira Fernández Giráldez**, MD, PhD, Directora del Servei de Nefrologia Experimental, HUAV i professora del departament de Medicina de la Universitat de Lleida.

Com a supervisors de la present tesis titulada: **“Efecte de la urèmia en el metabolisme de la vitamina D: implicacions en la calcificació vascular”**, presentada per **Noèlia Torremadé Pascual**, llicenciada en Biologia i Bioquímica per la Universitat de Barcelona.

Per la present declaren que aquest treball compleix les condicions adequades per a poder ser defensat davant del tribunal de tesis i, si correspon, obtenir el **títol de Doctor** per la Universitat de Lleida.

Signat,

Dr. Jose Manuel Valdivielso

Dr. Elvira Fernández Giráldez

Lleida, 2013

Dedicat a la meva família: als pares, al Mauri i al Marc.

Qui lluita pot perdre, qui no lluita ja ha perdut.

Bertold Brecht.

AGRAÏMENTS

Agraïments

Escriure aquests agraïments significa el final d'una etapa de la meua vida i l'inici d'una altra. Durant aquests anys, he après moltes coses i he crescut tant a nivell personal com professional. Hi han hagut moments difícils, la investigació no és fàcil, requereix molt esforç i molta paciència i de vegades no hi ha la recompensa que un voldria. També he tingut moments bons i oportunitats de viure experiències que no m'hauria imaginat mai abans. He tingut al meu costat molta gent que m'ha ajudat durant tot aquest procés i gràcies a tots ells avui puc escriure aquesta tesi.

Primer de tot voldria agrair al Jose i a l'Elvira per donar-me l'oportunitat de realitzar el doctorat a la Universitat de Lleida. També al Jose per haver-me guiat durant aquets anys i ensenyat el món de la recerca.

Voldria agrair a diverses institucions que han fet possible econòmicament la meua tesi; primer a l'IRBLleida (Fundació del Dr.Pifarré), després a la Universitat de Lleida, també a la institució europea ERA-EDTA per fer possible la meua estada breu a Nijmegen i l'assistència al congrés europeu a Istanbul.

Agrair el suport i l'ajuda a tot el grup de nefro: A la Montse, a la Milica, a la Petya, a l'Eva, la Vicki, l'Anna Martinez, la Sara, la Cardús, la Gemma H. Gràcies per ajudar-me en moltes tècniques de laboratori i de l'estabulari i transmetre'm els vostres coneixements, també per ser tan bones companyes i fer-me sentir com a casa.

També vull agrair l'ajuda i el suport a l'Adriana, gràcies per ajudar-me amb les presentacions, per promoure els seminaris en anglès, i per l'ajuda en la meua estada a l'estranger, etc.

A la resta de companys i becaris de l'IRBLleida: Laura, Núria E, Annabel, Cristina M, M^a Alba, Andree, Maria C., Gemma.A, Mireia, Berta, Núria Bahí, Miriam, Macià, Marta, Junmei, Charumathi, Deepshikha, etc. Amb els que em passat alguns bons moments al labo i amb alguns sopars.

A la gent de l'estabulari: Roser, Jessica, Marc, Emilià, Núria per la seva ajuda quant havia de punxar les rates, per mantenir-me la colònia de ratolins. També a la Carme Piñol i al Jose Antonio Moreno per ensenyar-me les normes per treballar amb els animals d'experimentació.

Agraïments

Als professors de Ciències Mèdiques Bàsiques, al Xavi, al Mario per la seva ajuda amb la sobreexpressió de la 1 α hidroxilasa, a l'Eloi per ajudar-me amb el vector VDR, al Dani, la Marta, el Carles i la Judit.

Agrair també l'oportunitat de fer d'assistent de docència a la Universitat de Lleida, a la Rosa S., a la Judit, i al Joaquim R. Per ensenyar-me aquest món i poder gaudir de l'experiència.

Als metges de Nefrologia Experimental: la Mercè, la Lourdes, el Felipe, el Blai, l'Àngels, l'Anna, el Jordi, la Marisa... Per donar la seva visió clínica en els seminaris. En especial, a la Marta, per la seva gran amistat, la seva ajuda en els moments difícils i transmetre'm alguns dels seus coneixements clínics.

A la Mercè Ibars, per determinar-me les mostres i contestar els meus dubtes. A la M^aAlba Sorolla i la Isu del servei de genòmica.

Al professor René Bindels i Joost Hoenderop, per donar-me l'oportunitat de realitzar l'estada breu al seu laboratori, al Nijmegen Centre for Molecular Life Science (NCMLS). A AnneMiette, per la seva ajuda i fer que m'adaptés ràpidament al laboratori. Als companys: Paco, Anke, Liz, Ellen, Ganesh, Nes, Pedro, Carolina, etc.

Agrair en especial, a la meva família. Als meus pares per recolzar-me, ajudar-me amb els meus estudis i donar-me suport a fer el doctorat. Al Mauri, per entendre'm, ajudar-me en els moments difícils i formar una família junts.

Gràcies també a aquells que no he nombrat i que també m'han ajudat a fer-ho possible.

Moltes gràcies a tots.

RESUMS

Resum

La calcificació vascular és una complicació de la malaltia renal crònica i una de les principals causes de l'augment de morbiditat i mortalitat en els pacients. Aquests pacients presenten una disminució en els nivells de vitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) i desenvolupen hiperparatiroidisme secundari. Per aquest motiu, pacients amb MRC són tractats amb calcitriol o altres anàlegs. La 25-hidroxivitaminaD també s'utilitza, però sense cap coneixement de la seva eficàcia i toxicitat. Les recomanacions actuals indiquen que s'ha de suplementar amb 25D per assolir un lliandar determinat que pugui afectar les accions clàssiques i no clàssiques de la vitamina D en l'organisme. No obstant això, l'incidència directa en l'homeòstasi del calci (sense convertir-lo en calcitriol) no s'entén.

En el present treball, s'ha determinat l'efecte de la urèmia en la regulació de gens del metabolisme de la vitamina D i el paper de la síntesi local de calcitriol en la urèmia sobre la calcificació vascular utilitzant els ratolins KO per la 1α hidroxilasa. També, hem estudiat l'eficàcia i la seguretat del tractament amb 25D en el metabolisme mineral en un model de reducció del 75% de la massa renal en ratolins que no tenen la 1α hidroxilasa i l'efecte en ratolins WT de la dosis que es efectiva per reduir els nivells de PTH en ratolins KO.

Resultats inicials en rates mostren que la urèmia desregula l'expressió de proteïnes implicades en el metabolisme de la vitamina D en cèl·lules de múscul llis vascular (VSMC), augmentant l'expressió de la 1α hidroxilasa. Aquesta regulació és específica de teixit i és diferent de la que hi ha en el ronyó.

Ratolins wild type amb un model de MRC tractats amb altes dosis diàries de calcitriol (400ng/Kg) durant dues setmanes mostren una pèrdua de pes significativa, mentre que els 1α KO no perden pes. Nivells sèrics de calci, fòsfor, BUN i $1,25\text{D}$ augmenten i són similar en els dos grups tractats. D'altra banda, els nivells de PTH disminueixen en ambdós grups per sota dels valors normals. La calcificació vascular augmenta de forma significativa en els ratolins WT en comparació amb ratolins 1α KO. Resultats similars s'observen amb tinció de vermell d'alizarina i l'immunohistoquímica de Runx2, que augmenta només en ratolins WT.

In vitro, les CMLV WT tractades amb sèrum urèmic també mostren un augment significatiu de la calcificació i de l'expressió de runx2, que no s'observa en les cèl·lules 1α KO. Quan les CMLV de rata s'obrexpressen la 1α hidroxilasa també calcifiquen més en comparació amb les cèl·lules control.

Resum

Aquests resultats indiquen que la 1α hidroxilasa actuaria com a mediador de la calcificació vascular en la urèmia incrementant la síntesis local de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Fet que és d'especial interès en els pacients amb malaltia renal que són tractats amb 25OHD_3 .

Per a estudiar l'efecte de la 25D, es va realitzar un estudi dosi-resposta en ratolins $1\alpha\text{KO}$ nefrectomitzats amb 25, 50 i 100 ng/g de $25(\text{OH})\text{D}_3$ per comparar-ho amb una dosi única de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (50pg/g).

L'administració de $25(\text{OH})\text{D}_3$ pot normalitzar el Ca, P i PTH en sèrum amb una potència semblant a la de la $1,25\text{D}$ en un model de ratolí. Confirmant una unió directa i activació del VDR per la 25D. La 25D també pot activar el VDR per imitar la $1,25\text{D}$ en la up-regulació de gens i proteïnes que medien el transport transcel·lular de calci en el ronyó (TRPV5, Calbindin-D28k, PMCA1b) i en el duodè (TRPV6, Calbindin D9k i PMCA1b) en els $1\alpha\text{KO}$ nefrectomitzats.

Les dosis de 25D necessàries per imitar la $1,25\text{D}$ en la correcció de les anomalies en el transport de calci transcel·lular a nivell renal i duodenal causen un augment en els nivells de 25D en sèrum per sobre dels nivells recomanats en pacients amb MRC. A més aquestes dosis causen calcificació vascular en ratolins WT. També, hem observat que la 25D és capaç d'activar la 24hidroxilasa i el VDR en CMLV, mostrant la capacitat de la 25D d'activar directament el VDR a l'artèria.

En conclusió, tots aquests resultats suggereixen que la producció local de calcitriol per la 1α hidroxilasa en l'artèria mediària la calcificació vascular observada en la urèmia. A més, els tractaments amb 25D en pacients amb MRC han de fer-se de forma molt controlada.

Resumen

La calcificación vascular es una complicación de la enfermedad renal crónica y una de las principales causas del aumento en la morbilidad y mortalidad en los pacientes. Estos pacientes presentan una disminución en los niveles de vitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) y desarrollan hiperparatiroidismo secundario. Por esta razón, los pacientes con ERC son tratados con calcitriol u otros análogos. También se utiliza la 25-hidroxivitamina D, pero sin ningún conocimiento de su eficacia y toxicidad. Las recomendaciones actuales sugieren que se complemente con 25D para alcanzar un cierto umbral que pueda afectar las acciones clásicas y no clásicas de la vitamina D. Sin embargo, el impacto directo en la homeostasis del calcio (sin convertirlo en calcitriol) no se conoce.

En el presente estudio, se determinó el efecto de la uremia en la regulación de genes del metabolismo de la vitamina D y el papel de la síntesis local del calcitriol en la uremia y su efecto sobre la calcificación vascular utilizando ratones KO para la 1α hidroxilasa. También, se estudió la eficacia y la seguridad del tratamiento con 25D en el metabolismo mineral en ratones que carecen de la 1α hidroxilasa con una reducción del 75% de la masa renal y el efecto en ratones WT de la dosis efectiva para reducir los niveles de PTH en ratones KO.

Los primeros resultados en ratas demuestran que en la uremia se desregula la expresión de las proteínas implicadas en el metabolismo de la vitamina D en las células musculares lisas vasculares (CMLV), aumentando la expresión de la 1α hidroxilasa. Esta regulación es específica del tejido y es diferente de la del riñón.

Los ratones wild type con un modelo de ERC tratados con dosis elevadas de calcitriol (400ng/Kg) muestran una pérdida significativa de peso, mientras que los 1α KO no pierden peso. Los niveles séricos de calcio, fósforo, BUN y $1,25\text{D}$ suben y son similares en los dos grupos. Por otro lado, los niveles de PTH caen por debajo de los valores normales en ambos grupos. La calcificación vascular aumenta significativamente en los ratones WT en comparación con los 1α KO. Resultados similares fueron observados con la tinción rojo de alizarina y la inmunohistoquímica de Runx2, aumentando sólo en los ratones WT.

In vitro, las CMLV WT tratadas con suero urémico también muestran un aumento significativo de la calcificación y de la expresión de runx2, que no se observa en las células 1α KO. Cuando las CMLV de rata sobrepresan la 1α hidroxilasa calcifican más en comparación con las células control.

Resumen

Estos resultados indican que la 1α hidroxilasa actuaría como mediador de la calcificación vascular en la uremia incrementando la síntesis local de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Hecho que es de especial interés en los pacientes con enfermedad renal tratados con 25OHD_3 .

Para estudiar el efecto de la 25D, se realizó un estudio de dosis-respuesta con ratones $1\alpha\text{KO}$ nefrectomizados y tratados con 25, 50 y 100 ng/g de $25(\text{OH})\text{D}_3$ y se compararon con una sola dosis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (50pg/g).

La administración de $25(\text{OH})\text{D}_3$ puede normalizar el Ca, P y PTH en suero con una potencia similar a la del $1,25\text{D}$ en un modelo de ratón $1\alpha\text{KO}$ con ERC. Confirmando un efecto directo y activador de la 25D sobre el VDR. La 25D también puede activar el VDR para imitar la $1,25\text{D}$ en la regulación de genes y proteínas que median el transporte transcelular de calcio en el riñón (Calbindin-D28k, TRPV5, PMCA1b) y en el duodeno (Calbindin D9k y TRPV6, PMCA1b) en ratones $1\alpha\text{KO}$ nefrectomizados.

Las dosis de 25D necesarias para imitar la $1,25\text{D}$ en la corrección de las alteraciones en el transporte de calcio transcelular a nivel renal i duodenal producen un aumento en los niveles de 25D en el suero por encima de los niveles recomendados en pacientes con ERC. Además, esta dosis causa calcificación vascular en ratones WT. También hemos observado que la 25D es capaz de activar la 24hidroxilasa i el VDR en las CMLV, mostrando la capacidad de la 25D de activar de forma directa el VDR en la arteria.

En conclusión, estos resultados sugieren que la producción local de calcitriol por la 1α hidroxilasa en la arteria mediaría la calcificación vascular observada en la uremia. Además los tratamientos con 25D en pacientes con ERC deben hacerse de forma muy controlada.

Abstract

Vascular calcification is a complication of chronic kidney disease and one of the main predictors of increased morbidity and mortality in patients. These patients present a decrease in vitamin D levels ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) leading to secondary hyperparathyroidism. For these reasons CKD patients are usually treated with calcitriol or other analogues. 25-hydroxyvitaminD is also used without any knowledge of its efficacy and toxicity. Current recommendations are to supplement with 25D to achieve a certain threshold that could affect both, classical and non-classical actions of vitamin D in the body. However, its direct effect on calcium homeostasis (without conversion in calcitriol) is not fully understood.

In the present work, we determined the effect of uremia in the regulation of vitamin D metabolism genes, and the role of the local synthesis of calcitriol on uremia-induced vascular calcification using 1α hydroxylaseKO mice. Also, we studied the efficacy and safety of 25D treatment on mineral metabolism in a model of 75% nephron mass reduction in mice lacking 1α hydroxylase and the effect in WT mice of the dose found to be effective reducing PTH levels in KO mice.

Initial results in rats show that uremia deregulates proteins involved in vitamin D metabolism in vascular smooth muscle cells (VSMC), increasing the expression of 1α hydroxylase. This regulation is tissue specific and is different from the one in the kidney.

Wild type mice with a CKD model treated with high daily doses of calcitriol (400ng/Kg) for two weeks show a significant weight loss, while 1α KO do not lose weight. Serum calcium levels, phosphorus, BUN, and 1,25D increase and are similar in both calcitriol-treated groups. Furthermore, PTH levels decrease in both groups below normal values. Vascular calcium content significantly increased in the WT mice compared to 1α KO mice. Similar results are observed with alizarin red staining and immunohistochemical detection of Runx2, which increase only in WT mice.

In vitro, WT VSMC treated with uremic serum also show a significant increase in calcification and runx2 expression that is not observed in 1α KO cells. When VSMC from rat overexpressed 1α hydroxylase also calcify more compared with the control cells.

These results show that 1α hydroxylase acts as a mediator of vascular calcification in uremia, increasing local synthesis of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. This fact is important in patients with renal disease treated with 25OHD_3 .

Abstract

To study the effect of 25D, a dose response study was carried out in 1α KO nephrectomized using 25, 50 and 100 ng/g of $25(\text{OH})\text{D}_3$ to compare with a single dose of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (50pg/g).

$25(\text{OH})\text{D}_3$ administration can normalize serum Ca, P, and PTH with a potency similar to that of $1,25\text{D}$ in the 1α KO mouse model of CKD, confirming a direct binding and activation of the VDR by 25D. Also, 25D can activate the VDR to mimic $1,25\text{D}$ in the up-regulation of genes and proteins mediating transcellular calcium transport in the kidney (TRPV5, Calbindin-D28k, PMCA1b) and in the duodenum (TRPV6, Calbindin-D9k, and PMCA1b) in the nephrectomized 1α KO.

The doses of 25D required to mimic $1,25\text{D}$ in correcting the abnormalities in renal and duodenal transcellular calcium transport cause elevation in serum 25D levels far beyond the recommended levels in CKD patients. Furthermore this dose causes vascular calcification in WT mice. Also, we observed that 25D is able to activate 24hydroxylase and VDR in VSMC, showing the capacity of 25D to direct activate VDR in the artery.

In conclusion, all these results suggest that local production of calcitriol by 1α hydroxylase in the artery may mediate vascular calcification observed in uremia. Furthermore, 25D treatments in patients with CKD should be done in a very controlled manner.

ÍNDEX

ÍNDIX

ABREVIATURES.....	2
INTRODUCCIÓ	6
1.- LA MALALTIA RENAL CRÒNICA	6
1.1.-ETAPES DE LA MALALTIA RENAL CRÒNICA	6
1.2.-FACTORS DE RISC DE LA MALALTIA RENAL CRÒNICA.....	7
1.3.- INCIDÈNCIA I PREVALÈNCIA DE LA MALALTIA RENAL CRÒNICA.....	8
1.4.-CONSEQÜÈNCIES DE LA MALALTIA RENAL	9
1.4.1.- Toxicitat urèmica.	9
1.4.2 .-Hiperparatiroidisme secundari	9
1.4.2.1- L'hormona Paratiroides (PTH)	9
1.4.2.2- La vitamina D	10
1.4.2.3- El factor de creixement fibroblàstic 23 (FGF23)	10
1.4.2.4- L' hiperparatiroidisme secundari en la malaltia renal crònica	11
1.4.3.- L'hiperfosfatèmia.....	13
1.4.4.- La Malaltia Cardiovascular	14
2.-LA CALCIFICACIÓ VASCULAR EN LA URÈMIA	15
2.1- Estructura de la paret arterial.....	16
2.2- Estadis de la Calcificació vascular	16
2.3.- Mecanismes de la Calcificació vascular	17
2.3.1.- El Calci i el Fòsfor	17
2.3.2.- Mort cel·lular i apoptosis.....	18
2.3.3.- Inhibidors de la Calcificació vascular	19
2.3.4.- Activadors de la Calcificació vascular	22
3.- LA VITAMINA D	24
3.1.- Història de la vitamina D.....	24
3.2.-La biosíntesis de la vitamina D.....	25
3.3.- La 1 α hidroxilasa renal i extrarenal.....	27
3.4- El receptor de vitamina D (VDR)	28
3.5.- Accions de la vitamina D : Acció genòmica i no genòmica.	29
3.5.1.- Acció genòmica de la vitamina D a través del VDR.....	29
3.5.2.- Acció no genòmica de la vitamina D.....	30
3.6.- Accions biològiques de la vitamina D	30
3.6.1.- Respostes clàssiques de la vitamina D.....	31

Índex

3.6.2.- Respostes no clàssiques de la vitamina D.....	32
3.7.1.- El Paricalcitol.....	33
3.8.- El paper de la vitamina D en la calcificació vascular.....	34
3.9.- El transport de calci epitelial i la vitamina D.....	35
3.9.1.-El transport de calci epitelial	35
3.9.1.1- Transport de calci a l'intestí.....	36
3.9.1.2.- Transport de calci al ronyó	37
3.9.2.- Mecanismes reguladors del TRPV5	39
3.9.2.1-L'hormona paratiroide (PTH).....	39
3.9.2.2.- Calci de la dieta.....	40
3.9.2.3- La vitamina D	41
3.9.2.3.1- TRPV5 i anàlegs de la vitamina D.....	42
3.9.3.- Klotho, TRPV5 i la calcificació urèmica	42
OBJECTIUS.....	48
MATERIALS I MÈTODES.....	52
1.- EXPERIMENTACIÓ <i>IN VITRO</i>	52
1.1.-Cultiu de CMLV	52
1.1.1.-Inmunohistoquímica de fluorescència per l' α -actina del múscul llis	52
1.1.2.-Manteniment del cultiu primari CMLV.....	53
1.1.3.-Congelació, emmagatzematge i descongelació de CMLV	53
1.2.-Experiments de calcificació en cèl·lules de múscul llis vascular.....	53
1.2.1.- Quantificació química de calci en CMLV.....	54
1.2.2.-Tinció de vermell d'alizarina en CMLV.....	54
1.3.- Cultiu de cèl·lules Tubulars renals (CTR).....	55
1.4.-Extracció d'RNA en cèl·lules	55
1.5.-Síntesis del cDNA	56
1.6.-PCR a temps real.....	56
1.7.- Anàlisi de proteïna.	57
1.7.1.- Solucions	57
1.7.2.- Extracció de proteïna.....	58
1.7.3.- Western blot.....	58
2.- EXPERIMENTACIÓ A NIVELL MOLECULAR	60
2.1.-Sobreexpressió de CYP27B1 en CMLV de rata.....	60
3.-EXPERIMENTACIÓ AMB ANIMALS	62
3.1.- Models animals per l'estudi del metabolisme de la vitamina D.....	62

Índex

3.1.1.-Ratolins knockout per VDR	62
3.1.2.-Knockout per 1 α hidroxilasa	63
3.2.- Manteniment i cria de ratolins 1 α hidroxilasa Knockout	64
3.3.- Genotipatge dels ratolins 1 α hidroxilasa KO	65
3.4.- Model de malaltia renal en ratolins: Reducció del 75% de la massa renal.	65
3.5.- Model de malaltia renal en rates: Reducció del 75% de la massa renal.	66
3.6.- Obtenció del sèrum normal i sèrum urèmic de Rata.....	67
3.7.- Obtenció d'orina	67
3.8.-Anàlisi bioquímic en sèrum i orina.....	67
3.9.- Quantificació de la calcificació (concentració de calci) en teixit	67
3.10.- Mesura de la Calcificació a partir de mostres de teixit en seccions de parafina.....	68
3.11.- Immunohistoquímica en mostres d'artèria (Runx2).....	68
3.12.-Anàlisi de l'expressió gènica per PCR en temps real en teixit.....	69
3.13.- Immunoblots.....	69
3.14.- Immunohistoquímica: Localització dels canals TRPV5 i la Calbindina-D28k.	70
4.- ANÀLISIS ESTADÍSTIC DELS RESULTATS.....	70
5.- PRODUCTES QUÍMICS I SOLUCIONS STOCK UTILITZATS EN EL PROCÉS EXPERIMENTAL	71
RESULTATS	74
1.- EFECTE DEL TRACTAMENT AMB VITAMINA D ACTIVA EN LA REGULACIÓ DE GENS IMPLICATS EN EL METABOLISME DE LA VITAMINA D EN LA URÈMIA.....	74
1.1.- ESTUDI <i>IN VIVO</i>	74
1.1.1- Efecte de la urèmia, del Calcitriol o del Paricalcitol en la funció renal.....	74
1.1.2.- Efecte de la urèmia i dels tractaments sobre la calcificació vascular i renal.....	76
1.1.3.- Efecte de la urèmia i dels tractaments en l'expressió de gens implicats en el metabolisme de la vitamina D en artèria i ronyó	77
1.2.-ESTUDI <i>IN VITRO</i>	79
1.2.1.- Efecte de la urèmia i dels tractaments en l'expressió dels gens implicats en el metabolisme de la vitamina D en CMLV i CTR.	79
1.2.2.- Efecte de la urèmia i del calcitriol en l'expressió de proteïnes del metabolisme de la vitamina D en CMLV i CTR.....	80
2.- EFECTE DE LA SÍNTESIS LOCAL DE CALCITRIOL PER LA 1 α HIDROXILASA I LA SEVA IMPLICACIÓ EN LA CALCIFICACIÓ VASCULAR EN LA URÈMIA.....	81
2.1.- ESTUDIS <i>IN VIVO</i>	82
2.1.1- Efecte tòxic del tractament amb calcitriol, avaluació de la pèrdua de pes en els animals. ..	82
2.1.2.- Determinació dels nivells de Ca ²⁺ , P, BUN, PTH i 1,25D en els grups d'animals.....	83

Índex

2.1.3.- Efecte sobre la calcificació vascular en ratolins wild type i 1α hidroxilasa KO nefrectomitzats i tractats amb calcitriol.	84
2.2.- ESTUDIS <i>IN VITRO</i>	85
2.2.1- Efecte de la urèmia i del calcitriol en la calcificació de CMLV procedents de ratolins wild type i 1α hidroxilasa KO.	85
2.2.2- Estudi de l'expressió de proteïnes i gens implicats en el metabolisme de la vitamina D i de la calcificació en CMLV procedents de ratolins wild type i 1α KO per efecte de la urèmia	86
2.2.3- Estudi de la sobreexpressió de la 1α hidroxilasa en les CMLV i del seu efecte sobre la calcificació vascular.....	87
3.- EFECTE DIRECTE DE LA 25 HIDROXIVITAMINA D EN LA REGULACIÓ DE GENS I DEL METABOLISME MINERAL EN LA URÈMIA. EFECTE SOBRE LA CALCIFICACIÓ VASCULAR.	88
3.1.-ESTUDI EN RATOLINS 1α HIDROXILASA KO	88
3.1.1-Nivells de Ca^{2+} , fòsfor, PTH i $25(OH)D_3$ en sèrum de ratolins 1α hidroxilasa KO	88
3.1.2.-Expressió dels transportadors de Ca^{2+} en el ronyó.....	90
3.1.3.-Expressió de transportadors de Ca^{2+} en el duodè	92
3.1.4.- Calcificació vascular en els ratolins 1α hidroxilasa KO	94
3.2.-ESTUDI EN RATOLINS WILD TYPE.....	95
3.2.1.- Nivells de Ca^{2+} , fòsfor, PTH i $25(OH)_2D_3$ en sèrum de ratolins wild type	95
3.3.- IN VITRO.....	97
3.3.1.- Efecte de la $1,25(OH)_2D_3$ i de la $25OHD_3$ en les CMLV wild type i 1α hidroxilasa KO	97
DISCUSSIÓ	102
1.- REGULACIÓ DE LA FUNCIÓ RENAL I DEL GENS IMPLICATS EN EL METABOLISME DE LA VITAMINA D EN LA URÈMIA.....	102
2.- EFECTE DE LA SINTESIS LOCAL DE CALCITRIOL PER LA 1α HIDROXILASA I LA SEVA IMPLICACIÓ EN LA CALCIFICACIÓ VASCULAR EN LA URÈMIA.....	106
3.- EFECTE DIRECTE DE LA 25 HIDROXIVITAMINA D EN LA REGULACIÓ DE GENS I DEL METABOLISME MINERAL EN LA URÈMIA. EFECTE SOBRE LA CALCIFICACIÓ VASCULAR.	110
CONCLUSIONS.....	116
BIBLIOGRAFIA.....	120

ABREVIATURES

ABREVIATURES

MRC: Malaltia Renal Crònica.

FG: Filtrat Glomerular.

PTH: Hormona paratiroide o parathormona

BUN: Urea nitrogenada en sang.

SM α : α -actina de múscul llis

VDR: Receptor de Vitamina D.

FGF23: Factor de creixement fibroblàstic 23.

HPT2: Hiperparatiroidismesecundari.

CMLV: Cèl·lules de múscul llis vascular.

HVE: Hipertròfia ventricular Esquerra.

CV: Calcificació vascular

CMLV: Cèl·lules de múscul llis vascular.

MPG: Matrix Gla protein.

OPN: Osteopontina.

OPG: Osteoprotegerina

BMP: Proteïna morfogènica de l'os.

VDR: Receptor de vitamina D

DBP: Proteïna d'unió a la vitamina D

CaSR: Receptor sensible al calci.

1 α : 1 α hidroxilasa

WT: wild type

KO: knockout

Nx: nefrectomitzat

TRP: Transient receptor potential protein

TRPV: Transient Receptor Potential Vanilloid

G: Glomèrul

Abreviatures

PT: túbul proximal

DTL: extremitat prima descendent

ATL: extremitat prima ascendent

TAL: extremitat gruixuda ascendent

DCT: túbul contornejat distal

CNT: túbul connector

CD: conducte col·lector

CTR: cèl·lules tubulars renals

1,25D: 1,25-Dihidroxivitamina D

25D: 25-Hidroxivitamina D

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1.- LA MALALTIA RENAL CRÒNICA:

La malaltia renal crònica (MRC) és una síndrome clínica complexa que resulta del dany progressiu i permanent de l'estructura anatòmica renal i que comporta una disminució de la funció renal. La disminució de la funció renal ve determinada pel filtrat glomerular (volum de fluid filtrat pels capil·lars glomerulars per unitat de temps, ml/min) que es pot estimar mitjançant l'aclariment de creatinina. La creatinina és una substància endògena produïda en les cèl·lules musculars per una conversió no enzimàtica de creatinina i fosfocreatinina. Atès que la creatinina té un pes molecular baix, no s'uneix a proteïnes del plasma i es filtra lliurement a nivell de glomèruls, és un excel·lent marcador per a estimar la taxa de FG. El valor normal de l'aclariment de creatinina està comprès entre 100-130 ml/min/1,73m² en humans i entre 1-3 ml/min/1,73m² en el cas de les rates.

Es considera que hi ha MRC quan la disminució de la funció renal, expressada en FG és < 60 ml/min/1,73 m² o quan hi ha presència de dany renal de forma persistent durant almenys 3 mesos.^{1,2} El dany renal es diagnostica habitualment mitjançant marcadors, el principal marcador és una excreció urinària d'albumina o proteïnes elevada.

1.1.-ETAPES DE LA MALALTIA RENAL CRÒNICA:

La progressió de la MRC transcorre en cinc etapes segons el grau de la funció renal.

ESTADI	DESCRIPCIÓ	FG (ml/min/1,73m ²)
	Risc augmentat de MRC	≥ 60 amb factors de risc
1	Dany renal amb FG normal	≥ 90
2	Dany renal amb FG lleugerament disminuït	60-89
3	FG lleugerament disminuït	30-59
4	FG greument disminuït	15-29
5	Fracàs renal	<15 o diàlisi

Taula 1.- Classificació dels estadis de la malaltia renal crònica (MRC) segons les guies *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative K/DOQI 2002* de la National Kidney Foundation.²

ESTADIS:

Estadi 1: Es caracteritza per un FG normal o augmentat amb dany renal. Situacions representatives són els casos amb microalbuminúria o proteinúria persistent o malaltia poliquística amb FG normal o augmentat.

Estadi 2: Situacions de dany renal acompanyades d'una reducció lleugera de FG, freqüent en persones d'edat avançada. Els casos de MRC en els estadis 1 i 2 poden beneficiar-se del diagnòstic precoç i de l'inici de mesures preventives de progressió de la MRC i de la patologia cardiovascular.

Estadi 3: Hi ha una disminució moderada del FG (FG entre 30-59 ml/min/1,73m²). El dany renal pot estar present o absent i ja no constitueix un paràmetre necessari pel diagnòstic d'aquest estadi. S'observa un risc elevat de complicacions cardiovasculars i també poden aparèixer les complicacions clàssiques de la insuficiència renal com l'anèmia o les alteracions del metabolisme calci-fòsfor. Aquests pacients han de ser avaluats des del punt de vista cardiovascular i renal i tractats de forma adequada per la prevenció a ambdós nivells.

Estadi 4: Es produeix una greu disminució del FG (FG entre 15 i 29 ml/min/1,73m²). El risc de progressió de la insuficiència renal a l'estadi 5 com també el risc de que hi apareguin complicacions cardiovasculars és molt elevat. En aquest estadi s'ha de valorar si el pacient necessita tractament renal substitutiu.

Estadi 5: Es l'estadi final de la malaltia renal, es caracteritza per tenir un FG <15 ml/min/1,73m², s'anomena també fracàs renal (*kidneyfailure*) i es quan comencen a aparèixer els signes del denominat Síndrome Urèmic. Aquesta síndrome és el conjunt de símptomes i alteracions bioquímiques que apareixen durant l'estadi final de la MRC. En aquest estadi el pacient necessita de diàlisi o bé d'un transplantament renal per poder viure.

1.2-FACTORS DE RISC DE LA MALALTIA RENAL CRÒNICA:

Els factors de risc que augmenten la malaltia renal crònica es poden observar a la taula 2. S'inclouen individus amb diabetis, hipertensió, malalties autoimmunes, etc. A més a més tenim altres factors de risc considerats sociodemogràfics, com l'edat i l'ètnia que també es consideren factors potencials de risc de inici o susceptibilitat a la MRC.

Factors clínics	Factors de risc sociodemogràfics
Diabetis	Edat avançada ≥ 60 anys
Hipertensió	Ètnia
Malalties cardiovasculars	Exposició a certes condicions ambientals i químiques
Malalties autoimmunes	Obesitat, tabac
Infeccions sistèmiques	
Exposició a medicines o drogues	
Procediments associats a la disminució de la funció del ronyó	

Taula 2.- Classificació dels estadis de la malaltia renal crònica (MRC) segons les guies *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative K/DOQI 2002* de la National Kidney Foundation²

1.3.- INCIDÈNCIA I PREVALÈNCIA DE LA MALALTIA RENAL CRÒNICA:

En la població general adulta aproximadament entre un 8- 10% té algun tipus de dany al ronyó per evidències en la proteïnúria o microalbuminúria, si s'inclou l'hematúria augmenta fins a un 18%.

Els pacients amb insuficiència renal crònica que estan sota tractament amb mètodes substitutius de la funció renal (hemodiàlisis, diàlisis peritoneal i trasplantament renal) són aproximadament dos milions al món. En països desenvolupats la taxa de prevalença és d'aproximadament entre 500 – 1400 pacients per milió d'habitants, però varia segons el país. A EEUU la prevalença és d'uns 1800 casos per milió, mentre que al Japó i a Taiwan és de 2400 casos per milió d'habitants. La prevalença de la MRC a Espanya és inferior que als anteriors països i és d'aproximadament 1200 casos per cada milió d'habitants.

La incidència és d'aproximadament 300 – 340 pacients per milió d'habitants i s'incrementa al voltant d'un 10% anualment. En països com: EEUU, Taiwan i algunes regions de Mèxic aquest valor s'incrementa fins als 400 casos per milió d'habitants.¹ A Espanya aquests valors són inferiors, es troben entre 120-130 casos per cada milió d'habitants i es supera els 450 casos en el grup d'edat superior als 75 anys. En canvi, en els països en vies de desenvolupament ambdues taxes són molt menors i està en correspondència amb el seu nivell econòmic. Font: *web de la SEN. Informe de diàlisi i transplantament, 2009.*

1.4.-CONSEQÜÈNCIES DE LA MALALTIA RENAL:

1.4.1.- Toxicitat urèmica.

La urèmia significa literalment "orina dintre de la sang". Piorry l'any 1840 ho va utilitzar per a definir les conseqüències de l'acumulació dels compostos que normalment són eliminats pel ronyó. Actualment es denomina així al conjunt de símptomes i signes deguts a la retenció d'excés de productes del desdoblament metabòlic de les proteïnes en la sang per la incapacitat de les nefrones per a secretar adequadament la urea i altres productes del metabolisme proteic. Hi ha una varietat de compostos que poden ser potencials toxines urèmiques: urea, creatinina, àcid uric, poliols, fenols, etc.

Trobem una simptomatologia complexa i variable implicada en aquesta síndrome: anèmia, alteració del metabolisme del calci i fòsfor, acidosis metabòlica, sobrecàrrega de fluids, acumulació de productes del metabolisme proteic, malnutrició, un desequilibri hormonal, el més freqüent en la urèmia és l'increment de l'hormona paratiroide (PTH).

1.4.2 Hiperparatiroidisme secundari

1.4.2.1- L'hormona Paratiroides (PTH):

La parathormona (PTH) és una hormona que es sintetitza en les cèl·lules de la glàndula paratiroides com preProPTH i es secreta com a polipèptid de 84 aminoàcids. Una vegada en circulació pateix ruptures proteolítiques per a donar lloc a diferents fragments que contenen la regió amino-terminal (PTH1-34), la regió mitja (PTH 44-48) o la regió carboxil-terminal (PTH 53-84). Per tant, en la circulació existeix una barreja de fragments de la PTH originats de la PTH intacta(1-84). La PTH intacta i la amino-terminal (1-34) tenen activitat biològica

equipotent en el ronyó; la PTH 1-34 és l'única capaç d'exercir accions biològiques sobre l'esquelet.³

La PTH és un regulador del metabolisme del calci i del fòsfor. Actua principalment en dos òrgans; en l'os i en el ronyó tot i que també pot actuar en altres, com ara en l'intestí. A l'os estimula els osteoclasts i provoca reabsorció ossea, resultant en un increment en sèrum dels nivells de calci i de fòsfor.

La PTH estimula l'activitat de la 1α hidroxilasa en el ronyó, resultant en un augment de la producció de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ la qual actua incrementant l'absorció de calci i fosfat en l'intestí. A més, la PTH també actua sobre el ronyó incrementant la reabsorció de calci en els túbuls renals distals i disminuint la reabsorció de fòsfor en el túbuls renals proximals.⁴

L'increment de calci i de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en el sèrum, causen una retroalimentació negativa en el procés d'alliberament de PTH per les glàndules paratiroides. Per una banda, el calci actua negativament sobre la glàndula mitjançant el receptor sensible al calci (CaSR), receptor associat a proteïnes G que es sensible a diferents ions com el Ca^{2+} .⁵ Per altra banda, el fòsfor produeix hiperplàsia de la glàndula independentment dels nivells de calci i calcitriol, mitjançant un mecanisme post-transcripcional augmentant de forma directa la síntesis i la secreció de PTH.^{6,7}

1.4.2.2- La vitamina D:

La vitamina D és un factor essencial en la regulació del calci i del fòsfor. En l'os és un factor necessari per efectuar el procés de reabsorció o mineralització ossea. Incrementa la reabsorció del calci i fòsfor urinari en els túbuls renals, també actua induint l'expressió del factor de creixement fibroblàstic (FGF23) el qual suprimeix l'activitat de la 1α hidroxilasa, inhibint la síntesis de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i d'aquesta manera es redueix la reabsorció renal de fosfat. A l'intestí promou l'absorció de calci i fosfat de la dieta. Actua sobre la glàndula paratiroides mitjançant el receptor de vitamina D inhibint la secreció de PTH.⁸

1.4.2.3- El factor de creixement fibroblàstic 23 (FGF23):

El factor de creixement fibroblàstic (FGF23) és una proteïna d'aproximadament 26 KDa membre de la família dels FGF (*fibroblast growth factors*). Es secreta majoritàriament pels osteòcits i actualment es considera com un dels factors més importants en la regulació de l'homeòstasi del fòsfor. El FGF23 actua sobre les seves cèl·lules diana conjuntament amb el

cofactor klotho, una proteïna de membrana de la família de les glicosilades augmentant l'eliminació de fòsfor per l'orina, promovent la fosfatúria.⁹ També s'ha observat el seu efecte inhibint la síntesis de la vitamina D a nivell renal mitjançant la inhibició de la 1 α hidroxilasa. Aquest efecte es veu incrementat quan hi ha un augment del fòsfor plasmàtic que fa que s'incrementi l'expressió de FGF23, amb la qual cosa disminueix la síntesis renal de vitamina D. La FGF23 també actua a nivell de la paratiroides inhibint la síntesis i la secreció de la PTH i disminuint l'expressió de la 1 α hidroxilasa.^{10,11}

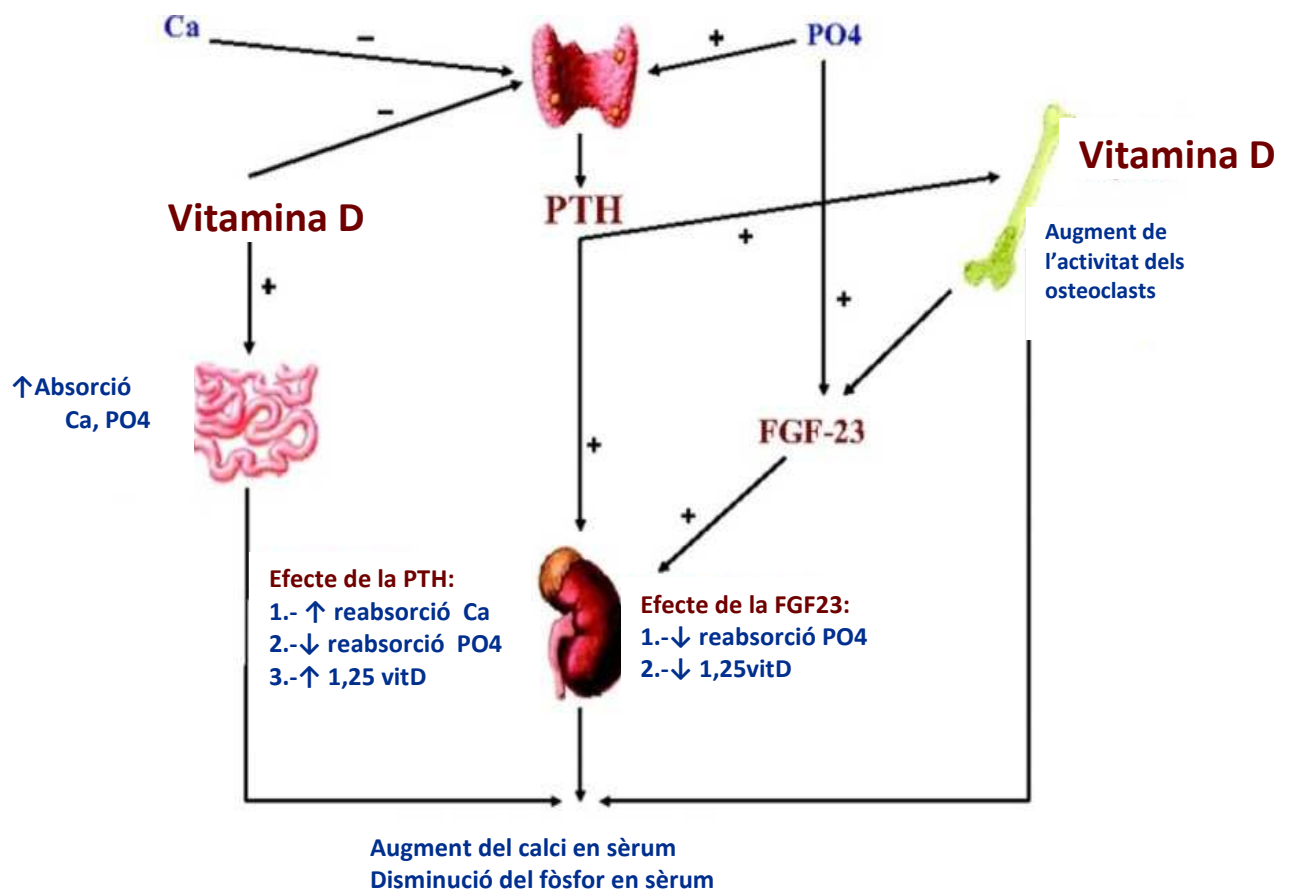


Figura 1.- Homeòstasi normal del Calci i del Fòsfor.

1.4.2.4- L' hiperparatiroidisme secundari en la malaltia renal crònica:

En la MRC es desenvolupa l'hiperparatiroidisme secundari, el qual es generat per un desequilibri relatiu en l'homeòstasi del calci i del fòsfor. Amb la disminució de la funció renal, es produeix una reducció de l'absorció de calci juntament amb una disminució de la síntesis de calcitriol, produint nivells de calci baixos en el sèrum. Aquest serà el primer estímul per la lliberació de PTH per les glàndules paratiroides, les quals mitjançant els receptors sensibles al

Ca (CaSR) expressats en la superfície de les cèl·lules de la glàndula paratiroides detectaran la hipocalcèmia i augmentaran la síntesis i la secreció de la PTH per tal d'incrementar-ne els nivells. Per un altre costat, i en estadis més avançats de la malaltia renal, es produeix un descens en l'eliminació del fòsfor que resulta amb una hiperfosfatèmia que també estimularà la síntesis i la lliberació de la PTH.

L'hiperparatiroidisme secundari (HPT2), es caracteritza per un desordre funcional de les glàndules paratiroides, amb la conseqüent hipersecreció de PTH i hiperplàsia de les glàndules¹². Els pacients amb MRC pateixen aquesta malaltia per diferents causes: l'eliminació de fosfat es troba deteriorada, no es produeix vitamina D a causa de la desaparició del parènquima renal, l'absorció intestinal de calci és baixa i els nivells sanguinis de calci disminueixen. Per tot això, l'HPT2 en la MRC és tractat amb suplementes de calci, restricció de fosfats i vitamina D. S'ha demostrat l'eficàcia de l'administració intravenosa i oral de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ per suprimir el nivells de PTH en pacients amb HPT2.^{13,14} No obstant això, el potent efecte de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre l'absorció de calci i fòsfor dins l'intestí i sobre la mobilització dels mateixos en l'os produeix que el tractament amb vitamina D activa es complicitzi amb la hipercalcèmia i hiperfosfatèmia a dosis terapèutiques.^{15,16} Per això, s'utilitzen anàlegs de la vitamina D per al tractament del HPT2, els quals disminueixen les concentracions sèriques de PTH i al mateix temps eleven mínimament la calcèmia i la fosfatèmia, produint el mínim d'efectes secundaris. Un dels anàlegs més usat és el Paricalcitol (19-nor-1,25-dihidroxitamin D_2). Estudis de Slatopolsky *et al* demostren que el 19-nor-1,25(OH) $_2\text{D}_2$ suprimeix els nivells de PTH en rates urèmiques a una concentració la qual no afecta els nivells de calci en el plasma¹⁷. No es coneix la raó per aquest efecte diferencial entre la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i el 19-nor-1,25(OH) $_2\text{D}_2$, però existeixen diversos estudis on detecten diferents efectes de l'anàleg en vers la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Finch *et al*¹⁸ observen que el 19-nor-1,25(OH) $_2\text{D}_2$ és unes 10 vegades menys actiu en l'increment de calci i fòsfor al sèrum quan aquests dos elements han estat eliminats de la dieta en rates paratiroidectomitzades suggerint que això pot ser degut, en part, a la disminució de la mobilització mineral en l'os. Cardús *et al*¹⁹ van mostrar que el calcitriol i el paricalcitol tenien diferents efectes biològics en les CMLV (cèl·lules de múscul llis vascular). El calcitriol augmentava la proliferació i la calcificació *in vitro* e *in vivo*, mentre el paricalcitol no. Aquestes diferències poden agreujar els problemes cardiovasculars associats amb les condicions urèmiques.

1.4.3.- L'hiperfosfatèmia:

El fòsfor és un element que es troba en quasi tots els aliments, s'absorbeix des de l'aparell digestiu i passa a la sang fins arribar als ronyons on serà excretat. Quan es produeix insuficiència renal, els ronyons ja no poden eliminar el fòsfor correctament i es retinent produint hiperfosfatèmia. Els nivells normal de fòsfor oscil·len entre 2,5 mg/dl i 4,5 mg/dl, mentre que els nivells de fòsfor en sang de molts pacients en diàlisi són superiors a 6,5 mg/dl.²⁰ Aquests nivells més elevats s'associen a una significativa progressió de la malaltia i rics de mort en pacients sotmesos a almenys un any de diàlisi.

Aquesta hiperfosfatèmia és un altre factor que promou el desenvolupament de l'hiperparatiroidisme secundari (HPT2), el fòsfor induïx la secreció de PTH per; estimulació directa de la glàndula paratiroides, inducció d'hipocalcèmia per la precipitació amb el calci formant CaHPO_4 i per l'estimulació de la FGF23 que produeix una inhibició severa de la 1α hidroxilasa i caiguda dels nivells de $1,25$ dihidroxivitaminaD.²¹ La down-regulació dels receptors de vitaminaD a la glàndula dona lloc a una resistència a la vitaminaD. Aquesta pèrdua de retroalimentació negativa a la glàndula produeix un augment dels nivells de PTH. Aquest augment en la PTH és apropiat per a disminuir la reabsorció de fòsfor i restablir els nivells normals de Ca i P. En pacients amb MRC estadi IV la reabsorció tubular de fòsfor ja no pot disminuir més, produint un augment de la secreció de PTH i de FGF23. Encara que la PTH ja no funciona al ronyó a l'os encara es activa i continua alliberant Ca i P. D'aquesta manera es produeix un cicle viciós; el fòsfor elevat causa un augment de la secreció de PTH i la PTH causa més hiperfosfatèmia.⁴

Els nivells elevats de fòsfor i del producte $\text{Ca} \times \text{P}$ s'associen amb la progressió de la MRC.²² Per això, és tan important el control dels nivells sèrics de fòsfor en aquests pacients. La restricció de P en la dieta i la diàlisi convencional generalment no són efectives per controlar l'hiperfosfatèmia. Per això s'utilitzen quelants de fòsfor, que actuen com "esponges" unint-se al fòsfor quan encara es troba en l'estómac i s'elimina per la femta. Al començament es feien servir els quelant d'alumini, que funcionaven bé però produïen intoxicacions per alumini.²³ Posteriorment, van ser substituïts pels quelants de sals de calci, aquets tenien una mala tolerància digestiva i a més s'han relacionat amb la calcificació observada en pacients amb diàlisi.²⁴ Actualment, s'utilitza el clorhidrat de Sevelamer i més recentment el carbonat de lantà.

El clorhidrat de Sevelamer és un polímer que té múltiples amines separades per carboni. En l'intestí aquestes amines es protonen i s'uneixen al fosfat mitjançant intercanvi iònic i per ponts d'hidrogen als grups amino de la cadena de polímer del Sevelamer. La unió del fosfat al sevelamer no produeix la formació de subproductes residuals, però induïx acidosis metabòlica. Per això, es va substituir pel carbonat de lantà.

El carbonat de lantà és molt eficaç com a quelant de fòsfor degut a l'elevada afinitat pels ions fosfat (PO_4^{3-}). En conjunt formen un fosfat de lantà que és molt insoluble, fet que disminueix de forma significativa l'absorció del fosfat. I a més, aquesta gran afinitat es manté en tot el rang de pH que hi ha en l'aparell digestiu.²⁵ S'ha mostrat també que el complex lantà-fosfat té una estabilitat més gran que el Sevelamer-fosfat.

1.4.4.- La Malaltia Cardiovascular:

Els problemes cardiovasculars són la causa més freqüent de mort en pacients amb malaltia renal crònica. La malaltia cardiovascular en la malaltia renal té un component de cardiomiopatia i un altre d'arteriopatia urèmica.

La miopatia implica hipertrofia ventricular esquerra (HVE). La HVE és un factor de risc cardiovascular ben conegut en la població general. En el transcurs de la malaltia renal la HVE es desenvolupa de forma precoç i la seva prevalença augmenta de forma inversa al nivell de funció renal.²⁶⁻²⁸ Els mecanismes implicats en el desenvolupament d'aquesta malaltia són la sobrecàrrega de pressió i de volum. La sobrecàrrega de pressió és induïda per la pressió arterial, la rigidesa de les artèries (arteriosclerosi) o l'estenosi aòrtica. La sobrecàrrega de volum es induïda per l'hipervolemia crònica, l'anèmia o la circulació hiperdinàmica. D'aquesta manera, per un mateix nivell de pressió arterial, els pacients renals presenten un índex de massa del ventricle esquerra superior al dels pacients no renals, indicant que altres factors contribueixen al seu desenvolupament²⁹, com ara: l'hiperparatiroidisme secundari, l'activació del sistema renina-angiotensina, l'endotelina-1 local, la inflamació, les calcificacions vasculars, etc.³⁰⁻³² La HVE comença sent un fenomen adaptatiu a la sobrecàrrega de pressió i volum, però a la llarga es converteix en un fenomen de mala adaptació. En estudis de pacients en diàlisi la HVE s'associa amb major risc de disfunció diastòlica, fallada cardíaca recurrent i mort.^{33,34}

L'arteriopatia urèmica engloba l'ateromatosis i l'arteriosclerosi. L'ateromatosis està associada amb la fibrosis i calcificació de la capa íntima i per tant amb la disminució del

diàmetre de la llum per la formació de plaques d'ateroma calcificades. En canvi, en l'arteriosclerosi s'observa calcificació i engruiximent de la capa mitja de la paret dels vasos amb el consegüent increment de la rigidesa arterial. La suma del dany en el miocardi amb el vascular causa les manifestacions clíniques ja conegudes com la cardiopatia isquèmica, insuficiència cardíaca, hipotensió ...³⁵

2.-LA CALCIFICACIÓ VASCULAR EN LA URÈMIA:

La calcificació en teixits tous i en les parets dels vasos sanguinis es produeix més freqüentment en pacients dialitzats comparat amb la població no urèmica.³⁶ Hi ha evidències que les alteracions en el metabolisme ossi i mineral s'associen a calcificació vascular i augment de la mobilitat i de la mortalitat. Aquestes alteracions en el metabolisme mineral són comuns en els estadis finals de la malaltia renal.

En els vasos sanguinis podem trobar els dipòsits de calci en diferents capes de la paret arterial i això està relacionat amb la patologia:

-Calcificació de la túnica íntima: relacionat amb les lesions ateroscleròtiques, on hi té lloc una combinació de necrosis cel·lular, inflamació i deposició de colesterol, fosfolípids i lipoproteïnes.³⁷ La calcificació comença en primer lloc en el cor lipídic juntament amb les cèl·lules inflamatòries infiltrades i la necrosis cel·lular. Ja en estadis temprans les cèl·lules dels vasos comencen a expressar proteïnes característiques de l'os.

-Calcificació de la túnica mitja: associat a l'increment de la rigidesa de la paret vascular i a l'arteriosclerosi observada amb l'edat, diabetis, hipertensió, osteoporosis i MRC.³⁸⁻⁴⁰ La calcificació en la capa mitja produeix rigidesa en la paret arterial, amb un augment de la pressió arterial, i també un augment del risc cardiovascular.

Els dos tipus de calcificació poden donar-se independentment l'un de l'altre, però en el cas dels pacients MRC aquest procés implica, generalment, ambdós tipus de calcificació vascular.^{41,42}

En els pacients amb malaltia renal avançada es produeix un engrandiment de la glàndula paratiroides i un augment de la PTH circulant, els quals contribueixen a incrementar la resorció ossea, fet que podria afavorir la calcificació vascular.⁴³ L'hiperfosfatèmia i l'augment del producte calci-fosfat contribueixen a la calcificació vascular en pacients urèmics.

2.1- Estructura de la paret arterial:

L'estructura normal de les artèries consta de tres capes ben delimitades (Fig.3): la **túnica íntima** que consta de l'endoteli, format per una monocapa de cèl·lules endotelials i el subendoteli o làmina basal, formada per una capa de teixit conjuntiu, la **túnica mitja**, que és la capa més gruixuda constituïda per cèl·lules musculars llises (CMLV), aquesta túnica està limitada exteriorment per la làmina elàstica, que està formada per fibres elàstiques amb fenestracions que permeten el pas de substàncies i cèl·lules en ambdues direccions. I finalment la **túnica adventícia**, la part més externa de l'artèria, formada per teixit conjuntiu amb feixos de col·lagen, CMLV i fibroblasts. Aquest teixit conjuntiu es prolonga gradualment relacionant-se amb estructures veïnes.

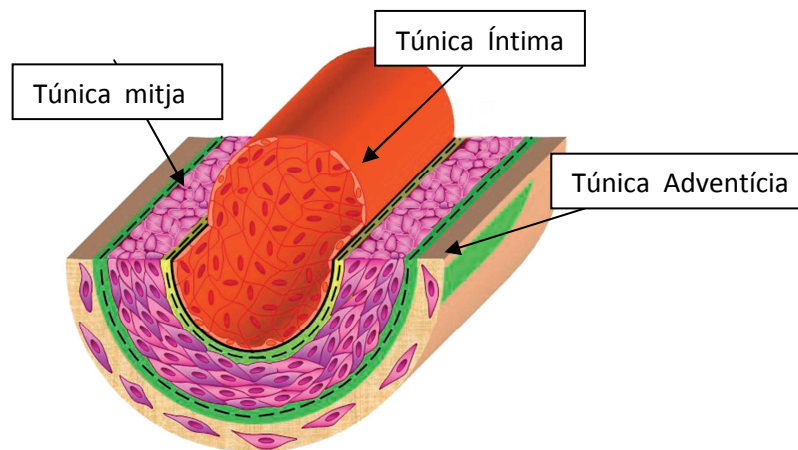


Figura 2.-Estructura de la paret arterial.

2.2- Estadis de la Calcificació vascular:

La calcificació vascular és un procés que es desenvolupa en una sèrie d'etapes ⁴⁴. Les cèl·lules vasculars d'origen mesenquimal (CMLV; miofibroblasts, pericits microvasculars i cèl·lules vasculars calcificants –CVC-) es poden diferenciar en cèl·lules semblants a osteoblasts (*osteoblast-like cells*) (**estadi 1**). Les CVC van ser descrites per Demer i col·laboradors ⁴⁵ com una subpoblació de CMLV que en cultiu formen nòduls i calcificacions que es mantenen estables al llarg del temps. Aquests nòduls comparteixen múltiples propietats amb l'os, com és l'increment de l'activitat de la fosfatasa alcalina (ALP) i l'expressió de l'osteopontina, osteonectina i osteocalcina. ⁴⁶

S'estima que podria suposar entre el 20-30% de la població total de CMLV ⁴⁷⁻⁴⁹. Aquestes diferents cèl·lules vasculars d'origen mesenquimal poden exhibir fenotips intercanviables sota certes condicions patològiques, incluídes l'aterosclerosi, la diabetis, l'envelliment i la MRC. Aquestes cèl·lules poden contribuir a la diferenciació osteoblàstica; perden marcadors de múscul llis i desenvolupen característiques osteoblàstiques com l'expressió de ALP, osteocalcina i osteopontina (**estadi 2**). Aquesta diferenciació osteoblàstica desemboca en la mineralització de la matriu extracel·lular (**estadi 3**).

2.3.- Mecanismes de la Calcificació vascular:

La calcificació vascular no només es produeix per un mecanisme passiu de deposició de calci-fosfat en els vasos, sinó que també es produeix per un mecanisme actiu similar al procés de formació ossea.⁵⁰ Diferents productes gènics estan implicats en aquesta regulació induint o inhibint el procés de calcificació. (Taula 3).

GENS INHIBIDORS	GENS INDUCTORS
Osteopontina (OPN)	Fosfatasa alcalina (ALP), RANKL
Matrix Gla-Protein (MPG)	Cbfa1 o Runx2
Fetuna	Osteonectina, Osteocalcina
Osteoprotegerina (OPG)	Proteïna de la Matriu ossea 2 (BMP2)

Taula 3.-Efecte oposat de proteïnes associades amb la calcificació vascular.

2.3.1.- El Calci i el Fòsfor:

Alguns autors es refereixen a ells com els "mecanismes passius de la calcificació". Els nivells elevats de Ca, P i CaxP (prevalents en pacients amb MRC i significativament lligats a mort per malaltia cardiovascular en aquets pacients ⁵¹) promouen la formació de nuclis de cristalls de bioapatita (principal component mineral de l'os, espines i closques).⁵² En estudis *in vitro* s'ha observat que a l'exposar les CMLV a elevades concentracions de fosfat o calci es produeixen precipitats de Ca-P a la matriu extracel·lular i quan les incubem amb els dos elements a la vegada, observem un efecte sinèrgic de la calcificació.^{53,54}

A més a més, es coneix que aquest procés no és senzillament degut a la precipitació dels ions bivalents, sinó que es tracta d'un procés completament regulat que implica un canvi fenotípic de les CMLV, la pèrdua de l'expressió de gens específics de les cèl·lules de múscul llis, com SM22 α i SM α i una up-regulació de gens associats a la diferenciació òssia.⁵⁵⁻⁵⁷ L'efecte més important que observem és sobre el gen del "*core binding factor*" (Cbf-1) o Runx2, un factor de transcripció crític en la diferenciació dels osteoblasts i en la regulació de l'osteocalcina, l'osteopontina i altres proteïnes de la matriu òssia.

Sembla que els efectes de l'hiperfosfatèmia i l'hipercalcèmia estan mediat pel cotransportador de fosfat dependent de sodi, NCP, el subtipus Pit-1 en les CMLV. L'elevat fòsfor i calci estimula l'activitat del cotranportador, el qual permet l'acumulació de fòsfor dins de la cèl·lula, que serveix com a senyal per l'expressió de gens osteogènics.⁵⁸

2.3.2.- Mort cel·lular i apoptosis:

La calcificació vascular esta relacionada amb la presència de petites vesícules de matriu amb contingut citoplasmàtic i de membrana cel·lular, de la mateixa manera que passa a l'os, que semblen actuar com a llocs iniciadors de la formació de cristalls d'apatita.

Durant el procés de mort cel·lular i d'apoptosis en la paret vascular es podria iniciar la calcificació per la presència de "cossos apoptòtics", similars a aquestes vesícules de matriu, que incrementarien la permeabilitat de la paret cel·lular facilitant l'entrada de calci i fosfat, i sembla ser que també actuarien com a estructures nuclears per la formació dels cristalls de calci.⁵⁹ Proudfoot y cols⁶⁰ mostren que l'apoptosis regula la calcificació vascular *in vitro*.

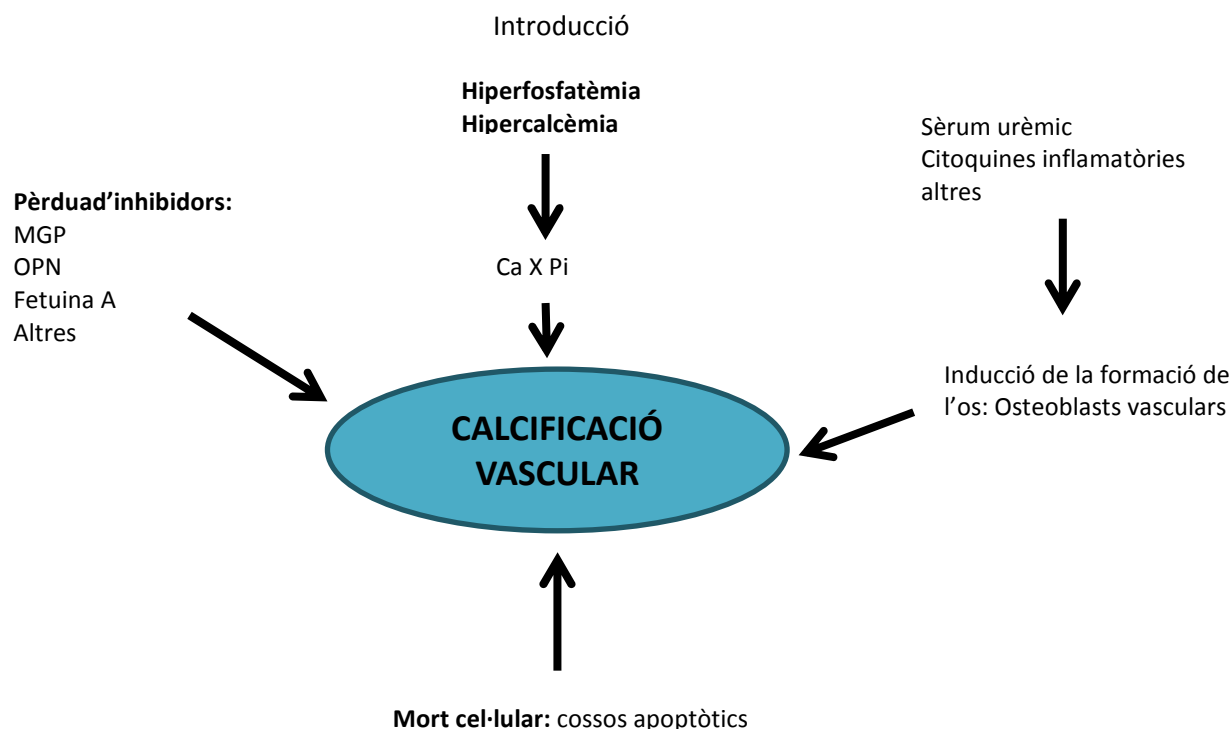


Figura 3. Teories del mecanisme de calcificació vascular. L'hiperfosfatèmia i l'hipercalcèmia presents en els pacients amb MRC és el principal estimulador de la calcificació. Altres inductors: (1) la pèrdua d'inhibidors de calcificació, (2) l'inducció del procés de formació d'os com a resultat d'una diferenciació alterada de les CMLV (3) la mort cel·lular que condueix a l'alliberament de cossos apoptòtics o restes necròtiques. Adaptat de Giachelli, 2004.

2.3.3.- Inhibidors de la Calcificació vascular:

Les cèl·lules dels vasos expressen en condicions normals molècules inhibidores de la mineralització. La pèrdua de la seva expressió, com també passa en la MRC, provoca el que es denomina "pèrdua de la inhibició natural", donant lloc a una calcificació espontània i a un augment de la mortalitat.⁶¹ Les molècules inhibidores de la calcificació són:

- **Matrix Gla protein (MGP)**

Va ser el primer inhibidor de la calcificació identificat. És una proteïna extracel·lular de la matriu dependent de la vitamina K que s'expressa constitutivament en les CMLV, i també en les endotelials, en vasos normal, però es troba poc expressada en artèries calcificades.⁶² Té una alta afinitat per l'hidroxiapatita que participa activament en la correcta formació de l'os i inhibeix la calcificació vascular.⁶³ La MGP actua prevenint l'acció del factor diferenciador osteogènic i condrogènic, BMP2.⁶⁴ S'ha observat que els nivells sèrics de MGP són menors en pacients amb calcificacions que en els que no en tenen.⁶⁵ A més, els ratolins knock out per

MGP desenvolpen osteoporosis i calcificacions severes de la capa mitja i moren per ruptura aòrtica.⁶⁶

- **Fetuina A:**

És una glicoproteïna sèrica que inhibeix la calcificació vascular ectòpica, també s'anomena glicoproteïna α 2-Heremans-Schmid. És un potent inhibidor de la formació *de novo* d'hidroxiapatita reduint la formació de cristalls en solucions que contenen calci i fòsfor *in vitro*. Inhibeix la formació d'aquests cristalls però no afecta als ja formats.⁶⁷ Els ratolins deficients en aquesta proteïna desenvolpen extenses calcificacions en els teixits tous com ara el miocardi, ronyó, llengua i pell. Recentment, Ketteler et al⁶⁸ mostraven que baixos nivells en sèrum de fetuina A s'associaven amb un augment de la mortalitat cardiovascular en pacients que rebien tractament amb hemodiàlisi, de manera que la fetuina podria prevenir les calcificacions accelerades observades en la MRC.

- **Osteopontina (OPN):**

La OPN és una fosfoproteïna que es troba normalment en els teixits mineralitzats com ossos i dents, i que està implicada en la regulació de la mineralització al actuar com a inhibidor del creixement de cristalls d'apatita.⁶⁹ Encara que no es troba en artèries normals, s'ha detectat la seva expressió en plaques ateroscleròtiques⁷⁰ i vàlvules aòrtiques calcificades. Jono et al.⁷¹ va demostrar que la fosforilació de l'osteopontina era un pas clau per inhibir la calcificació de les CMLV.

Giachelli i col·laboradors⁷² per examinar el paper de la OPN en la calcificació vascular van creuar ratolins OPN -/- amb ratolins MGP -/-. Els ratolins OPN -/- MGP -/- mostraven una calcificació més accelerada que els que solament eren deficients en MGP, pel que aquests estudis indiquen que OPN és un inhibidor induïble de la calcificació vascular *in vivo*.

- **Osteoprotegerina (OPG):**

És un membre de la família de receptors dels factors de necrosis tumorals (TNFR), que ha estat identificat com a regulador de la resorció ossea.⁷³ OPG es produït per una gran quantitat de teixits, inclosos el sistema cardiovascular, pulmó, ronyó, sistema immunològic i l'os.⁷⁴ En les lesions calcificades avançades OPG es presenta al voltant de l'àrea calcificada. S'ha observat que els ratolins deficients en OPG desenvolupen osteoporosis severa i calcificació en

la capa mitja⁷⁵, deixant clara la seva funció com a inhibidor de la calcificació vascular. S'ha estudiat el potencial de OPG com a marcador de la malaltia cardiovascular. El seu nivell en sèrum s'incrementa amb la severitat de la calcificació vascular.⁷⁶ OPG funciona com un receptor soluble del lligant (RANKL, receptor activador del factor nuclear- κ B(RANK)) impedit la unió de RANKL a RANK⁷⁷, això fa que s'inhibeixi la diferenciació dels osteoclasts. RANKL es produït per les cèl·lules T activades i estimula a RANK, aquesta activació permet la formació, fusió, diferenciació, activació i supervivència dels osteoclasts permetent l'augment de la resorció i pèrdua de l'os. Els efectes biològics d'OPG són oposats als de RANKL, ja que OPG actua com a inhibidor soluble que preveu la interacció de RANKL i seguidament l'estimulació del seu receptor RANK. (Figura 4).

OPG és a més receptor del lligand inductor de l'apoptosis relacionada amb el factor de necrosis tumoral (TRAIL). TRAIL es troba en gran varietat de teixits, incloent les CMLV i les endotelials. En les lesions ateroscleròtiques humanes TRAIL s'ha localitzat al voltant de les àrees calcificades.⁷⁸



Figura 4.-Mecanisme d'acció i efectes biològics de RANKL, RANK i OPG en el metabolisme ossi. La unió del receptor RANKL a RANK estimula la diferenciació i activació dels osteoclasts. La unió de RANKL a OPG inhibeix la diferenciació i activació dels osteoclasts, disminuint la resorció ossea.

- **Altres proteïnes:**

BMP7: El tractament amb la proteïna morfogènica de l'os 7 (**BMP7**) mostra una disminució de la calcificació vascular en rates deficientes en BMP7.⁷⁹ Mentre que BMP2 antagonitza a BMP7 promovent la diferenciació de CMLV cap a cèl·lules semblants a osteoblasts.⁸⁰

Pirofosfat: El pirofosfat, és també un inhibidor de la calcificació vascular inhibint la formació d'hidroxiapatita en orina, es produït en els vasos on inhibeix la calcificació. Lomashvili va mostrar nivells reduïts de pirofosfat en un grup de pacients en hemodiàlisi, fet que contribuïa a la calcificació vascular.⁸¹

2.3.4.- Activadors de la Calcificació vascular:

A més de la hiperfosfatèmia i de la hipercalcèmia existeixen estudis que suggereixen la presència de substàncies en els sèrum dels pacients amb MRC que estimulen la calcificació.⁸² Les CMLV bovines en presència de sèrum urèmic incrementen l'expressió de proteïnes relacionades amb el procés de calcificació. S'ha identificat un ampli número de factors de la urèmia que poden induir gens osteogènics, de transformació osteoblàstica i de secreció d'algunes proteïnes de la matriu ossea en la paret dels vasos i teixits tous. Alguns d'aquets factors són: el factor de necrosis tumoral (TNF)⁸³, les citokines inflamatòries⁸⁴, fibronectina⁸⁵, el col·lagen tipus I i el 25-hidrocolesterol⁸⁶. El sèrum urèmic també conté nivells elevats de fòsfor, hormona paratiroidea, fosfatasa alcalina i proteïna C-reactiva, els quals poden estar relacionats amb la calcificació vascular. Els activadors més importants són:

- Fosfatasa alcalina (ALP):

És un dels marcadors fenotípics dels osteoblasts i és essencial en el procés de calcificació vascular. S'ha detectat la seva presència en les calcificacions vasculares de la íntima, mitjana i de les vàlvules cardíques. ALP expressada en la superfície cel·lular pot actuar sobre els alliberadors de fosfat, alliberant fosfat inorgànic.⁸⁷ Les citokines inflamatòries i la vitaminaD indueixen la seva up regulació i la mineralització.⁸⁸

- Core binding factor alpha 1 (Cbfa1) or Runx2:

És el principal regulador de la diferenciació ossea. Els ratolins deficientes en Runx2 tenen problemes en la formació del cartílag i de mineralització de l'os⁸⁹. Actua com un factor de transcripció que dispara l'expressió d'importants gens de la línia osteoblàstica com són l'osteocalcina, l'osteopontina, l'ALP, o el col·lagen tipus I.⁹⁰ El fosfat⁹¹ i les toxines urèmiques⁹² up-regulen la seva expressió. En CMLV bobines incubades amb sèrum urèmic es mostra una up regulació de l'expressió de Runx2, osteopontina i fosfatasa alcalina que acceleren la calcificació *in vitro*.⁹³

-RANKL:

RANKL és una proteïna de 316 aminoàcids amb un pes molecular de 38Kd. Es produïda per cèl·lules de la línia osteoblàstica i cèl·lules T activades. Promou la formació, fusió, diferenciació, activació i supervivència dels osteoclasts permetent l'augment de la resorció i pèrdua de l'os.^{94,95}

RANKL estimula el seu receptor RANK i s'inicia la cascada de senyalització intracel·lular de NF- κ B⁹⁶, el qual es transloca al nucli mitjançant la via clàssica (regulada per IKK β) o l'alternativa (controlada per IKK α). La seva translocació modula l'expressió de diferents gens, com algunes BMPs (BMP4) que poden estar implicades en la calcificació vascular.

La primera evidència de que el sistema RANK-RANKL-OPG podia estar implicat en la calcificació vascular es va observar en ratolins knockout per OPG, els quals presentaven osteoporosis i calcificacions de l'aorta i de l'artèria renal⁹⁷. També, es va observar l'alta prevalença clínica i coincidència de calcificació vascular i malaltia cardiovascular en dones post menopàusiques i gent amb edat avançada amb osteoporosis^{98, 99}.

Estudis més actuals de Panizo et al.¹⁰⁰ mostren com RANKL augmenta la calcificació en CMLV augmentant la producció de BMP4 mitjançant la via alternativa NF- κ B.

- Bone morfogenic proteins (BMPs):

Les BMPs són un grup de proteïnes que reben aquest nom per les seves propietats osteoinductives. Les BMPs formen part de la superfamília del factor de creixement transformant β (TGF β). Actuen a través de la unió a un complex heterodimèric de receptors transmembrana (I i II). La unió de la BMP al seu receptor específic tipus II dona lloc a una activació dels receptors tipus I. Això provoca la fosforilació i la translocació nuclear dels factors de transcripció Smad modificant així la taxa de transcripció dels gens diana.¹⁰¹⁻¹⁰³

BMP2: És un potent factor osteoinductor. La seva expressió desencadena programes de regulació transcripcional osteogènica en l'arbre arterial. BMP2 indueix tant a Msx2 (factor que promou l'expressió de gens osteogènics) com a Runx2 en CMLVi l'efecte d'aquest és a través de l'estimulació en la regulació de la proteïna Osterix (Osx), un regulador transcripcional global de la mineralització i diferenciació osteoblàstica.¹⁰⁴ Msx2 es requereix per la formació de l'os intermembranós mentre que Runx2 es crític per la diferenciació d'osteoblasts, la formació de l'os endocondrial i la neovascularització. En cultius de CMLV

bobines tractades amb sèrum urèmic s'observa un augment de l'expressió de BMP2 que pot up regular Runx2, afavorint la transformació de les CMLV a cèl·lules semblants a osteoblasts.¹⁰⁵ El paper de BMP2 en la calcificació vascular esta modulad (inhibit) per la Matrix Gla protein (MGP).¹⁰⁶

3.- LA VITAMINA D:

3.1.- Història de la vitamina D:

La vitamina D va ser descoberta a partir de dues malalties; el raquitisme i l'osteomalàcia. La principal característica d'aquestes dues malalties és la falta de calci en els ossos a causa d'una manca de vitamina D. El raquitisme afecta als nens que encara estan en creixement i l'osteomalàcia a adults que ja tenen els ossos formats. Ja en el segle I i II, Soranus, un físic romà, va observar deformitats òssies més freqüents en nens romans que en nens grecs, això ho va atribuir a la desnutrició i a la falta d'higiene dels nens romans. En aquest mateix segle Galen va descriure les deformitats òssies clàssiques que s'observen en el raquitisme. A la primera meitat del segle XVII, els casos de raquitisme a Gran Bretanya van passar a ser cada vegada més freqüents i diversos metges de l'època van estudiar la malaltia. Un d'ells, Francis Glisson ¹⁰⁷, el 1650 va publicar el primer tractat sobre raquitisme, "De Rachitide", on descriu els símptomes i la patologia clínica de diversos estats de malnutrició que va induir en animals d'experimentació. A partir d'aquest tractat, altres investigadors del mateix segle van començar a preguntar-se per l'origen de la malaltia. Van Siweten i posteriorment Levacher de la Feutrie i Bouvier, van relacionar el raquitisme amb una etiologia alimentària, començant a relacionar el paper patogènic de l'alimentació "deficient". El 1918, McCollum i els seus col·laboradors, John Howland, Edward Park i Paul Shipley van estudiar dietes de cereals deficientes en la vitamina A liposoluble i calci en rates joves i van observar canvis esquelètics semblants al raquitisme infantil. D'aquests estudis van deduir que la causa de la malaltia podria tenir relació amb la deficiència de la vitamina A o del calci o bé amb l'alteració del metabolisme d'aquests factors. Posteriorment van estudiar l'efecte de l'oli de fetge de bacallà (s'havia usat ocasionalment amb la finalitat de tractar el raquitisme des de 1789) en aquestes rates raquíiques. Suplementant la dieta entre 2-7 dies van induir un patró uniforme de curació del raquitisme. A partir d'aquestes investigacions McCollum compartia la mateixa qüestió que Mellanby, si la vitamina A era antiraquíica per si mateixa o si existia

alguna altra substància amb funció específica antiraquítica i una distribució similar a la vitamina A. McCollum i els seus col·laboradors van concloure que la substància antiraquítica era diferent a la vitamina A i aquesta tenia propietats específiques per a regular el metabolisme de l'os. En seqüència de vitamines descobertes, aquesta era la quarta, per això la van anomenar vitamina D. Amb anterioritat a aquests resultats, ja es coneixia l'efecte preventiu de la llum solar sobre el raquitisme (Armand Trousseau 1861), per tant, a partir del descobriment de la vitamina D i del raquitisme, es va establir que aquesta substància es produïa a la pell per l'acció de la llum solar. I finalment, Adolf Windaus va descobrir l'estructura química de la vitamina D i la seva relació amb els esterols, va rebre per aquests resultats el premi Nobel de 1928.

3.2.-La biosíntesis de la vitamina D:

La vitamina D és una hormona esteroide important que intervé en l'homeòstasi mineral i per tant, en la formació i manteniment de l'estructura òssia ¹⁰⁸. També se li han atribuït altres funcions relacionades amb la regulació del creixement, maduració i diferenciació cel·lular ¹⁰⁹, la secreció hormonal ¹¹⁰ i la funció immune. ¹¹¹

El precursor hormonal, la vitamina D₃ pot ser obtingut per la dieta o format per a partir del 7-dehidrocolesterol a la pell mitjançant una via no enzimàtica, la radiació ultraviolada (UV) mitjançant la qual sofreix una conversió fotolítica a provitamina D₃ i d'aquesta una isomerització tèrmica a vitamina D₃. ¹¹² La vitamina D₃ és transportada per la sang per mitjà de proteïnes plasmàtiques (la DBP, "vitamin D binding protein"). ¹¹³ Aquesta vitamina D₃ no té activitat biològica i per això ha de ser metabolitzada a la forma activa. Aquesta transformació requereix de dos passos: al fetge es produeix la primera hidroxilació mitjançant l'enzim mitocondrial 25-hidroxilasa produint-se la 25-hidroxivitamina D₃ (25(OH)D₃) a partir de la vitamina D₃. (Figura 5).

La 25(OH)D₃ és el metabòlit de vitamina D més abundant en la circulació i té una llarga vida mitjana pel que s'utilitza com a índex de l'estat nutricional de vitamina D. La 25(OH)D₃ és troba 100 cops més concentrada en sèrum (50-250 nM) que la 1,25(OH)₂D₃ (48-156 pM). Concentracions inferiors a les òptimes estan relacionades amb càncers, malaltia cardíaca, malalties infeccioses, autoimmunes, i envelliment.

Al ronyó es produeix la segona hidroxilació, mitjançant l'enzim 1 α hidroxilasa, es forma la 1,25(OH)₂D₃, que és la forma biològicament activa de la vitamina D.

Introducció

La 1α hidroxilasa es localitza fonamentalment en el ronyó, però també s'ha descrit en altres llocs extrarenals com: en les cèl·lules endotelials ¹¹⁴, cèl·lules de múscul llis vascular¹¹⁵, cèl·lules de la mucosa del colon ¹¹⁶, macròfags ¹¹⁷, i els queratinòcits¹¹⁸. L'acció de la 1α hidroxilasa és el pas limitant en la ruta biosintètica de la vitamina D i està finament regulat per la pròpia $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mitjançant retroalimentació negativa, a més de per altres factors com la PTH i la concentració de calci i fosfat.¹¹⁹ Els nivells del metabòlit actiu es regulen tant a nivell de la síntesis com de la degradació. La degradació té lloc per l'acció de l'enzim 24 hidroxilasa responsable de la hidroxilació de la $25(\text{OH})\text{D}_3$ i de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ per donar lloc a la $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, respectivament ¹²⁰. La 24-hidroxilasa (CYP24) és un enzim mitocondrial (53 kDa) i es troba majoritàriament en el ronyó però també en l'intestí, la pell, l'os, la placenta i els macròfags. ¹²¹ L'enzim 24-hidroxilasa s'expressa fonamentalment en el túbul renal, però també s'ha trobat en un ampli nombre de teixits. La seva afinitat per la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ es més gran que per la $25(\text{OH})\text{D}_3$, pel que es considera a l'enzim 24-hidroxilasa com un mecanisme d'eliminació de l'excés de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i per tant evita la seva toxicitat¹²². La seva expressió i activitat augmenta pel fosfat i es redueix per la PTH.

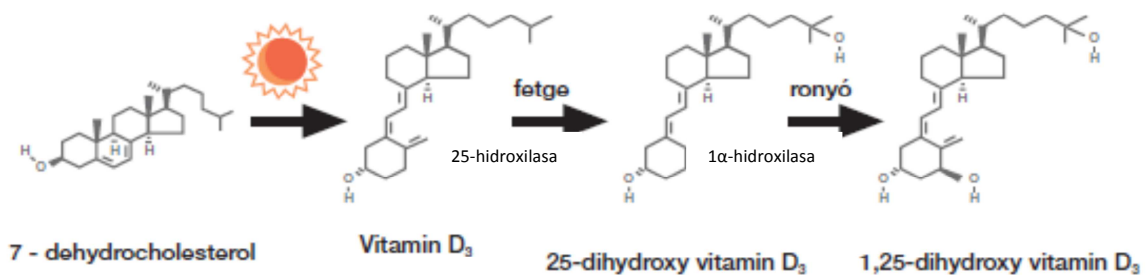


Figura 5.- Síntesis de la vitamina D. El precursor de la vitamina D s'obté de la dieta o de la bioactivació del 7-dehidrocolesterol per les radiacions solars, després s'ofereix una serie d'hidroxilacions per obtenir la forma activa, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Tots els metabòlits de la vitamina D tenen alta afinitat per la proteïna transportadora, la DBP, en l'ordre $25(\text{OH})\text{D}_3 = 24,25(\text{OH})\text{D}_3 > 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3 > \text{vitamina D}_3$. La unió de la DBP-metabòlit limita l'accés d'aquest a les cèl·lules diana, de manera que no podrà ser metabolitzat i per tant incrementa la vida mitja dels metabòlits. Les hormones esteroides, com els metabòlits de la vitamina D, poden entrar dins les cèl·lules diana per difusió en la membrana plasmàtica per ser metabolitzats o exercir la seva acció biològica. Per una altra banda, s'ha descrit que en les cèl·lules dels túbuls proximals, la $25(\text{OH})\text{D}_3$ necessita un receptor endocític, la megalina, per poder entrar dins la cèl·lula i ser metabolitzat a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Nykjaer *et al*¹²³ mostren que la

filtració a través del glomèrul i la reabsorció en els túbuls proximals de la $25(\text{OH})\text{D}_3$ unida a la DBP es dona gràcies a aquest receptor anomenat megalina.

3.3.- La 1α hidroxilasa renal i extrarenal:

La 1α hidroxilasa és una monooxigenasa localitzada en la membrana mitocondrial interna, amb una massa molecular d'aproximadament 52KDa. L'expressió de l'enzim es troba al túbul proximal (funció endocrina) i també al túbul distal contornejat (funció autocrina i paracrina), també està present en diverses cèl·lules i teixits com: la pròstata, les mames, el cervell, el colon, el pulmó, l'intestí, l'estómac, els ganglis limfàtics, la placenta, els monòcits, la melsa, les cèl·lules dendrítiques, les cèl·lules β pancreàtiques, monòcits, cèl·lules paratiroides, les cèl·lules de múscul llis vascular (CMLV) i les cèl·lules endotelials.

La síntesis extrarenal de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ és un factor autocrí/paracrí amb funció cel·lular específica. En humans, aquestes fonts extrarenals de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ només contribueixen de forma significativa en els nivells circulants de $1,25\text{D}$ durant l'embaràs, MRC i condicions patològiques com la tuberculosi, desordres granulomatosos i l'artritis reumatoide.

L'activitat renal de la 1α hidroxilasa està altament regulada en el manteniment de l'homeòstasi del calci. El calci de la dieta pot regular l'enzim directament mitjançant canvis en els nivells de calci del sèrum i indirectament per l'alteració dels nivells de PTH.¹²⁴ S'ha demostrat que la PTH té un efecte regulador directe sobre l'activitat de la 1α hidroxilasa i dels nivells de mRNA en cèl·lules dels túbuls renals proximals mitjançant canvis en cAMP mitjançant l'estimulació de la transcripció gènica de la 1α hidroxilasa.¹²⁵ La restricció de fòsfor en la dieta també augmenta l'activitat de la 1α hidroxilasa, independentment de canvis en la PTH i del calci. Evidències recents indiquen que la FGF23 augmenta amb la càrrega de fòsfor i juga un paper important en l'homeòstasi del fòsfor. A més FGF23 inhibeix l'expressió de la 1α hidroxilasa renal, ratolins que no expressen FGF23 tenen nivells elevats de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i un augment de l'activitat de la 1α hidroxilasa renal. La mateixa $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ exerceix un efecte de feedback negatiu sobre la 1α hidroxilasa limitant la seva síntesis per disminuir una possible intoxicació per vitamina D.

Els ratolins *knock out* per Klotho presenten nivells elevats de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, alts nivells de calci i fòsfor en plasma i moren de forma prematura per calcificacions ectòpiques,¹²⁶ indicant que FGF23 no pot senyalitzar sense el seu cofactor klotho, i per tant no es pot produir una regulació negativa de la 1α hidroxilasa.

La regulació de la 1 α hidroxilasa en llocs extrarenals és una mica diferent de l'enzim renal, en el manteniment de la funció autocrina i paracrina de la producció local de 1,25(OH) $_2$ D $_3$ ¹²⁷. Els nivells de síntesis i de degradació de la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ estan sota control de factors locals com ara les citoquines, els factors de creixement que optimitzen els nivells de 1,25(OH) $_2$ D $_3$ per les accions cel·lulars específiques mitjançant mecanismes que no són coneguts.

3.4- El receptor de vitamina D (VDR):

La vitamina D, pot exercir la seva acció biològica a través de la unió amb el seu receptor VDR (receptor de vitamina D). El VDR és un receptor nuclear membre de la superfamília de receptors de les hormones esteroides/tiroides. El VDR actua com a factor de transcripció dependent de lligand. L'estructura del gen del VDR consta de diverses regions ben definides que poden funcionar de manera autònoma:

- 1) Domini d'unió al lligand (LBD): És responsable de la unió d'alta afinitat de la 1,25(OH) $_2$ D $_3$.
- 2) Regions d'heretodimerització amb el receptor de l'àcid retinoic (RXR)
- 3) Domini d'unió al DNA (DBD): llocs amb alta afinitat per seqüències de DNA.
- 4) Lloc d'unió a les proteïnes nuclears correguladores del complex transcripcional que modulen el nivell de transcripció dels gens diana.

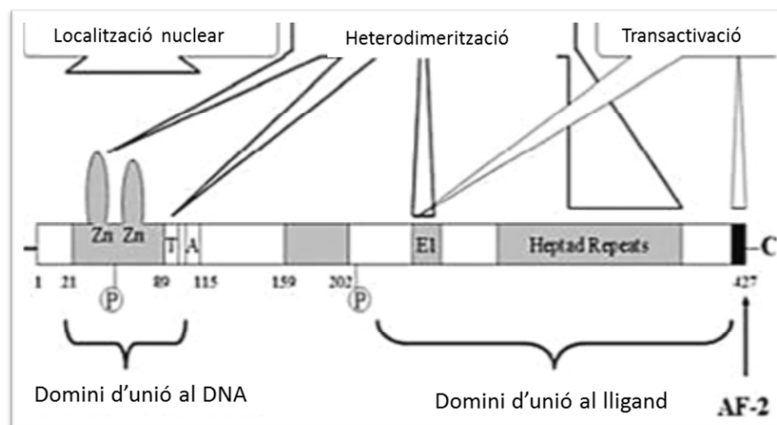


Figura 6. Dominis funcionals del receptor de la vitamina D (VDR): domini d'unió al DNA el qual té la funció de localització nuclear i heterodimerització, domini d'unió al lligand que també es responsable de l'heterodimerització i de la transactivació del receptor. Adaptat Dusso, Brown and Slatopolsky, 2005.

El domini d'unió al lligand (*Ligand binding domain*, LBD) és el responsable de la unió del receptor amb la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ amb una gran afinitat (Kd: 10⁻¹⁰- 10⁻¹¹M), mentre que la 25(OH)D $_3$ i la 24,25(OH) $_2$ D $_3$ s'uneixen al VDR amb una afinitat d'aproximadament 100 cops menys.¹²⁸ En

l'extrem C-terminal observem el domini d'activació de la funció-2 (*Activation function-2*, AF2). Aquest transmet el major canvi conformacional de l'estructura en tres dimensions del VDR en unir-se al lligand necessari per reclutar les proteïnes responsables de la translocació del citoplasma al nucli a través dels microtúbuls. El domini més conservat en diferents espècies és el domini d'unió al DNA (*DNA binding domain*, DBD) en la part N-terminal i que conté dos dits de zinc.¹²⁹ Aquest nom deriva del complex tetraèdric format per 4 cisteïnes amb una molècula de zinc de manera que es crea un llaç o dit d'aminoàcids que estableixen la unió amb l'DNA per mitjà de contactes amb fosfats de l'esquelet del DNA. El primer dit de zinc (pròxim a N-terminal) és el responsable de què el VDR pugui unir-se als promotors dels gens dependents de vitamina D, específicament en les seqüències anomenades elements de resposta de la vitamina D (*vitamin D response elements*, VDRE) que es troben a la part 5' del promotor dels gens diana de la vitamina D. El segon dit de zinc és, en canvi, el responsable de l'heterodimerització necessària amb el RXR (receptor de l'àcid cis- retinoic). Aquest és un procés indispensable perquè el VDR adquireixi la conformació essencial per tenir una alta afinitat cap al DNA i exercir la seva funció transactivadora o transrepressora, per això necessita interaccionar amb proteïnes nuclears coreguladores que donaran la modulació positiva o negativa de la transcripció en la qual intervé el VDR. Dos dels dominis anteriors serveixen com superfície adaptada per la unió dels coreguladors. El domini d'heterodimerització del RXR conté 246 residus molt conservats entre els receptors nuclears que serveixen d'unió dels coreguladors. L'altra regió es troba en el domini AF-2 que permet la unió de proteïnes del complex iniciador de la transcripció com l'RNA polimerasa. (Figura 6).

3.5.- Accions de la vitamina D : Acció genòmica i no genòmica.

3.5.1.- Acció genòmica de la vitamina D a través del VDR:

La magnitud de la resposta biològica del VDR moderada per la 1,25(OH)₂D₃ depèn de diferents factors: l'accessibilitat de lligand, el contingut de VDR, modificacions genètiques i postraduccionals, la disponibilitat i l'estat d'activació dels coreguladors genètics. La resposta biològica de la vitamina D en les cèl·lules diana ocorre segons el model de transactivació de gens de les hormones esteroides. Per tant, quan la 1,25(OH)₂D₃ s'uneix al VDR pateix un canvi conformacional que permetrà que el receptor sigui translocat al nucli on forma l'heterodímer generalment amb el receptor de l'àcid retinoic (RXR)¹³⁰. Aquest heterodímer s'uneix a regions promotores de gens específics en els teixits diana, els VDREs i la unió de l'heterodímer a

Introducció

aquests VDRE forma complexos amb proteïnes addicionals anomenats coactivadors o corepressors de la transcripció, de manera que poden incrementar o disminuir l'expressió dels gens diana (Figura 7).

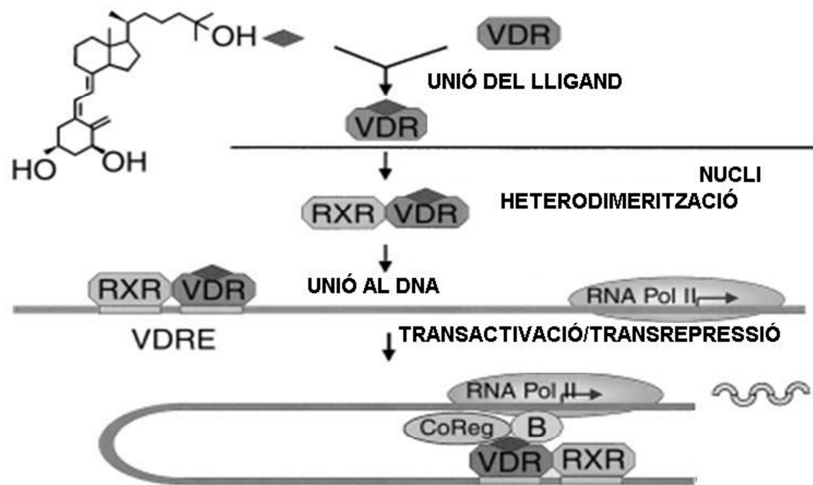


Figura 7.- Regulació de la transcripció gènica per la 1,25(OH)₂D₃. La unió de la 1,25(OH)₂D₃ activa el VDR per interaccionar amb el RXR nuclear, factors de transcripció basals i molècules coreguladores. Per a activar o inhibir la transcripció de gens per la RNA pol II.

3.5.2.- Acció no genòmica de la vitamina D:

Trobem diferents respostes dels metabòlits de la vitamina D, igual que altres hormones esteroidees, massa ràpides per implicar canvis en l'expressió genètica. En aquestes respostes podrien intervenir receptors de superfície cel·lular.

El paper d'aquestes accions no-genòmiques de la vitamina D encara no està molt clar. La 1,25(OH)₂D₃ pot estimular ràpidament el metabolisme del fosfoinositol^{131,132}, els nivells de calci citosòlic¹³³, els de cGMP¹³⁴, PKC, MAP quinases¹³⁵ i l'obertura dels canals de clor¹³⁶.

La naturalesa dels receptors que intervenen en aquestes respostes ràpides encara es troba en controvèrsia. Tot i així s'ha caracteritzat un receptor associat a membrana, la proteïna d'unió als esterols de resposta ràpida (*rapid-response steroid-binding protein*, 1,25D3-MARRS) que Nemere *et al*¹³⁷ van aïllar de les membranes de les cèl·lules d'intestí de pollastre i es va aconseguir fer un anticòs que bloquejava les accions no-genòmiques de la 1,25(OH)₂D₃.

3.6.- Accions biològiques de la vitamina D:

La vitamina D pot afectar a diferents processos o respostes:

-Respostes clàssiques de la vitamina D: processos fisiològics clàssics com la regulació de la concentració del calci i fòsfat en la sang per l'acció de la vitamina D en els intestins, l'os i el ronyó.

- Respostes no clàssiques de la vitamina D: efecte de la vitamina D en els processos de proliferació i diferenciació de diversos tipus cel·lulars com en cèl·lules epitelials de la pell, cèl·lules intestinals...

3.6.1.- Respostes clàssiques de la vitamina D:

El sistema endocrí de la vitamina D és un component essencial d'interacció entre el ronyó, l'os, les glàndules paratiroides i l'intestí que permet el manteniment dels nivells de calci extracel·lular d'una manera molt controlada, aquest és un procés vital per la integritat de l'esquelet i la fisiologia cel·lular.

Intestí:

La vitamina D és essencial per que l'intestí prim pugui absorbir el calci i el fòsfat de la dieta. Promou el pas a través de la vora en raspall a l'interior de la cèl·lula i la seva sortida per la membrana basolateral¹³⁸. El mecanisme d'acció per a promoure aquest transport de calci en l'intestí implica un mecanisme de transport actiu de calci. On hi està implicada una proteïna epitelial transportadora de calci, TRPV6 i una proteïna d'unió al calci (*calcium binding protein, CaBP*).¹³⁹ La síntesi d'aquestes proteïnes són dependents de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i es troben regulades tant a nivell transcripcional com post-transcripcional.

L'os:

La vitamina D és essencial pel manteniment i pel desenvolupament de l'esquelet. La deficiència de vitamina D té com a resultat el raquitisme en humans joves en edat de creixement i l'osteomalàcia en adults. Les anomalies en la mineralització de l'os en malalts de raquitisme dependent de vitamina D tipus II van ser resoltes després de la infusió de calci. Com a regulador de la transcripció de proteïnes relacionades amb l'os, la vitamina D induïx l'expressió de proteïnes com l'osteocalcina, RANKL i suprimeix la síntesi de col·lagen tipus I i la producció de OPG¹⁴⁰, una proteïna que s'uneix al mateix receptor que RANKL (el RANK) inhibint la seva funció de promoure la osteoclastogènesis. Per tant, s'ha demostrat tant *in vivo* com *in vitro* que la vitamina D estimula la diferenciació dels osteoclasts i per tant l'alliberament de calci i fòsfat.

Glàndula paratiroides:

El sistema endocrí de la vitamina D és també un potent modulador de la funció paratiroidea. La deficiència de vitamina D provoca una hiperplàsia de la glàndula paratiroidea i un increment de la síntesi i secreció de PTH. L'administració de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ actua a través del VDR inhibint la síntesi de la PTH i el creixement cel·lular, per això aquest compost s'usa com a tractament de l'hiperparatiroidisme secundari en la MRC.¹⁴¹ La cèl·lula paratiroidal reconeix els canvis en el Ca^{2+} a través d'un receptor de calci de membrana, el CaSR. L'augment del Ca extracel·lular activa l'expressió del CaSR i desencadena la seva cascada de senyalització per inhibir la secreció de PTH.

Ronyó:

El principal efecte de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ és el control sobre la seva pròpia síntesi i degradació a l'inhibir la 1α -hidroxilasa i estimular l'expressió de la 24-hidroxilasa, a més a més d'induir l'expressió de megalina en el túbul proximal¹⁴². La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ esta involucrada en la reabsorció renal de calci, augmentant l'expressió de certes proteïnes com ara TRPV5 i la calbindina.¹⁴³

3.6.2.- Respostes no clàssiques de la vitamina D:

Posteriorment, s'ha observat que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ té accions en altres òrgans diana com en la pell, pàncrees, fetge, etc¹⁴⁴. Aquestes accions se les anomena accions no clàssiques de la vitamina D i estan lligades a la presència de VDR en molts tipus cel·lulars. Entre aquestes accions no clàssiques es troben la regulació de la proliferació i diferenciació cel·lular, la regulació de l'apoptosis així com la regulació de la secreció hormonal i de la funció immune. Els macròfags i limfòcits, a més a més de tenir VDR expressen 1α -hidroxilasa i per tant tenen la capacitat de sintetitzar $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ de forma local en determinades circumstàncies¹⁴⁵. També existeixen estudis epidemiològics que demostren que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ disminueix el risc de càncer de colon¹⁴⁶, de mama¹⁴⁷ i pròstata¹⁴⁸, i per això s'ha estudiat *in vitro* els efectes de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en cèl·lules cancerígenes i s'ha demostrat que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ té la capacitat d'inhibir la proliferació i estimular la diferenciació cel·lular en aquests tipus de cèl·lules. Contràriament a aquests resultats, existeixen altres tipus cel·lulars, com cèl·lules de l'endometri¹⁴⁹ i condrocits¹⁵⁰ on la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ estimula la proliferació cel·lular. Per tant, les respostes de la vitamina D poden ser moltes i encara queda molt per estudiar. La presència del VDR en les cèl·lules endotelials i CMLV, i el descobriment de què les cèl·lules endotelials

sintetitzin $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ localment ens fa preguntar sobre el paper paracrí de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en la paret dels vasos.

3.7-Anàlegs de la vitamina D:

Alguns anàlegs de la vitamina D “poc-calcemiants” com el calcipotriol, OCT, 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ (o paricalcitol) i $1\alpha\text{-OH-D}_2$ s’han usat molt en dermatologia (tractament per la psoriasis) i pel tractament de l’hiperparatiroidisme secundari.^{151,152} La vitamina D i tots els seus metabòlits són inusualment de conformació flexible de manera que aquesta flexibilitat intrínseca dóna un gran nombre de canvis conformacionals que ocorren en milers per segon. Aquesta capacitat de mobilitat genera una ampla varietat de formes que poden disposar-se per unir-se al VDR, a la DBP i en el lloc d’unió del substrat dels enzims que metabolitzen la vitamina D amb diferents afinitats.

Per tot això, els criteris més importants que influencien el disseny dels anàlegs són: les interaccions amb el VDR, RXR i VDRE. També els enzims catalítics de la cèl·lula diana (la 24 hidroxilasa), la seva activació enzimàtica i les proteïnes d’unió a la vitamina D (la DBP).

3.7.1.- El Paricalcitol:

El 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ (Fig 10), Paricalcitol, és un anàleg de la vitamina D de tercera generació, desenvolupat el 1985, que té modificacions tant en la cadena lateral com en l’anell A. Es creu que aquestes modificacions causen una supressió efectiva de la PTH amb menys efectes calcèmics i fosfatèmics, per això, s’usa actualment com a tractament de l’HPT2¹⁵³⁻¹⁵⁶. Aquests efectes diferencials del 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ no solament es van trobar en els nivells plasmàtics de calci i fòsfor, existeixen estudis amb rates amb insuficiència renal on s’ha demostrat que el 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ no incrementa l’expressió del VDR en el intestí, contràriament a l’efecte que té la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ¹⁵⁷. També s’ha demostrat que l’efecte sobre l’os és diferent, el 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ té un efecte menor sobre l’activitat osteoclàstica i osteoblàstica que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ^{158,159}. Tots aquests resultats indueixen a pensar que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i el 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ tenen efectes diferencials sobre els òrgans diana. S’ha demostrat que calcitriol i paricalcitol tenen diferent efecte sobre la calcificació vascular. Ambdós fàrmacs són capaços de disminuir els nivells de PTH de forma similar, però el

tractament amb calcitriol produeix més calcificació vascular que el de paricalcitol.¹⁹

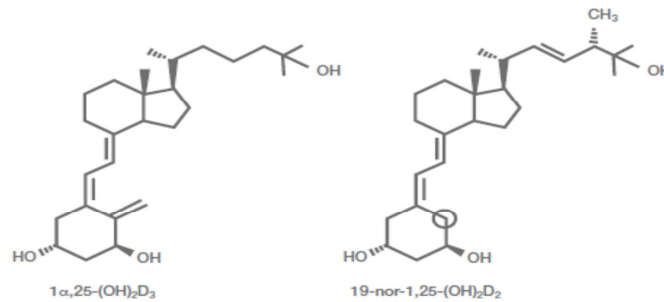


Figura 8.- Estructura de la $1,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$ i del $19\text{-nor-}1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_2$. Adaptat de Finch, Brown and Slatopolsky, 1999.

3.8.- El paper de la vitamina D en la calcificació vascular:

El descobriment que les CMLV expressen VDR, va fer pensar que la unió del metabòlit actiu de la vitamina D, $1,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$, podria tenir efectes sobre les pròpies CMLV. De fet, la $1,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$ up-regula el VDR e incrementa la càrrega de calci en les CMLV de rata en cultiu ¹⁶⁰⁻¹⁶² i d'aorta de conill. Altres estudis mostraven que concentracions de 10^{-9} M de $1,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$ induïen la proliferació de les CMLV ¹⁶³, la migració i un augment de l'expressió de l'osteopontina¹⁶⁴. També s'ha demostrat que la vitamina D induïa canvis morfològics en les CMLV d'aorta de rata, inclosa la progressió d'un fenotip contràctil a un de sintètic amb un increment de la producció de factors que promouen la calcificació *in vitro*. Aquest efecte sembla ser degut a l'estimulació de l'activitat proliferativa en aquestes cèl·lules. Cardús i col·laboradors van demostrar que el $19\text{-nor-}1,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$ induïa una menor resposta proliferativa comparada amb el $1,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$ ^{165,166}.

Jono et. al van demostrar que la $1,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$ a concentracions compreses entre 10^{-7} i 10^{-9} M induïen un increment de la calcificació dosis dependent en CMLV bobines *in vitro*. Això anava acompanyat d'un increment de l'activitat fosfatasa alcalina i una down regulació del pèptid relacionat amb la PTH (PTHrp)¹⁶⁷.

Es coneix que la vitamina D té un efecte dual sobre la calcificació vascular. Els treballs de Shroff et al. ¹⁶⁸ mostren que en pacients pediàtrics els nivells alts i baixos de calcitriol estan associats amb un augment de la calcificació vascular. Per una banda, els nivells baixos de vitamina D produeixen una down regulació dels inhibidors de la calcificació vascular (MPG, Fetuina A), com també un augment de la resposta inflamatòria, augmentant $\text{TNF}\alpha$, IL6 i disminuint IL10. Aquests dos fets afavoreixen la calcificació vascular.

Per altra banda, els nivells elevats de vitamina D produeixen un augment del producte CaXP mitjançant l'augment de l'absorció intestinal de Ca i P i també augmentant la resorció ossea. A més, també es produeix un augment dels gens promotors de la diferenciació osteoblàstica (Runx2, RANKL, BMP2) que afavoreixen la calcificació vascular. (Figura 9).

Existeixen, actualment nombrosos estudis que mostren que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ indueix la calcificació vascular en pacients amb MRC, però encara existeixen molts interrogants sobre quin és el mecanisme per el que es produeix aquesta deposició de calci en les CMLV. El seu millor coneixement proporcionaria una eina de gran utilitat a l'hora de lluitar contra l'elevada mortalitat d'aquests pacients per causes cardiovasculars.

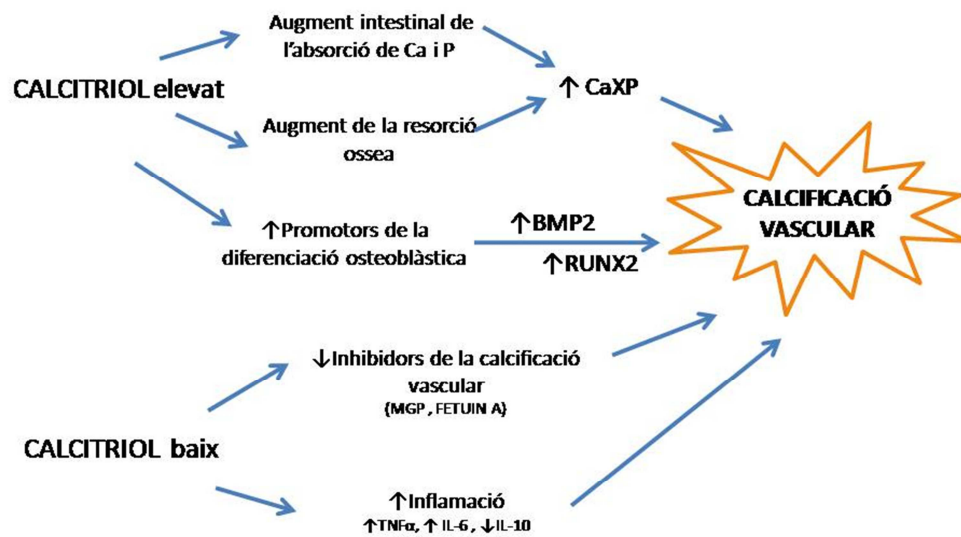


Figura 9.- Nivells de calcitriol i calcificació vascular.

3.9.- El transport de calci epitelial i la vitamina D:

3.9.1.-El transport de calci epitelial:

L'intercanvi de Ca^{2+} entre els organismes superiors i el medi es produeix a través de l'epiteli, incloent-hi: el conducte gastrointestinal, l'os i el ronyó. El transport de Ca^{2+} es produeix mitjançant el transport paracel·lular i transcel·lular. El transport paracel·lular i passiu de Ca^{2+} té lloc per les unions estretes i es conduit pel gradient electroquímico de calci. (Figura 10). El transport actiu i transcel·lular de Ca^{2+} es produeix mitjançant transportadors, els canals TRP i mitjançant el consum d'energia.

La família de proteïnes TRP (transient receptor potential protein) és un grup divers de canals de voltatge-independent i catió-permeable que s'expressen en la majoria de cèl·lules de mamífer^{169,170}. Cada proteïna TRP consisteix en sis dominis transmembrana que formen un porus entre S5 i S6, i tenen un domini amino (NH₂) i caboxi (COOH) terminal¹⁷¹⁻¹⁷³. Segons l'homologia del grup amino, els canals TRP es divideixen en set superfamílies de proteïnes^{174,175}; (Canonical, TRPC1-TRPC7), (Vanilloid, TRPV1-TRPV6), (Melastatin, TRPML1-TRPML3) i (Ankyrin, TRPA1), (Policistin, TRPP1-TRPP3), (Mucolipin, TRPML1-TRPML3 and (NOMP, no mecanopotencial). Els canals TRP tenen un paper vital en la senyalització de Ca²⁺ i proporcionen vies per que el Ca²⁺ pugui entrar. Els TRP participen en moltes funcions cel·lulars per regulació de cascades de senyalització dependents de calci. El paper funcional dels canals TRP s'ha demostrat en diferents teixits, com ara el cervell, cor, aparell respiratori, estómac, intestí, ronyó, bufeta, elements hematològics, músculs i esquelet¹⁷⁶. Alguns dels canals TRP realitzen la (re)absorció selectiva dels cations divalents com el Ca²⁺ i el Mg²⁺. Disfuncions d'aquests canals específics provoquen desequilibris en l'homeòstasi del Ca²⁺ i del Mg²⁺.

3.9.1.1- Transport de calci a l'intestí:

L'absorció intestinal de calci és un sistema de control crucial en la regulació de l'homeòstasi del calci perquè facilita l'entrada de calci de la dieta al compartiment extracel·lular. El transport actiu de calci es localitza al llarg del duodè i jejú, mentre que l'absorció paracel·lular es produeix en tot l'intestí. El transport transcel·lular de calci en l'intestí segueix els mateixos passos que en el ronyó i es pot descriure en tres etapes: l'entrada, la difusió intracel·lular, i l'extrusió. L'entrada es mediada pel transportador TRPV6. La proteïna d'unió al calci, calbindina-D9k, és responsable de la difusió intracel·lular de calci a l'enteròcit¹⁷⁷. NCX1 i PMCA1b s'expressen a la membrana basolateral dels enteròcits¹⁷⁸ i són els responsables de l'extrusió del calci cap a la sang.

Estudis recents mostren l'expressió de TRPV5 i TRPV6 en el tracte gastrointestinal. TRPV5 s'expressa en el duodè i en el jejú, i TRPV6 que es troba més expressat es localitza al duodè, jejú i al cec on colocalitza amb la calbindina-D9k i amb PMCA1b.¹⁷⁹ La caracterització del ratolí knockout per TRPV5, mostra una hiperabsorció de calci, probablement mediada per l'increment de TRPV6 i la calbindina-D9k, fet que també mostra la importància del paper de la TRPV6 com a mediador transcel·lular de l'entrada de calci des del lúmen intestinal.¹⁸⁰

Introducció

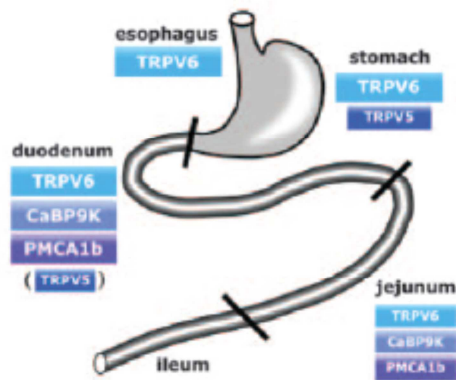


Figura 10.- Localització dels transportadors de calci al llarg de l'intestí prim.

3.9.1.2.- Transport de calci al ronyó:

La nefrona és la unitat funcional del ronyó i està formada per un corpuscle renal en comunicació amb un túbul renal. El corpuscle renal de Malpighi és una estructura esferoïdal constituïda per la càpsula de Bowman i un conjunt de capil·lars que conté en el seu interior anomenat glomèrul. Els túbuls renals comencen pel túbul proximal (PT), seguidament l'ansa de Henle, el túbul contornejat distal (DCT), el túbul connector (CNT) i finalitzant amb el conducte col·lector (CD). Recentment, diferents subfamílies de canals TRP incloent-hi els TRPC, TRPV, TRPM i TRPP s'han descrit en diferents parts de la nefrona (Figura 11).¹⁸¹

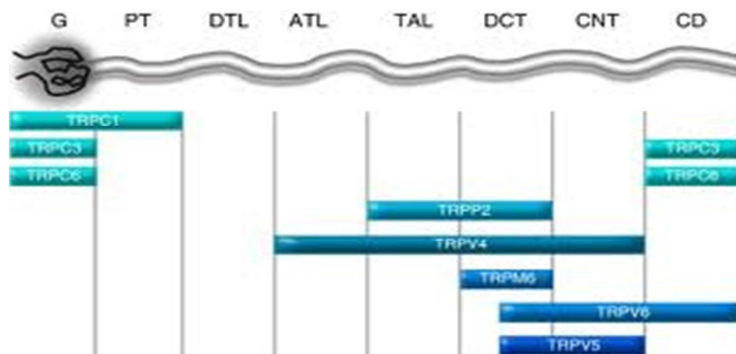


Figura 11.-Distribució dels canals TRP al llarg de la nefrona. Abreviatures: G, glomèrul; PT, túbul proximal; DTL, extremitat prima descendent; ATL, extremitat prima ascendent; TAL, extremitat gruixuda ascendent; DCT, túbul contornejat distal; CNT, túbul connector; CD, conducte col·lector.

Estudis recents en rata han trobat que TRPC1 s'expressa en glomèrul i co-localitza amb aquaporina-1 en PT i en DTL, mentre que TRPC3 i TRPC6 es troben en el glomèrul i es co-exprésen amb aquaporina-2 en cèl·lules de CD ¹⁸². La part distal de la nefrona és la responsable de la reabsorció de Ca^{2+} i Mg^{2+} en el ronyó ¹⁸³. TRPV5, un canal altament selectiu pel Ca^{2+} va ser el primer canal TRP que es va descobrir en el ronyó ¹⁸⁴ i es considera com el

Introducció

“gatekeeper” de la reabsorció activa del Ca^{2+} en el ronyó. TRPV6 està també expressat en DCT, CNT i CD (cortical i medul·lar) ¹⁸⁵.

La identificació i caracterització del canal de calci epitelial TRPV5 pel grup de Bindels l'any 1999, dóna a conèixer el mecanisme molecular d'absorció renal activa de Ca^{2+} .¹⁸⁶

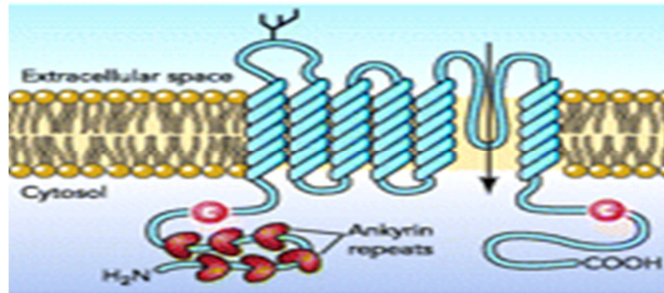


Figura 12.- El TRPV5 conté sis dominis transmembrana i una unitat formadora de porus entre TM5 i TM6.

Sis repeticions d'ankirina i un lloc de fosforilació per proteïna quinasa C, present en el amino terminal. A més el canal és glicosilat en posició N358 entre TM1 i TM2.

Estudis electrofisiològics del TRPV5 van revelar característiques distintives del seu paper com a canal apical de Ca^{2+} que controla el transport transcel·lular de Ca^{2+} ¹⁸⁷. Per immunofluorescència es va veure que el TRPV5 era abundant al llarg de la membrana apical de la majoria de cèl·lules de la part distal de la nefrona; DCT, CNT and CD ¹⁸⁸, on colocalitza amb proteïnes transportadores de Ca^{2+} , incloent-hi la calbindina-D28k, intercanviador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX1), i la Ca^{2+} -ATPasa (PMCa1b).

Actualment la reabsorció activa de Ca^{2+} a la part distal de la nefrona es divideix en tres etapes:

- 1.-Mitjançant una força favorable electroquímica el Ca^{2+} entra a la cèl·lula pel canal de Ca^{2+} TRPV5.
- 2.- A la cèl·lula, la calbindina-D28k s'uneix al Ca^{2+} i facilita la seva difusió des de la part apical fins al compartiment basolateral.
- 3.-Finalment, el Ca^{2+} es transportat a través de la membrana basolateral pel NCX1 i PMCa1b per tornar a entrar a la sang (Figura 13).

Introducció

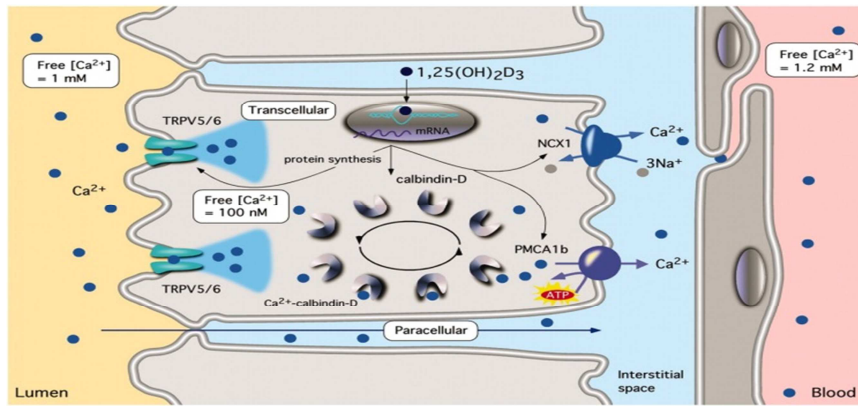


Figura 13.- Transport transcel·lular de Ca^{2+} a través del DCT i CNT. El flux apical de Ca^{2+} es mediat per TRPV5 al túbul contornejat distal i al tubul connector. Després el Ca^{2+} difón per la membrana basolateral mitjançant proteïnes d'unió al calci, calbindina-D28k. L'extrusió cap a la sang es fa pel intercanviador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX1) i per la Ca^{2+} -ATPase (PMCA1b).

3.9.2.- Mecanismes reguladors del TRPV5:

El TRPV5 es sintetitza al reticle endoplasmàtic i després es transportat a la membrana plasmàtica. L'expressió del TRPV5 es controla per quatre mecanismes diferents:

- 1.- Regulació transcripcional i traduccional per hormones calciotròpiques; vitamina D, PTH, calcitonina, calci de la dieta, acidosis i alcalosis, estrògen, andrògen.
- 2.- Alteració de l'activitat dels canals per factors extracel·lulars i intracel·lulars; PTH, Ca^{2+} intracel·lular, protons intracel·lulars i extracel·lulars, 80K-H.
- 3.- Tràfic intracel·lular i regulació de la ruta a la membrana plasmàtica per proteïnes associades; S100A 10-annexina 2, Rab11a, clatrina i caveolina, WNK3 i WNK4.
- 4.- Regulació del reciclatge del canal per Ca^{2+} i hormones específiques. Kallikreina, Klotho.

Alguns dels reguladors són:

3.9.2.1-L'hormona paratiroide (PTH):

L'hormona paratiroide és un dels reguladors més importants de l'homeòstasi del Ca^{2+} . La secreció de PTH de la glàndula paratiroide s'estimula per fluctuacions dels nivells de Ca^{2+} en la sang mitjançant el receptor sensible al Ca^{2+} (CaSR).

Després de la seva secreció per la glàndula paratiroide, la PTH es tallada en dos fragments. L'extrem N-terminal, és la part funcional que s'uneix amb alta afinitat al receptor de la PTH (PTHr) a la membrana plasmàtica de les cèl·lules diana on activa la proteïna G (Gs) acoblada a l'adenilat ciclase per augmentar els nivells intracel·lulars d'AMP cíclic (AMPc). Hoenderop et al. van demostrar que la PTH activa la cascada de senyalització cAMP-PKA, la qual fosforila ràpidament la treonina 709 del TRPV5, augmentant la probabilitat d'obertura del canal i promovent la reabsorció de Ca^{2+} de la part distal de la nefrona.¹⁸⁹

En el ronyó el PTHr s'ha detectat en el DCT2 i en CNT, que es relaciona amb la distribució de l'AMPc estimulada per la PTH. A més, s'ha vist que la PTH augmenta la reabsorció de Ca^{2+} en aquest segment sense afectar el voltatge transepitelial, suggerint una reabsorció activa de Ca^{2+} en la part distal de la nefrona que pot estar regulada per la PTH¹⁹⁰.

Les molècules diana implicades en la reabsorció activa de Ca^{2+} mediada per PTH no eren conegudes fins al descobriment del TRPV5. Van Abel et al. va investigar el mecanisme molecular dels transportadors de Ca^{2+} mediats per PTH en rates amb paratiroidectomia.

La paratiroidectomia reduïa l'expressió de TRPV5, calbindinaD28k i NCX1 en el ronyó. La disminució de l'expressió dels transportadors de Ca^{2+} produeix una disminució de la reabsorció activa de Ca^{2+} i per tant, hipocalcèmia¹⁹¹. Després de la suplementació amb PTH, l'expressió dels transportadors de Ca^{2+} com també la concentració de Ca^{2+} en la membrana es normalitzen en aquestes rates que han estat paratiroidectomitzades.

3.9.2.2.- Calci de la dieta:

S'ha demostrat que el contingut de Ca^{2+} en la dieta també pot afectar el transport renal de Ca^{2+} . Per poder estudiar l'efecte directe del Ca^{2+} de forma independent als nivells de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ s'han utilitzat ratolins KO pel VDR i per la $1\alpha\text{OHasa}$ i han estat alimentats amb dieta normal i dieta alta en Ca^{2+} . Una dieta amb un elevat suplement de Ca^{2+} normalitza els nivells de Ca^{2+} en plasma, restaura els nivells d'expressió de TRPV5 en ronyó i els nivells de TRPV6 en el duodè en ratolins $1\alpha\text{OHasa} (-/-)$ ²⁰². A més, Dardenne et al, demostren que una dieta de rescat suplementada amb Ca^{2+} en ratolins $1\alpha\text{OHasa} -/-$ rescata parcialment el fenotip ossi de VDDR¹⁹². Per contra una dieta suplementada amb Ca^{2+} , reduïa l'expressió renal de TRPV5 i calbindina-D28k en una camada de ratolins wild type per un mecanisme de *feedback* negatiu, mentre que aquests ratolins exhibien uns nivells normals de vitamina D i Ca^{2+} en

sèrum. De forma similar, alimentant amb una dieta elevada en Ca^{2+} als ratolins VDR $-/-$ es restablia la hipocalcèmia i es sobre-regulaven els nivells baixos de TRPV6 duodenals, mentre que en ratolins wild type la dieta alta en Ca^{2+} disminuïa l'expressió de TRPV6 degut a una supressió dels nivells de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en sèrum.

Aquests estudis demostren que suplementes de Ca^{2+} poden sobreexpressar els nivells de TRPV5/6 de forma independent als nivells de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

3.9.2.3- La vitamina D:

El ronyó és l'òrgan diana principal de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i la co-expressió del VDR amb el TRPV5 a la part distal de la nefrona, suggereix que la vitamina D està implicada en el mecanisme renal de reabsorció de calci per la regulació de la transcripció del TRPV5. L'evidència inicial que demostra que el TRPV5 està regulat per la vitamina D es va observar en rates alimentades amb una dieta amb dèficit de vitamina D¹⁹³, que es caracteritzaven per una disminució significativa dels nivells de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i de l'expressió de TRPV5. L'administració posterior de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ va resultar en una normalització dels nivells de Ca^{2+} i una sobreexpressió de TRPV5. En conseqüència, l'administració de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en ratolins augmenta els nivells d'expressió de TRPV5, TRPV6, calbindina-D9k en el duodè i en el ronyó. El impacte de la vitamina D en la regulació transcripcional del TRPV5 ha estat posteriorment estudiada per mitjà d'una deleció del gen que codifica per la $1\alpha\text{OHasa}$ i el VDR, que ens han proporcionat models de ratolí útils de la malaltia humana hereditària, raquitisme dependent de vitamina D tipus I (VDDR I) i tipus II (VDDR II), respectivament.

Hoenderop i col·laboradors van demostrar que l'expressió de TRPV5 renal com també la de TRPV6 intestinal disminuïen en els ratolins KO per $1\alpha\text{OHasa}$ ($1\alpha\text{OHasa} -/-$), comparat amb els wild type¹⁹⁴. Aquests efectes es veuen acompanyats per una disminució dels nivells de calbindina-D28k, calbindina-D9k i NCX1. Suplementes amb $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ restablien els nivells dels transportadors de calci, resultant amb una normalització dels nivells de Ca^{2+} en sèrum. Per altra banda, el TRPV5 renal i el TRPV5/TRPV6 del duodè estava reduït en el model de ratolí knockout per VDR¹⁹⁵.

Aquets resultats indiquen que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ exerceix la seva capacitat calciotròpica augmentant l'expressió de TRPV5 i això estimula eficientment la reabsorció renal de Ca^{2+} .

No obstant, el mecanisme molecular detallat implicat en la regulació genòmica i no genòmica del TRPV5 per la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ no ha estat encara investigat. En l'estudi del promotor del TRPV5 es van trobar diversos VDREs localitzats *upstream* del codó parada, suggerint que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ podria afavorir la transcripció de TRPV5 per la unió del complex VDR-RXR al VDREs¹⁹⁶.

3.9.2.3.1-TRPV5 i anàlegs de la vitamina D:

L'hiperparatiroidisme secundari (HPT2), és un trastorn freqüent en malalts renals crònics, que es desenvolupa en resposta a uns nivells baixos de Ca^{2+} plasmàtics i de vitamina D activa. HPT2 requereix de tractament per minimitzar els efectes de la PTH sobre l'os i altres teixits¹⁹⁷. La vitamina D ha estat àmpliament utilitzada pel tractament d'aquests trastorns i diferents anàlegs han estat utilitzats en la pràctica clínica¹⁹⁸. La 1α -hidroxivitamina D_2 ($1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$) és un profàrmac de la vitamina D menys calcemiant que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en estudis amb animals, la qual s'ha de metabolitzar per ser activa¹⁹⁹. $1\alpha,24$ -dihidroxivitamina D_2 ($1,24(\text{OH})_2\text{D}_3$) és un metabòlit actiu de $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ amb un efecte calcèmic inferior en comparació amb la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ^{200,201}. Els ratolins KO per la 1α hidroxilasa van ser utilitzats per l'estudi de l'activitat de diferents compostos de vitamina D; $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$, $24(\text{OH})_2\text{D}_3$ en els nivells de Ca^{2+} en sèrum i en l'expressió de gens transportadors de Ca^{2+} . Els tres compostos van poder augmentar els nivells de calci en sèrum, tot i que en diferent mesura, reflectint la seva farmacocinètica individual, així també augmentaven els nivells de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. De forma interessant, els nivells de mRNA de TRPV5 i TRPV6 augmentaven al duodè de forma paral·lela als nivells de Ca^{2+} en sèrum.

Els efectes dels diferents compostos en la regulació dels canals transportadors de Ca^{2+} en el ronyó van ser més diversos, de manera que $1,24(\text{OH})_2\text{D}_2$ no va sobre-expressar TRPV5²⁰². No obstant, l'ús de compostos com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ha estat freqüentment acompanyat per efectes no desitjables d'hipercalcèmia i hiperfosfatèmia mitjançant la hiperabsorció intestinal, la qual cosa augmenta el risc de calcificació de teixits tous.

3.9.3.- Klotho, TRPV5 i la calcificació urèmica:

Klotho, és una proteïna de membrana tipus-I (single pass), es troba expressada predominantment en el ronyó, especialment en DCT2/CNT. El klotho transmembranar forma un complex amb el receptor de creixement fibroblàstic (FGFR) i funciona com a co-receptor

Introducció

pel factor de creixement fibroblàstic 23 (FGF23) i juga un paper crucial en la regulació del fòsfor i el metabolisme de la vitamina D en ronyó²⁰³. (Figura 14)

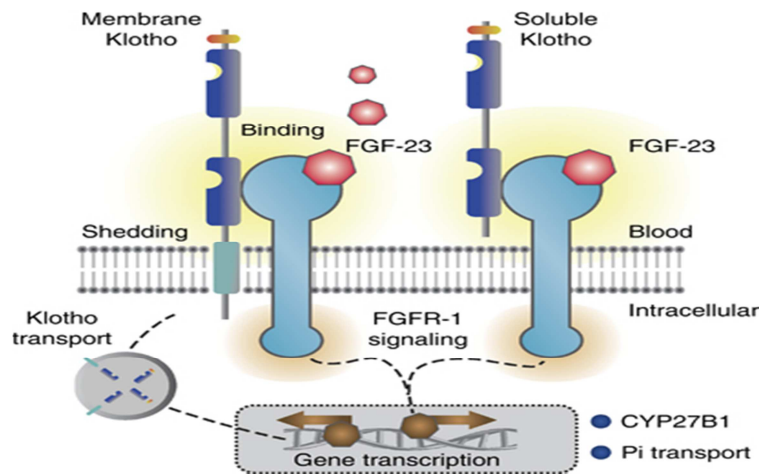


Figura 14.- El receptor del factor de creixement fibroblàstic FGF23. En blau cel, el receptor tipus-1 del FGF (FGFR-1). En blau fosc, esquerra, klotho unit a la membrana; a la dreta klotho soluble. Hexàgons vermells FGF-23. La transducció de senyal per FGF-23 s'estableix quan klotho i FGFR-1 colocalitzen (part esquerra). No es coneix si la transducció de la senyal es pot donar pel Klotho soluble (part dreta). En el ronyó, la senyal porta a una regulació a la baixa de CYP27B1 i la recuperació dels transportadors de fòsfor en el túbul proximal.

La malaltia renal crònica (MRC) es caracteritza per hiperfosfatèmia, hipocalcèmia i HPT²⁰⁴. La desregulació del fòsfor (Pi), Ca²⁺ i la PTH produeix complicacions catastròfiques en pacients amb MRC.

El manteniment del Ca²⁺ i del Pi és primordial per a prevenir la progressió de la malaltia renal, desenvolupar l'HPT2, generar malaltia òsea urèmica i problemes cardiovasculars. Recentment, el descobriment del gen Klotho, predominantment expressat en ronyó, s'ha trobat implicat en el desenvolupament de l'envelliment humà²⁰⁵. Els ratolins amb klotho mutat mostren una disminució de la durada de la seva vida, disminució d'activitat, infertilitat, osteoporosis, atròfia de la pell, metabolisme anormal del Ca²⁺ i de la 1,25(OH)₂D₃, hiperfosfatèmia i calcificació vascular. És interessant que algunes de les característiques dels malalts renals s'assemblen al fenotip del ratolí KO per Klotho i la disminució de la producció de Klotho s'ha trobat en pacients urèmics²⁰⁶. A més a més, Chang et al. va trobar que klotho posseïa activitat glucoronidasa i colocalitzava amb TRPV5 en el DCT²⁰⁷. Klotho pot hidrolitzar el residu extracel·lular de TRPV5, que contribueix en l'atrapament del TRPV5 a la membrana plasmàtica i d'aquesta manera augmenta la reabsorció de Ca²⁺. Un altre estudi realitzat per Segawa et al. demostrava que l'hiperfosfatèmia en ratolins Klotho -/- era causada per la

Introducció

desregulació de l'expressió i el tràfic de transportadors renals Na/Pi IIa/IIc, enlloc de l'absorció de Na/Pi IIb intestinal ²⁰⁸. Aquests fets mostren que klotho regula TRPV5 i els transportadors Na/Pi, les dues proteïnes més importants del transport de Ca^{2+} i Pi en el ronyó, respectivament. Això fa especular que klotho està implicat en la patogènesis de les anomalies de Ca^{2+} i Pi en malalts renals influenciant l'expressió de TRPV5 i Na/Pi. Chang et al. van demostrar que la presència extracel·lular de klotho augmentava significativament l'activitat de TRPV5 en cèl·lules CNT de cultiu primari de conill ²⁰⁹.

OBJECTIUS

Objectius

La MRC, és una patologia complexa amb diverses conseqüències: la toxicitat urèmica, l'hiperfosfatèmia, l'hiperparatiroidisme secundari i les malalties cardiovasculars, entre les quals cal destacar les calcificacions vasculares. Per tal de conèixer quins mecanismes poden afavorir la calcificació vascular i com és la seva regulació en els pacients amb malaltia renal, els nostres objectius són:

OBJECTIUS:

- 1.- ESTUDIAR L'EFECTE DEL TRACTAMENT AMB VITAMINA D ACTIVA EN LA REGULACIÓ DE GENS IMPLICATS EN EL METABOLIME DE LA VITAMINA D EN LA URÈMIA.
- 2.- ANALITZAR L'EFECTE DE LA SINTESIS LOCAL DE CALCITRIOL PER LA 1 α HIDROXILASA I LA SEVA IMPLICACIÓ EN LA CALCIFICACIÓ VASCULAR EN LA URÈMIA.
- 3.- CONÈIXER L'EFECTE DIRECTE DE LA 25HIDROXIVITAMINAD EN LA REGULACIÓ DE GENS I DEL METABOLISME MINERAL EN LA URÈMIA I SOBRE LA CALCIFICACIÓ VASCULAR.

MATERIALS I MÈTODES

MATERIALS I MÈTODES

1.- EXPERIMENTACIÓ IN VITRO:

Per realitzar els nostres estudis *in vitro* vam fer un cultiu cel·lular de cèl·lules de múscul llis vascular (CMLV).

1.1.-Cultiu de CMLV:

Les cèl·lules de múscul llis vascular (CMLV) van ser obtingudes a partir de ratolins WT i 1α hidroxilasa KO mitjançant el cultiu d'explants, com està prèviament descrit.²¹⁰

Els ratolins van ser anestesiats amb isoflorà administrat juntament amb oxigen, posteriorment se'n va extreure l'artèria aòrtica i es va posar amb PBS (tampó fosfat salí estèril) en gel. El procediment posterior es va realitzar a la campana de flux laminar en condicions d'esterilitat. L'artèria es va rentar amb PBS i es va netejar de la resta de vasos, es va tallar amb petits fragments ($< 1\text{mm}^3$) i es va dipositar sobre una placa de 6 pous la qual va estar prèviament coberta per fibronectina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Els explants es van mantenir amb DMEM suplementat amb un 20% v/v de FBS (sèrum fetal boví inactivat per alta temperatura), 2mM de Glutamina, penicilina 100U/ml, i estreptomicina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en una atmosfera humida a 37°C amb 5% CO₂. Després de dues setmanes les cèl·lules ja van començar a migrar per la placa, quan aquesta va estar confluent es va procedir a la tripsinització, recollida de cèl·lules i es van plantar en una placa més gran (60 mm). En aquest punt ja tenim el nostre cultiu primari per poder-lo utilitzar.

Les CMLV es van caracteritzar per la seva morfologia en confluència ("hill and valley pattern") i per la detecció de la presència d' α -actina del múscul llis mitjançant immunohistoquímica.

1.1.1.-Immunohistoquímica de fluorescència per l' α -actina del múscul llis:

Per poder confirmar l'origen de les cèl·lules de múscul llis vascular (CMLV) del nostre cultiu primari, vam plantar les nostres cèl·lules en plaques de 6 pous. Quan les cèl·lules estaven a un 80% de confluència es van rentar amb DMEM sense FBS i amb 1ml de medi ICT, que contenia insulina i transferrina (100x GIBCO, cat num. 41400), suplementat amb 0,25mM d'àcid ascòrbic i amb 0,01nM de FeCl₃. Les cèl·lules es van deixar créixer durant tres dies amb aquest medi, a continuació les cèl·lules es van rentar tres cops amb PBS, es van fixar amb 100% metanol fred durant 15 minuts a 4°C i es van rentar amb PBS fred.

Materials i mètodes

Les cèl·lules fixades es van incubar amb solució de bloqueig (4% de FBS en PBS) durant 1 hora a temperatura ambient en un agitador. Després de fer un rentat amb PBS, es va afegir l'anticòs primari monoclonal per α -actina de múscul llis, anticòs conjugat amb fosfatasa alcalina (SIGMA, Cat, No A5691) diluït 1:50 en solució de bloqueig durant 1 hora. Per tenir un control negatiu alguns dels pous es van incubar únicament amb solució de bloqueig. A continuació els pous es van rentar 3 cops amb PBS fred i es va afegir l'anticòs secundari fluorescent (rabbit anti- mouse) a una dilució 1:200 incubant-ho durant 1 hora a temperatura ambient. Després de l'últim rentat es va afegir 50 μ l d'SlowFade component A (Molecular Probes, cat. Nº S7461) juntament amb colorant Hoechst 33258 (0,5 μ g/ml), es va cobrir amb cobreobjectes i es va visualitzar en un microscopi de fluorescència.

1.1.2.-Manteniment del cultiu primari CMLV:

Les CMLV s'han de dividir quant estan confluents, realitzant-ne passes. S'extreu el medi de cultiu i es renten les cèl·lules amb PBS, després s'hi afegeix solució de tripsina/EDTA. Es deixen durant 5 minuts dins l'incubador perquè les cèl·lules es desenganxin de la superfície de la placa. Es recull la tripsina amb les cèl·lules i es fa un rentat amb medi DMEM, que conté 10% de FBS, les cèl·lules es subcultiven 1:4 en plaques de 100 mm.

1.1.3.-Congelació, emmagatzematge i descongelació de CMLV:

Per congelar, les CMLV són tripsinitzades, es centrifuguen i es resuspenen en medi fred que conté 0,1 ml de DMSO amb 0,9ml de FBS per vial. La suspensió cel·lular es posa en criotubs, primer es congelen durant 3 dies a -80°C i després per mantenir-les més temps es posen en nitrogen líquid (-196°C). Per descongelar les cèl·lules, s'escalfen a 37°C i es dissolen immediatament en medi de cultiu precalentat. Després de la centrifugació, les cèl·lules es resuspenen en medi de cultiu i es planten en plaques de 100mm.

1.2.-Experiments de calcificació en cèl·lules de múscul llis vascular:

Un cop obtingut el cultiu primari es van dividir les cèl·lules per obtenir-ne el nombre de plaques necessàries per poder fer l'experiment, es van utilitzar cèl·lules des del passatge 2 fins al 8 i el medi de cultiu es canviava cada 2-3 dies amb DMEM al 10% amb sèrum fetal boví. Es va iniciar l'experiment de calcificació quan les cèl·lules estaven en un 70%-80% de confluència. Per aquest procés necessitem un medi especial: Medi amb fòsfor elevat (DMEM amb glucosa alta, piruvat de sodi (10%), FBS (15%), penicil·lina, estreptomicina i BGP 10 mM). Les plaques

Materials i mètodes

control contenen únicament medi calcificant mentre que la resta de plaques han de tenir el tractament corresponent: Calcitriol o 25(OH)D₃ o bé tractament amb sèrum normal o sèrum urèmic, el qual substitueix el FBS del Medi amb fòsfor elevat. El canvi de medi es va realitzar el tercer dia i el sisè es van recollir les mostres.

1.2.1.- Quantificació química de calci en CMLV:

Per recollir les mostres es van rentar les plaques dues vegades amb PBS, es va afegir 1ml de PBS a cada una de les plaques i es va rascar per agafar les cèl·lules i dipositar-les en un eppendorf nou. Després es varen centrifugar a unes 10000 rpm durant 5 minuts, es va extreure el sobrenedant i el pel·let es va resuspendre amb ajuda del vòrtex amb 50 µl de HCl 0,6 N. Es van deixar les mostres en vòrtex tota la nit i l'endemà es van centrifugar de nou, el sobrenedant obtingut es va utilitzar per quantificar calci mitjançant el mètode de la o-cresolftaleïna complexona mentre que el pelet es va resuspendre amb tampó de lisis per quantificar-ne la seva concentració mitjançant el mètode de Lowry.

1.2.2.-Tinció de vermell d'alizarina en CMLV:

Les cèl·lules es planten en pous de 24 i es tracten amb diferents condicions, control negatiu, medi DMEM sense fòsfor elevat.

Les CMLV es renten amb PBS 1x un sol cop, a continuació es fixen amb formalina (10%) durant 30 minuts. Després, es renten amb aigua destil·lada i es posa el reactiu de vermell d'alizarina (Alizarin red S solution, Sigma.A3757. preparat: 2 g Alizarin red en 100ml d'aigua destil·lada mix i ajustar el pH a 4,1-4,3, revisar sempre el pH) durant 1 hora. A continuació es renta 3 cops amb aigua MQ i es deixa secar. (Figura 15).

S'observa:

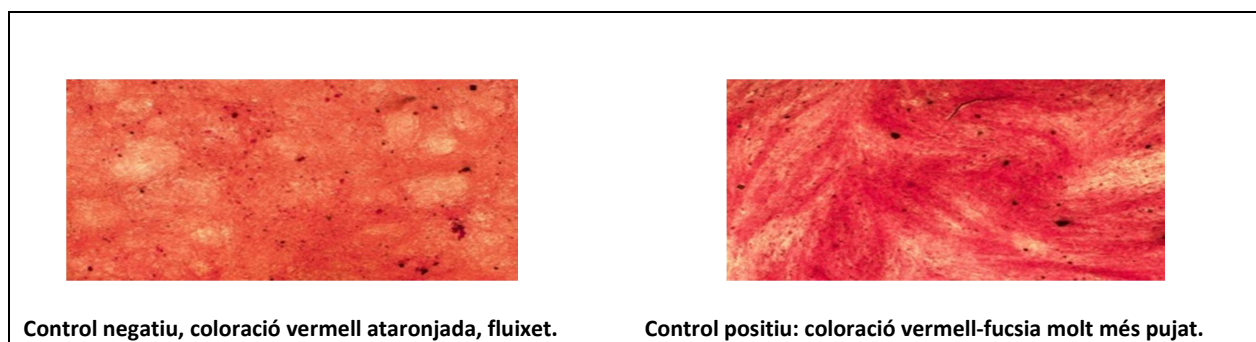


Figura 15.- Tinció de CMLV amb vermell d'alizarina.

1.3.- Cultiu de cèl·lules Tubulars renals (CTR):

Per realitzar aquest cultiu primari es requereix :

- Solució A (1litre) PH 7,05
- ½ de solA (filtrada)
- ½ sol A oxigenada (filtrada)

Per obtenir aquestes cèl·lules primer, s'han d'extreure els ronyons de la rata, prèviament perfundits amb PBS 1X i solució A oxigenada. Després sota campana s'extreu la capa més externa del ronyó, el còrtex, que es on estan les nostres cèl·lules. El còrtex es tritura a trossets com una papilla. S'incuba en una placa de petri amb 5 ml de la solució de col·lagenasa i amb la solució A (90 mg de Col·lagenasa tipus II + 45 ml de sol A). A 37°C (estufa) durant 15 minuts.

A continuació es filtra tot, primer per un filtre de 100 µm de diàmetre després pel de 40µm. Es recull el filtrat en un falcon i s'afeixeixen 20 ml de solució A amb FBS (3,5 ml FBS + 16,5 ml solució A). Es centrifuga a 4000 rpm 2 min i es resuspèn el pellet amb medi (DMEM/F12). Posteriorment, es fan dos rentats i es resuspèn el pellet amb 15 ml del medi (fred): DMEM/F12 +BSA i es deixa 20 min en gel (0,5 g BSA + 15 ml DMEM/F12). Després, es fan dos rentats més amb DMEM/F12.

Finalment, el pellet que tenim el resuspenem amb 1ml de medi HK i ho plantem en una placa.

1.4.-Extracció d'RNA en cèl·lules:

Per poder determinar l'expressió de gens en el cultiu de cèl·lules de múscul llis vascular (CMLV), les cèl·lules van créixer en plaques de 6 pous i allí van rebre els seu tractament. Seguidament vam llisar les cèl·lules amb 500 µl de Trizol (Invitrogen, cat. Nº 15596-018) per pou, vam rascar els pouets i en vam recollir les cèl·lules.

Per poder extreure l'RNA del teixit, vam posar el troç de teixit en 500 µl o 1 ml de trizol i vam homogeneïtzar-ho mitjançant l'ús de politró o de pestle, depenent del teixit utilitzat. A continuació vam seguir el protocol següent tant en cèl·lules com en teixit:

Vam incubar durant 5 minuts amb Trizol, vam afegir 100µl de cloroform (en 500µl de trizol utilitzat inicialment) per cada mostra. Les mostres es van centrifugar a 12000 xg durant 15 minuts a 4°C, el RNA total quedava separat a la part superior en una fase aquosa i transparent

separada de les restes cel·lulars. Aquesta fase transparent que contenia l'RNA que es va transferir en un tub nou, seguidament es va afegir 250 µl d'isopropanol (en 500µl de trizol) per fer precipitar l'RNA.

Les mostres es varen incubar 10 minuts a temperatura ambient i es van centrifugar a 12.000 x g durant aquets 10 minuts i a 4°C. Seguidament el pelet d'RNA obtingut es va rentar amb 500 µl de 75% etanol (en 500µl de trizol), es va vortejar i es va centrifugar a 9500 xg durant 10 minuts i a 4°C. Es va decantar el sobrenedant i el pelet es va deixar assecar a l'aire durant 15 minuts. Finalment, l'RNA es va resuspendre amb aigua tractada amb DEPC (dietil pirocarbonat) o aigua lliure d'RNAases. Les mostres es van guardar a -80°C.

Per quantificar-ne la concentració es va utilitzar un espectrofotòmetre (Nanodrop, Thermo Scientific), la lectura es va realitzar a 260nm i es va determinar la relació d'absorbància entre 260/280 per determinar-ne la seva puresa (valors adequats: 1,8 -2.0).

1.5.-Síntesis del cDNA:

La transcripció inversa es va realitzar mitjançant "1st strand DNA synthesis kit per RT-PCR (AMV)" de Roche Diagnostics, cat Nº 11483188001). 1µg d'RNA es va utilitzar per fer la reacció juntament amb la mix corresponent, les mostres es van posar en el termociclador (TC-412, Techne, Cambridge, Ltd) 1 hora a 42°C i seguidament a 99°C durant 5 minuts per tal d'inactivar l'enzim. El cDNA obtingut es va utilitzar com a template per la PCR a temps real.

1.6.-PCR a temps real.

El mètode de Taqman, és el que es va utilitzar per poder determinar l'expressió de mRNA relativa de diferents gens. La reacció consistia en Taqman PCR Mastermix Universal (Applied Biosystems, 4324018), primers específics ja preparats i aigua. Els primers utilitzats van ser comprats directament a l'empresa Applied Biosystems (Taula 5). Com a gen control es va utilitzar el gliceraldehid-3-phosphat deshidrogenasa (GAPDH), ja que l'expressió d'aquest gen no es veu alterada per la vitamina D i s'utilitza habitualment com a control en molts estudis.

La RTPCR es va realitzar en el sistema de detecció ABI Prism 7000 (Applied Biosystems). La quantificació relativa de RNA es va a partir del delta Ct.

Taula de primers:

	Nom	Espècie	Seq. ref	Mida amplió
Mm00437297_m1	VDR	ratolí	NM_009504.4	95
Mm99999915_g1	GAPDH	Ratolí	NM_008084.2	107
Mm01165918_g1	1 α hidroxilasa	Ratolí	NM_010009.2	73
Mm00487244_m1	24hidroxilasa	Ratolí	NM_009996.3	99
Mm00501584_m1	Runx2	Ratolí	Mm391013	91
Rn00566976_m1	VDR	Rata	NM_017058.1	75
Rn99999916_g1	GAPDH	Rata	NM_017008.3	87
Rn00587137_m1	1 α hidroxilasa	Rata	NM_053763.1	70
Rn01423142_g1	24hidroxilasa	Rata	NM_201635.2	80

Taula 5.- Primers utilitzats en la RTPCR d'Applied Biosystems.

1.7.- Anàlisi de proteïna.

1.7.1.- Solucions:

Tampó de lisis: 2% SDS, 125mM TRIS, pH6,8. Abans del seu ús per cada 1 ml de tampó 5 μ l de còctel inhibidor de proteïnes (PIC, SIGMA, cat. N^o P8340) i 10 μ l de 1mM de fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF, SIGMA, cat. N^o P7626), dissolt en 100% etanol.

5x Tampó de mostra SDS: 50mM TRIS-HCL (pH 6,8), 2% SDS, 10% glicerol, 144 mM de β -mercaptoetanol, 0,1% de bromofenol blau.

TRIS-HCL: 0,12g TRIS es van dissoldre en 20 ml de 0,9% NaCl, i el pH es va ajustar a 8,8 o 6,8 amb 5% de HCl.

Tampó d'electroforesis: 1,92M glicina, 250mM TRIS, 10% SDS, pH 8,3.

Tampó de transferència (10 x): 1.92M glicina, 250 mM TRIS. En el moment del seu ús, s'utilitza al 1x amb un 10% de metanol.

Materials i mètodes

20x TBST: 146,1g NaCl, 48,44g TRIS i H₂O fina a 1L, pH 7,4; En el moment del seu ús es prepara 1L de solució al 1x de TBS i 1ml de Tween20 es afegit.

Solució d'Stripping: 0,2M de glicina, pH 2,5.

Gels de poliacrilamida:30% Acrilamida/Bis 29:1, kit colorimètric per a la detecció de proteïnes, BioRad. (Taula 6):

	Gel separador			Gel concentrador	
	16%	12%	10%	5%	4%
Acri: Bis 30%-0,8%	4	3,2	2,6	0,845	0,163
1,5 M TRIS-HCl pH8,8 ml	2	2	2	-	-
0,5M TRIS-HCl pH 6,8ml	-	-	-	1,25	0,313
10% SDS, ml	0,081	0,081	0,08	0,1	0,0125
10%APS, ml	0,081	0,081	0,08	0,1	0,0125
TEMED, ml	0,00325	0,00325	0,008	0,01	0,0025
H ₂ O, ml	1,86	2,65	3,28	2,86	0,76
Interval lineal de separació	50-10	200-20	200-25		

Taula 6.- Gels utilitzats per western blot.

1.7.2.- Extracció de proteïna:

Els extractes cel·lulars es recullen amb tampó de lisis, suplementat amb PIC i PMSF. Seguidament s'ultrasonica la mostra tres cops durant 8" (Sonicador digital, model 450, Branson). Les restes insolubles es separen centrifugant la mostra a 4°C durant 10 minuts a 10.000 rpm, el sobrenedant es recull i es guarda a -20°C. La concentració de proteïna es quantifica pel mètode de Lowry (DC protein assay, BioRad).

1.7.3.- Western blot:

Per l'anàlisi de western blot (WB), 20-25µg del total de proteïna per pou són utilitzats. Després de bullir 5 minuts la mostra amb el tampó de mostra, les proteïnes es separen en un

Materials i mètodes

gel d'electroforesis de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) sota condicions reductores. Alhora es carrega al gel un marcador de pes molecular (Invitrogen) que correrà paral·lelament en el gel.

Després de córrer el gel, les proteïnes separades són transferides a una membrana de fluorur de polivinilidè (Immobilion-P membrana de transferència, Millipore) durant una hora a 70V. El bloqueig d'unions inespecífiques es realitza posant la membrana durant 1h en solució al 3% de llet en pols en tampó salí TRIS amb 0,1% de Tween20 (TBST).

A continuació les membranes s'incuben amb l'anticòs primari tota la nit a 4°C, després es fan rentats amb TBST, i s'incuben amb l'anticòs secundari conjugat amb peroxidasa. La unió es detectada amb el kit de detecció ECL Advance (Amerham Biosciences) o el EZ-ECL detecció quimioluminiscent per HRP (Biological industries). Les membranes s'observen en un sistema d'imatge Versadoc, model 4000 (BioRad). Les senyals són analitzades i quantificades pel programa Quantity One (BioRad).

Proteïna	Origen	Dilució	Magatzematge	Banda KDa	Empresa (Id)
VDR	Conill	1:1000	4°C	51	Santa Cruz (sc-1008)
CYP24	Cabra	1:1000	4°C	54	Santa Cruz (sc-32164)
CYP27B1	Ratolí	1:1000	4°C	56	Santa Cruz (sc-67261)
Runx2	Conill	1:1000	-20°C	54	Novus Biologicals (NBP1-01004)
V5 epitop	Ratolí	1:1000	-20°C	-	Sigma
α tubulina	Ratolí	1:30000	-20°C	50	Sigma (V8012)
Conill IgG+HRP	Cabra	1:10000	-20°C	-	Cell signaling
Ratolí IgG +HRP	Cabra	1:10000	-20°C	-	Jackson Immuno research laboratories
Cabra IgG +HRP	Boví	1:10000	-20°C	-	Santa Cruz

Taula 7.- Anticossos primaris i secundaris utilitzats per l'anàlisi de western blot.

Per detectar el control de càrrega del Westen blot, les membranes són incubades amb α -tubulina. També es pot observar la càrrega tenyint la membrana amb blau de coomassie.

2.- EXPERIMENTACIÓ A NIVELL MOLECULAR:

2.1.-Sobreexpressió de CYP27B1 en CMLV de rata:

El vector de la 1 α hidroxilasa (CYP27B1) va ser proporcionat per la Dra. Adriana Dusso (pcmv-1 α OHaseV5). Aquest vector va ser clonat mitjançant el sistema Gateway cloning System (tots el components són d'Invitrogen) en un vector PDSL per a la producció de virus, amb la col·laboració del Dr. Mario Encinas. Els principals passos que vam fer són:

a) Insertar les seqüències attB1 i attB2 a l'extrem 3' i 5' del gen utilitzant primers específics i mitjançant amplificació per PCR.

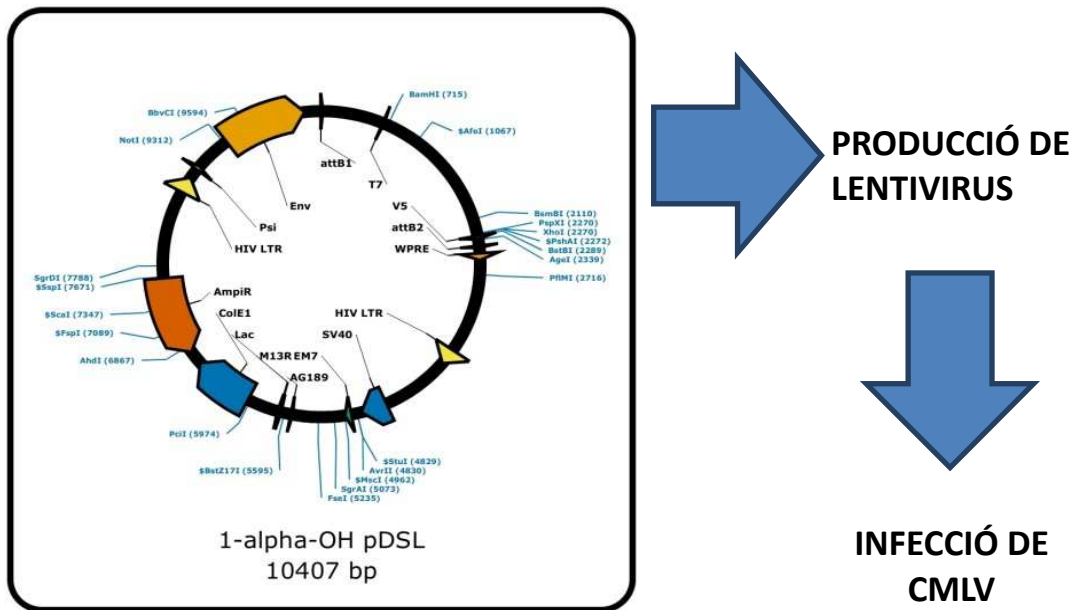
b) Els productes obtinguts després de l'amplificació es barregen amb el plàsmid pDONOR i amb l'enzim BP clonasa, el qual catalitza la recombinació i inserta el attB amb la seqüència de producte de PCR al lloc de recombinació attP del vector donador (pDONOR). Ara s'anomena clon d'entrada i les seqüències de recombinació són attL.

c) El gen del clon d'entrada es pot transferir ara a un vector destí (PDSL) utilitzant la LR Clonasa.

Durant aquest procediment vam digerir el DNA plasmídic en cada un dels passos per comprovar que es donés el patró de digestió correcte. Ara la nostra proteïna d'interès, la 1 α hidroxilasa, estarà fusionada amb un epítip V5 que ens servirà com a Tag per poder-la detectar per WB o altres tècniques.

Després, el plàsmid, es va transformar en bactèries i seleccionar amb la resistència a antibiòtics adequada. A continuació, es van produir virus per poder infectar les nostres cèl·lules (CMLV): Per fer els virus els vam transfectar en cèl·lules HEK293 amb polietilenimina (PEI) posant 10 μ g dels plàsmids de la càpside, de l'embolcall i 10 μ g del DNA plasmídic de la 1 α hidroxilasa.

Les CMLV de rata van ser infectades directament amb el medi que contenia els virus. Seguidament es va comprovar que la infecció havia estat correcta i es van realitzar els experiments de calcificació i tractaments. Com a control es va utilitzar el vector buit (FSV).



El gen de la 1 α hidroxilasa (CYP27B1) va ser subclonat mitjançant el sistema de clonació Gateway system.

Figura 16.- Esquema del procediment dut a terme per sobreexpressar la 1 α hidroxilasa en CMLV.

3.-EXPERIMENTACIÓ AMB ANIMALS:

L'experimentació amb animals es va realitzar seguint les directrius legals:

- Llei 5/1995, 21 de Juny, de la Generalitat de Catalunya per a la protecció dels animals utilitzats en experimentació i altres finalitats científiques.
- Decret 214/1997, 30 Juliol, que desenvolupa la llei anterior.
- Real Decret 1201/2005, 10 d'Octubre, de protecció dels animals utilitzats en experimentació i altres finalitats científiques.

3.1.- Models animals per l'estudi del metabolisme de la vitamina D:

Actualment els models de ratolins transgènics s'utilitzen molt en la investigació biomèdica, són un excel·lent model per les malalties humanes ja que l'organització del seu DNA i la forma en la que s'expressen els seus gens són molt similars a la dels essers humans. Alguns dels models de ratolins knockout utilitzats en l'estudi del metabolisme de la vitamina D són:

3.1.1.-Ratolins knockout per VDR:

Els ratolins que no tenen VDR són fenotípicament normals en néixer, però desenvolupen retard en el creixement, hipocalcèmia, hipofosfatèmia, hiperparatiroidisme, alts nivells de fosfatasa alcalina en sèrum, raquitisme/osteomalàcia, alopecía, retard en el creixement ossi amb pèrdua de la densitat de l'os, etc. Síntomes similars que tenen les persones amb mutacions al VDR en el raquitisme tipus II depenent de vitamina D. Els nivells de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en sèrum d'aquets knockouts són al voltant de 10 vegades més elevats que en WT.²¹¹ També s'observa que aquets ratolins tenen problemes de fertilitat.

Alimentant els ratolins nuls per VDR amb una dieta rica en calci, fosfat, i lactosa es normalitzen tots els símptomes, excepte les anomalies del cabell. Aquestes observacions suggereixen que l'augment intestinal de l'absorció de calci és crítica per les accions de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en l'os i en l'homeòstasi del calci. El defecte en l'homeòstasi del calci pot ser explicada per la reducció de l'expressió dels canals de calci epitelials en el duodè CAT1 i CAT2 en el VDR knockout.

3.1.2.-Knockout per 1 α hidroxilasa:

Les mutacions en el gen que codifica per la 1 α hidroxilasa ocasionen problemes greus, com el raquitisme per pseudo-deficiència de vitamina D (PDDR) ²¹² també anomenat raquitisme dependent de vitamina D tipus I (VDDR-I).

PDDR es una malaltia autosòmica recessiva caracteritzada per un retard en el creixement i en el desenvolupament, nivells baixos o indetectables de 1,25(OH)₂D₃, hipocalcèmia, hipofosfatèmia, osteomalàcia, raquitisme, hiperparatiroidisme secundari. Recentment, l'associació genètica de la 1 α hidroxilasa amb el PDDR ha estat confirmada per la d'elecció del gen de la 1 α hidroxilasa en ratolins ²¹³. Aquests ratolins presenten una marcada reducció en els nivells de mRNA de la calbindinaD9k intestinal, la 24hidroxilasa renal, la calbindinaD9k i la D28k renals, comparat amb els ratolins wild type.²¹⁴ Els ratolins KO per la 1 α hidroxilasa presenten també uns nivells elevats d'alcalina fosfatasa en sèrums, fet que indica que tenen una elevada activitat osteoblàstica amb ossos poc mineralitzats. Els osteoclasts es troben reduïts en aquests KO , i pot ser una manifestació del paper que la 1,25(OH)₂D₃ pot fer en la osteoclastogènesis. Els ratolins nuls per la 1alpha tenen ovaris reduïts i hipoplàsia, aquests ratolins no poden ovular i no són fèrtils.

Es pot rescatar el fenotip d'aquests ratolins mitjançant l'administració de 1,25(OH)₂D₃²¹⁵ i també augmentant el calci en la dieta: 2% calci, 1,25% fòsfor, 20% lactosa i 2,2IU/g vitamina D3, Harlan Teklad, TD.96348.²¹⁶

El ratolí 1 α hidroxilasa knockout que em utilitzat durant en nostre procés experimental va ser generat per recombinació homòloga entre un al·lel de la 1 α hidroxilasa i un vector dirigit donant lloc a un al·lel mutant. D'aquesta manera es genera un al·lel inactivat que ha perdut el domini d'unió a l'hormona (exó VI i VII) i també el domini d'unió a l'hemo (exó VIII).²¹⁷ (Figura 17).

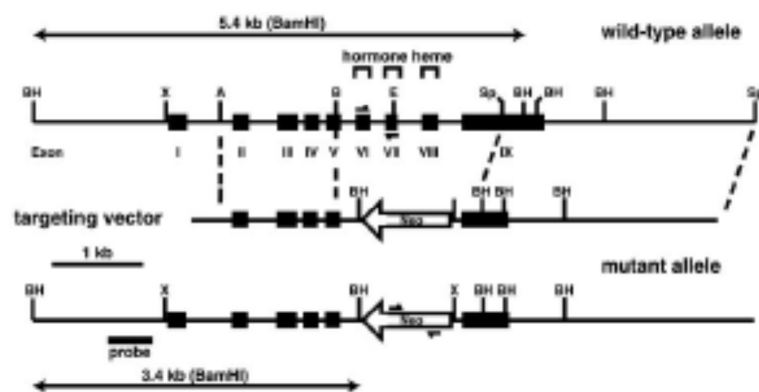


Figura 17.-Procés de recombinació homòloga per generar l'al·lel mutant (1 α hidroxilasa knockout).

3.1.3.-Knockout per la 24-hidroxiilasa

Per poder examinar el mecanisme fisiològic de l'enzim 24hidroxilasa i estudiar el paper de la 24,25(OH)₂D₃, St-Arnaud et al. va generar el knockout de la 24hidroxilasa (24hidroxilasa KO).²¹⁸ Estudis inicials suggereixen que el knockout de la 24hidroxilasa presenta poca viabilitat i una tendència a l'hipercalcèmia, hipercalciúria i nefrocalcinosis durant el període neonatal. Els ratolins que arriben a edat adulta presenten nivells elevats en plasma de 1,25(OH)₂D₃ després de l'administració exògena de 1,25(OH)₂D₃. Inesperadament, animals amb mutació de la 24hidroxilasa presenten nivells basals de 1,25(OH)₂D₃ baixos comparats amb els controls wild type i s'ha demostrat que la supervivència d'aquets ratolins és en part per la down-regulació de l'expressió gènica de la 1 α hidroxilasa. S'ha postulat que aquets animals probablement utilitzen una via alternativa de catabolisme de la 24,25(OH)₂D₃ per a regular els nivells circulants de l'hormona.

3.2.- Manteniment i cria de ratolins 1 α hidroxilasa Knockout:

Els ratolins KO per 1 α hidroxilasa que vam utilitzar en nostre procés experimental, van ser proporcionats pel Dr. David Gotzman de Montreal, Canada. Aquets ratolins van ser generats per ablació de l'exó 6 fins part de l'exó 9.²¹⁹

A partir dels KO 1 α hidroxilasa vam generar la nostra colònia creuant-los amb ratolins C57/BL6 com a soca background i així obtenir ratolins heterozigots en la F1. Posteriorment, es van aparellar els heterozigots obtinguts en la F1 per obtenir WT i 1 α hidroxilasa KO en la F2.

Aquests ratolins van ser alimentats amb una dieta alta en Ca²⁺ (2% calci, 1,25% fòsfor, 20% lactosa i 2,2 IU/g vitamina D₃, Harlan Teklad, TD.96348) durant el creixement i manteniment de la colònia. Abans d'iniciar el procés experimental es va canviar la seva dieta per una dieta normal (0,6% Ca²⁺, 0,8% fòsfor, i 0,6 IU/g vitamina D₃, Harlan Teklad) a fi que la dieta no interferís amb els diferents tractaments. Els animals es trobaven a l'estabulari de la Universitat de Lleida a una temperatura de 21°C amb 12 hores de llum/fosc i amb lliure disponibilitat al menjar i l'aigua. Vam utilitzar ratolins de 2-3 mesos d'edat en tots els nostres experiments.

3.3.- Genotipatge dels ratolins 1 α hidroxilasa KO:

Els ratolins es van identificar per la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) utilitzant DNA de la cua dels ratolins, obtingudes per la digestió amb proteïnasa K (recombinant PRC grade, Roche).

La reacció de PCR la vam realitzar amb els 4 primers junts (Neo-R, Neo-F, 1 α OH-R, 1 α OH-F). Les seqüències són:

neo-R: CATGGGTCACGACGAGATC

neo-F: ACAACAGACAATCGGCTGCTC

1 α (OH)asaF: AGACTGCACTCCACTCTGAG

1 α (OH)asaR: GTTTCCTACACGGATGTCTC

La Mix per la PCR tenia: Tampó 1 x (sense Mg), 1,5 mM MgCl, 0,2 mM dNTPS, 0,2 μ M de cada primer i 1U/ μ l de Taq polimerasa (Biotools).

Les condicions de la PCR eren: 94 $^{\circ}$ C 2 minuts, 32 cicles de (1 minut a 94 $^{\circ}$ C, 1 minut a 58 $^{\circ}$ C i 1 minut, a 72 $^{\circ}$ C) i amb una extensió final de 10 minuts a 72 $^{\circ}$ C.

El producte de la PCR juntament amb el marcador de pes molecular (Biotools de 100bp) en tampó de càrrega Orange G és va fer córrer a 100 V en un gel d'agarosa al 1,5% i utilitzant Sybergreen per tenyir el DNA. S'observen dues bandes, la banda de 500 bp corresponent a la 1 α hidroxilasa KO mentre que la banda de 376 bp és la del WT.

Els ratolins WT i 1 α hidroxilasa KO obtinguts es van utilitzar pels experiments *in vivo* e *in vitro*.

3.4.- Model de malaltia renal en ratolins: Reducció del 75% de la massa renal.

Durant aquest procediment, els animals utilitzats van ser anestesiats amb isoflorà (3,5), i van ser tractats amb bruprenorfina (calmant) durant el post-operatori.

Es va realitzar un model de malaltia renal en ratolins WT i KO per 1 α hidroxilasa mitjançant un procediment quirúrgic que consisteix en reduir la massa renal en un 75%*. El procediment es va fer en dues etapes; la primera setmana es va procedir a disminuir la massa renal aproximadament en un 65% del ronyó esquerra mitjançant l'electrocauterització de la part superior e inferior del ronyó localitzat. Primer, vam fer un petit tall a la pat dorsal-lateral del

ratolí, a continuació el ronyó es va treure a fora amb l'ajuda de palets de cotó fluix, es va decapsular y es va procedir a la cauterització de la massa renal vigilant de no cremar ni treure més ronyó del compte.

Una setmana més tard, es va procedir amb l'extracció completa del ronyó dret mitjançant la lligació de l'artèria renal. El ronyó en el costat dret, que es troba situat més superficialment, es va extreure a l'exterior i es va descapsular. Un cop localitzada l'artèria renal es va fer un clamp, es va lligar amb diversos nusos i després es va poder tallar el ronyó. Els ratolins van estar una setmana després de la nefrectomia sense rebre tractament per facilitar-ne la seva recuperació després de l'operació. (Figura 18)

*Aquest procediment quirúrgic es va poder realitzar gràcies als coneixement i la col·laboració de la Dra. M^a Vittoria Arcidiacono.



Figura 18.- Reducció de la massa renal d'un 75% en ratolí.

3.5.- Model de malaltia renal en rates: Reducció del 75% de la massa renal.

Aquest procediment quirúrgic s'ha de realitzar sota lupa, el procediment d'anestèsia és per injecció de ketamina i xilacina. La rata s'obre ventralment, s'extreu el ronyó dret i es descapsula, es netegen molt bé les artèries renals amb l'ajuda de bastonets de cotó fluix per que les artèries es puguin veure bé. Seguidament es procedeix a fer la lligació de les artèries renals una per una, amb l'ajuda d'unes pinces molt primes. Es lliguen amb fil de sutura fins a obtenir una necrosis del teixit renal d' aproximadament el 65 % en el ronyó dret. Després es procedeix a treure tot el ronyó esquerra, es descapsula i per lligació de totes les artèries, s'extreu el ronyó sencer. D'aquesta manera només una part del ronyó dret es funcional.*

*Aquest procediment quirúrgic es va poder realitzar gràcies als coneixement i la col·laboració de la Dra. M^a Vittoria Arcidiacono.

3.6.- Obtenció del sèrum normal i sèrum urèmic de Rata:

Per obtenir els sèrums un grup de rates de 2 a 3 mesos es van nefrectomitjar (75% de reducció de la massa renal), mentre l'altre grup no. A partir dels 3 mesos les rates ja es poden sacrificar i se n'extreu la sang. D'aquesta manera obtenim sèrum normal de les rates no nefrectomitjades i sèrum urèmic de la resta de rates que s'havien nefrectomitjat. El sèrum de cada grup s'ajunta en un pool i després s'aliquota en eppendorf per a poder ser utilitzat pel tractament de les cèl·lules.

3.7.- Obtenció d'orina:

Per poder realitzar l'anàlisi d'orina en rates i en ratolins es van fer servir les gàbies metabòliques de l'estabulari de la Universitat de Lleida. Les rates i ratolins es van posar dins les gàbies durant 24 hores i es va poder recollir l'orina. A partir de l'orina es van poder determinar diferents paràmetres (Filtrat glomerular (FG), excreció fraccional (EF) i molècules com el Ca^{2+} , P, creatinina, etc).

3.8.-Anàlisis bioquímic en sèrum i orina:

El sèrum i l'orina van ser analitzats mitjançant un assaig colorimètric del servei d'anàlisis clínics de l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova (HUAV). Pel calci es va utilitzar el mètode de la o-cresoftaleína complexona (*Roche/Hitachi modular analytics*) mentre que pel fòsfor es va fer servir el fosfomolibdat a 340nm (*Beckman Coulter AU*). Per la mesura dels ions Na i K es van fer servir electrodes selectius pels ions amb *Roche/Hitachi modular*. La creatinina es va mesurar pel mètode de Jaffé amb l'analitzador *Roche/Hitachi modular*.

Per quantificar la $25(\text{OH})\text{D}_3$ es va utilitzar el kit ELISA de 25-hidroxivitamina D (*immunodiagnostic systems*), la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ es va determinar amb l'assaig comercial IDS 1,25-Dihidroxivitamina D *EIA de Immunodiagnostic Systems Ltd*. la PTH amb el kit ELISA de PTH de ratolí, (*Immunotòpics*) i el BUN es va determinar mitjançant l'assaig colorimètric (*Quanticrom Urea assay kit*).

3.9.- Quantificació de la calcificació (concentració de calci) en teixit:

Per poder quantificar la concentració de calci a partir de poca quantitat de mostra, com és en l'artèria de ratolí, vam procedir a secar el teixit durant 24 hores a 60 °C. A continuació vam pesar cadascun del teixit i després el vam triturar amb ajuda d'un morter de

mà fins obtenir-ne pols. Vam afegir 400µl de HCl (1 N) a cada teixit (Eppendorf), i el vam deixar durant la nit amb vòrtex a 4 ° C. L'endemà, es va centrifugar a 10000 rpm durant 5 minuts, vam transferir el sobrenedant en un eppendorf nou (per quantificar calci mitjançant el mètode de la o-cresoltaleïna complexona) i el pellet per quantificar-ne les proteïnes (mètode de Lowry). Els resultats obtinguts es van expressar en ng Ca/mg de teixit o ng Ca/mg de proteïna.

3.10.- Mesura de la calcificació a partir de mostres de teixit en seccions de parafina:

Per poder quantificar la calcificació en artèria dels ratolins WT i 1αhidroxilasa KO vam fer servir el mètode de tinció del vermell d'alizarina. Les mostres van estar prèviament fixades amb formalina (4%) i incloses en seccions de parafina. Les seccions van ser desparafinades fins a aigua destil·lada, a continuació es van tenyir amb solució de vermell d'alizarina, Sigma A3757 (pH entre 4.1 - 4.3) durant uns 5 minuts i es va observar la reacció al microscopi, observant els dipòsits vermell-taronja del calci. Es va treure l'excés de colorant de les seccions i es va procedir amb la deshidratació de les mostres en acetona (20 cops) i després en solució d'acetona: xilol (1:1), 20 cops més. Finalment es van submergir les mostres en xilol i es van montar amb DPX.(Figura 19)

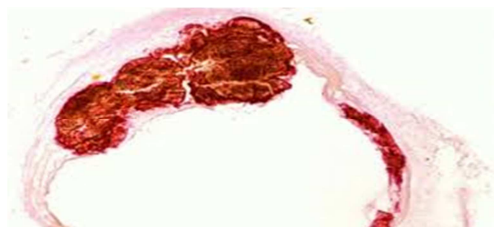


Figura 19.- Tinció de Vermell d'alizarina en artèria.

3.11.- Immunohistoquímica en mostres d'artèria (Runx2):

Per l'immunohistoquímica les seccions d'aorta van ser desparafinades, rehidratades i tractades amb "antigen retrieval", bloqueig amb 0.3% H₂O₂ i després amb sèrum normal de cavall 1/100 (Vector Vectastain Universal ABC kit PK-6200). L'anticòs policlonal de conill anti-ratolí Runx2 (NBP1-01004, Novus Biologicals) dilució 1:50 va ser utilitzat per la immunodetecció. Després d'incubar-ho tota la nit a 4°C les seccions es van incubar amb l'anticòs secundari biotinilitzat anti-conill durant 30 minuts a temperatura ambient (Vector laboratories) abans de la conjugació amb la peroxidasa conjugada amb streptavidina utilitzant 3,3'-diaminobenzidina com a cromògen.

Les mostres sense la incubació amb l'anticòs primari es van utilitzar com a control negatiu de la immunohistoquímica per tenir en compte la unió no específica. La contra tinció es va realitzar amb hematoxilina de Harris, seguida per deshidratació i muntatge.

3.12.-Anàlisi de l'expressió gènica per PCR en temps real en teixit:

L'RNA total va ser extret del ronyó, duodè i artèria (en el cas de la rata) utilitzant el reactiu Trizol per l'aïllament d'RNA total. 1,5 µg d'RNA va ser transcrit per la Moloney murina-virus leukemia-transcriptasa inversa. El cDNA renal obtingut es va utilitzar per determinar en el ronyó: TRPV5, calbindina-D28k, l'intercanviador de Na i Ca²⁺ (NCX1), i l'ATPasa de la membrana plasmàtica (PMCA1b). Els nivells d'expressió d'mRNA es van normalitzar utilitzant l'expressió de mRNA del gen control gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH). En el cDNA del duodè es va quantificar: TRPV6, calbindina-D9k, PMCA1b, i els nivells d'expressió d'RNAm de GAPDH (Taula 8). En l'artèria i ronyó de rata també es va determinar l'expressió de mRNA dels gens: VDR, 24-hidroxilasa i 1αhidroxilasa, veure la Taula 5.

Els encebadors es van dissenyar per la PCR amb SYBR Green i els nivells d'expressió van ser quantificats per PCR quantitativa en temps real en un CFX96 del sistema (Bio Rad).

	seqüència forward	seqüència reverse
TRPV5	CTGGAGCTTGTGGTTTCCTC	TCCACTTCAGGCTCACCAG
GAPDH	TAACATCAAATGGGGTGAGG	GGTTCACACCCATCACAAAC
Calbindin-D28k	GACGGAAGTGGTTACCTGGA	ATTTCCGGTGATAGCTCCAA
PMCA1b	GTCACCGGCCTTACGTGTAT	TCCAGCCCTCTGACATTTCT
NCX1	GTGACTGCCGTTGTGTTTGT	GCATACTGGTCCTGGGTAGC
Calbindin-D9k	CCTGCAGAAATGAAGAGCATTTT	CTCCATCGCCATTCTTATCCA
TRPV6	GGCCTCACAACCTCATTAC	CTCAATGAGCAGTCTAACAATC
Klotho	GGTTGCCACAACTACTTT	TGGGAGCTTAAGGCGATAGA
FGFR1	TAAGATCGGGCCAGACAAC	CGATAGAGTTACCCGCCAAG

Taula 8.- Encebadors utilitzats en l'estudi de ronyó i intestí pel mètode SyBerGreen.

3.13.- Immunoblots:

Ronyó i intestí van ser immediatament congelats en nitrogen líquid després de la seva extracció, es van homogeneïtzar en tampó de lissat (50 mM de HEPES, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1% Nonidet P-40).

Les mostres de ronyó (25µg de proteïna) es van separar en un 12% (w/ v) de gel SDS-PAGE i es van transferir en una membrana de PVDF-nitrocel·lulosa, les transferències es van incubar

durant 16 h amb l'anticòs primari per calbindina-D28k (1:10000). Les mostres d'intestí es van separar en un gel SDS-PAGE al 16% i es van transferir en una membrana de PVDF-nitrocel·lulosa. A continuació es van incubar amb anticòs per calbindina-D9K (1:5000). Després, les membranes es van incubar amb anticòs secundari anti-conill (1:10000). L'anticòs per β -actina (1:10000) es va utilitzar com a control de la càrrega. Posteriorment, la proteïna immunoreactiva es va detectar utilitzant el mètode de quimioluminescència, mitjançant un Chemidoc de BioRad i el programa Quantity One.

3.14.- Immunohistoquímica: Localització dels canals TRPV5 i la Calbindina-D28k.

La immunodetecció de les seccions renals es va realitzar en seccions de 5 μ m de mostres incloses en parafina. Les seccions es van submergir en tampó citrat, seguidament es van incubar en 0,3% (v/v) de tampó H₂O₂ durant 30 minuts. Van ser incubades durant 16 hores a 4 °C amb l'anticòs específic; Calbindina-D28k (1:500) i TRPV5 (1:1500). Després d'això, es van incubar amb l'anticòs secundari de cabra anti-conill Alexa 488 (1:300) per Calbindina-D28k i de cabra anti-conill d'índies biotinilitzat (1:2000) per TRPV5. Les seccions es van deshidratar en metanol i posteriorment en van muntar en Mowiol. Les imatges es van realitzar mitjançant un microscopi de fluorescència Zeiss equipat amb una càmera de fotos digital (Nikon DMX1200).

4.- ANÀLISIS ESTADÍSTIC DELS RESULTATS:

La diferència estadística es va avaluar pel test T-student. Valors P<0,05 es consideren significatius. Les dades examinades s'expressen com a mitjan \pm error estàndard de la mitjana (SEM).

5.- PRODUCTES QUÍMICS I SOLUCIONS STOCK UTILITZATS EN EL PROCÉS EXPERIMENTAL:

1 α , 25-Dihydroxyvitamin D3 (Sigma, cat nº 076k4067)- preparada en solució stock de 1mM en 100% etanol alíquotada i conservada a -20°C.

Calcijex, ABBOT, 687533.

25(OH)D3(Sigma)- Solució dissolta en 100% etanol i quantificació de la concentració cada cop que es preparava de nou mitjançant espectrometria.

Marcador de pes molecular de DNA (Roche, 11721933001)

Organge G (sigma, 03756) Tampó de càrrega per mostres de DNA.

DMEM (Dubelcco's modified Eagle's medium (GIBCO,41965).

Fibronectina (SIGMA, F1141), es reconstitueix amb aigua destilada a 100 ug/ml i es manté en alíquotes de 500 ul a -20°C.

Sèrum fetal boví (GIBCO,10500), alíquotat i emmagatzemat a -20°C.

Penicilina I estreptomicina (GiBCO, P4458), alíquotes de 5 ml i emmagatzemades a -20°C.

Tripsina (0,05% de Trypsina-EDTA 1X, GIBCO, 25300), utilitzat per desenganxar les cèl·lules.

Solució A pH 7.05 (NaCl 112mM, NaHCO₃ 20mM, KCl 5mM, CaCl₂1,6mM, Na₂HPO₄2mM, MgSO₄1,2mM, Glucosa5mM, HEPES 10mM, Manitol 10mM, L-glutamina 1mM, Butirat de Sodi 1mM, Lactat de Sodi 1mM).

Formalina (4%): 40g de paraformaldehid en 800ml de PBS 1x, augmentar el pH amb NaOH perquè es pugui dissoldre. Ajustar el volum a 1L.

Tampó de genotipatge: 100mM TRIS, 200mM NaCl, 25mM de EDTA i 0,2% de SDS. pH 8,5.

Reactius de calcificació: Etalonamina (SIGMA, 411000), o-cresolftaleina (SIGMA, P5631), 8-hidoxiquinalina (SIGMA, H6878).

Reactiu 1: Etanolamina (880 mmol/L), pH=11

Reactiu 2: o-cresolftaleina- complexona, 0,05 mmol/L, 8-hidroxiquinalina (11mmol/L).

RESULTATS

RESULTATS

1.- EFECTE DEL TRACTAMENT AMB VITAMINA D ACTIVA EN LA REGULACIÓ DE GENS IMPLICATS EN EL METABOLISME DE LA VITAMINA D EN LA URÈMIA.

La primera part del treball es basa en estudiar l'efecte de la urèmia i dels tractaments amb calcitriol i del seu anàleg, el paricalcitol, sobre les CMLV. Estudiar com es regulen els gens implicats en el metabolisme de la vitamina D i el seu efecte en la calcificació vascular.

1.1.- ESTUDI *IN VIVO*:

En l'estudi *in vivo* rates Spague Dawley es van nefrectomitzar (model de nefrectomia 5/6) i es van tractar durant 5 mesos, 3 dosis/setmana amb 300 ng/kg de paricalcitol (*grup urèmic + paricalcitol*) i amb 100 ng/kg de calcitriol (*grup urèmic + calcitriol*). Deixant un grup de rates sense nefrectomitzar com *agrup control* i un altre grup de rates nefrectomitzades sense tractament (*grup urèmic*).

1.1.1- Efecte de la urèmia, del Calcitriol o del Paricalcitol en la funció renal:

Per estudiar la funció renal es va utilitzar orina recollida durant 24 hores amb les gàbies metabòliques, i es van determinar els diferents paràmetres metabòlics i bioquímics de cada rata. Es va mesurar el volum d'orina a les 24h, la concentració de creatinina, Ca^{2+} , P, Na, K i es van calcular l'EU (l'eliminació urinària) i l'EF (l'excreció fraccional) i el FG (filtrat glomerular).

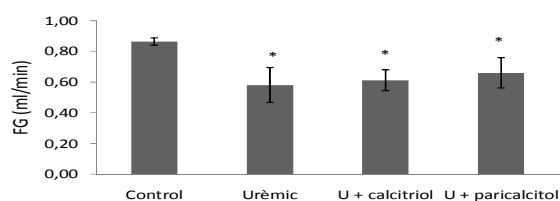
En la Figura 20, observem com el filtrat glomerular disminueix significativament en les rates que han estat nefrectomitzades i no millora amb els tractaments. L'eliminació urinària de calci disminueix significativament en les rates urèmiques i es recupera amb els tractaments amb calcitriol i paricalcitol (Figura 20C). En el cas de l'eliminació urinària de fòsfor també es veu disminuïda en les rates urèmiques i augmenta aquesta eliminació amb el tractament amb calcitriol (Figura 20D). L'excreció fraccional de Ca^{2+} i P, que correspon a la proporció de la massa filtrada d'una substància que s'elimina per l'orina, és més elevada en les rates que han estat tractades amb calcitriol i paricalcitol.

Resultats

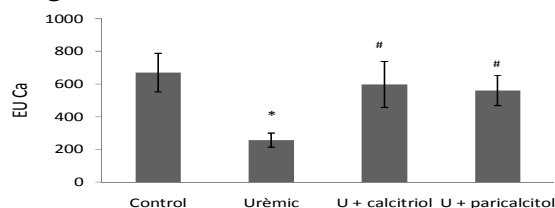
A

	Control	Urèmic	Urèmic+calcitriol	Urèmic +paricalcitol
Volum orina (ml)	16,33±1,33	13,51±1,84	12,11±1,98	14,21±2,24
FG (ml/min)	0,86±0,02	0,58±0,11*	0,61±0,068*	0,66±0,09*
EU Ca ²⁺ (mg/dia)	669,46±118	256,63±43 *	596,90±141 #	560,97±92 #
EU P (mg/dia)	1366,74±96	358,06±64 *	820,90±190 *#	485,11±151
EU Na (mg/dia)	517,82±69	588,11±76	416,40±78	418,41±30
EU K (mg/dia)	1267,07±228	1272,01±205	1052,07±123	1243,96±90
EF Ca (%)	3±1	3±0,6	6±1 *	5,5±0,8 *
EF P (%)	1,1±4,9	10±3,2	14±2,1	9±2

B



C



D

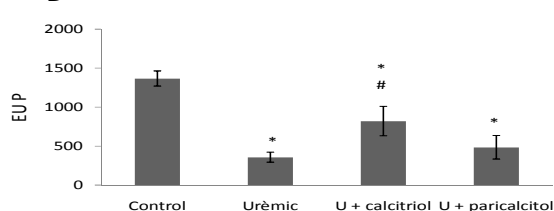


Figura 20.- Determinació d'ions i funció renal en l'orina de rates recollida en 24 hores amb gàbies metabòliques. A) Taula dels diferents paràmetres metabòlics i bioquímics analitzats, després de recollir l'orina durant 24 hores dels 4 grups de rates (control, urèmic, urèmic tractat amb calcitriol, urèmic tractat amb paricalcitol) en color està senyalats els resultats que presenten diferències. Gràfiques de B) Filtrat glomerular (FG), C) l'eliminació urinària de Calci (EU Ca), i D) l'eliminació urinària fòsfor (EU P). Els valors estan representats com a mitja ± eem *p<0,05 vs el control, # p<0,05 vs urèmic, (n= 6-8).

Resultats

Es va recollir el sèrum dels diferents grups de rates per analitzar els nivells de Ca^{2+} , P i creatinina. Observem que la creatinina augmenta en totes les rates que han estat nefrectomitzades (Figura 21C) ambdós tractaments incrementen els nivells de calci (Figura 21B) respecte el grup urèmic mentre que el fòsfor no presenta diferències significatives entre els diferents grups.

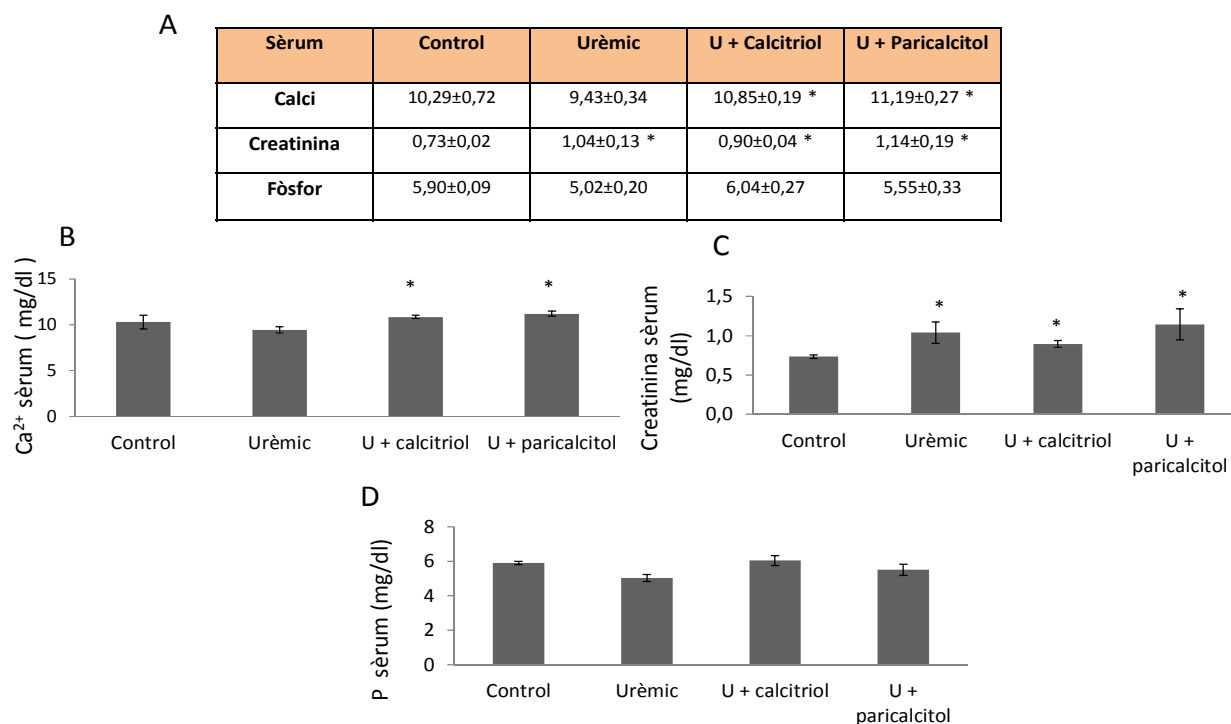


Figura 21.- Nivells de Ca^{2+} , P i creatinina en sèrum. A) Taula representativa dels valors de Ca^{2+} , P i creatinina del sèrum extret de les rates controls, nefrectomitzades sense tractar, tractades amb calcitriol (100ng/kg) o paricalcitol (300ng/kg) durant 5 mesos. B) Gràfica dels nivells de Ca^{2+} en sèrum en mg/dl, C) Creatinina (mg/dl), D) Fòsfor (mg/dl). Els valors están representats com a mitja \pm eem * $p < 0,05$ vs. urèmic (n= 6-8).

1.1.2.- Efecte de la urèmia i dels tractaments sobre la calcificació vascular i renal:

Per tal d'estudiar com afecta a la calcificació vascular i renal la urèmia i els tractaments amb calcitriol i paricalcitol es va quantificar químicament el calci present en les artèries i en els ronyons (mètode de l'o-cresolftaleïna complexona) dels quatre grups de rates; les control, les urèmiques, les urèmiques tractades amb calcitriol (100 ng/kg) o paricalcitol (300 ng/kg). Als 5 mesos de la nefrectomia s'observa una diferència significativa en el contingut de calci arterial en les rates urèmiques (Figura 22A). S'observa un augment molt significatiu en el contingut de calci quan les rates són tractades amb calcitriol i paricalcitol indicant que els

Resultats

tractaments estan produint calcificacions en l'artèria. A més, s'observa un efecte calcificant més elevat en el cas del calcitriol respecte el paricalcitol.

En el ronyó no s'observa un augment del contingut en calci en les rates urèmiques mentre que amb els tractaments també hi ha un increment del calci sense haver-hi diferències entre els dos tractaments (Figura 22B).

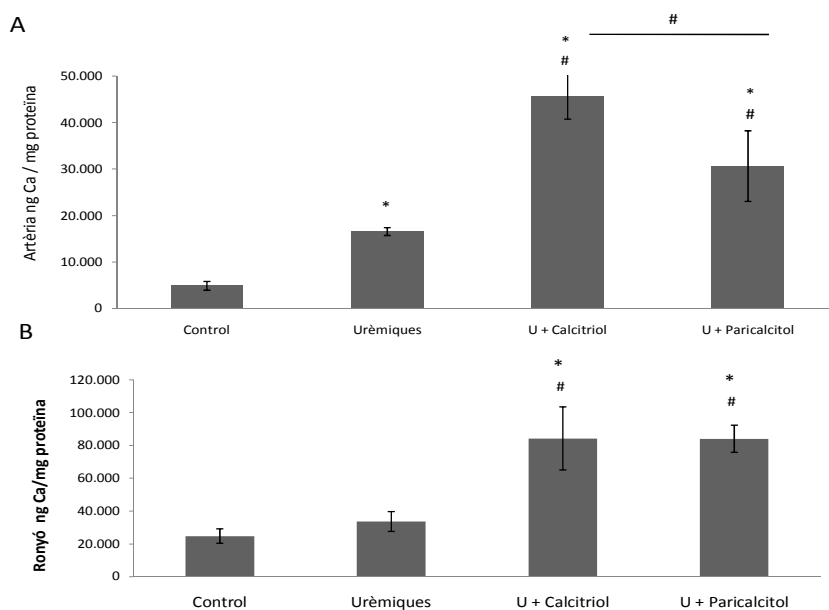


Figura 22.- Calcificació vascular i renal. A) Contingut de calci arterial (ng Ca /mg de proteïna) en rates controls, nefrectomitzades sense tractar i tractades amb calcitriol (100ng/kg) o paricalcitol (300ng/kg) durant 5 mesos. B) Quantificació del contingut de calci renal (ng Ca /mg de proteïna) en rates controls, nefrectomitzades sense tractar i tractades amb calcitriol (100ng/kg) o paricalcitol (300ng/kg) durant 5 mesos. Els valors estan representats com a mitja ± eem *p<0,05 vs el control, # p<0,05 vs urèmic, (n= 6-8).

1.1.3.-Efecte de la urèmia i dels tractaments en l'expressió de gens implicats en el metabolisme de la vitamina D en artèria i ronyó:

Es va determinar l'expressió a nivell de mRNA mitjançant RT-PCR dels tres gens implicats en el metabolisme de la vitamina D: la 1 α hidroxilasa, el VDR i la 24 hidroxilasa en artèria i també en el ronyó per determinar l'efecte de la urèmia i dels tractaments en l'expressió d'aquests gens.

En l'artèria observem un augment significatiu dels nivells de mRNA determinats per RT-PCR de la 1 α hidroxilasa en el grup urèmic i també en els grups urèmics i tractats amb calcitriol i

Resultats

paricalcitol (Figura 23A). L'expressió de la 24hidroxilasa augmenta significativament en el grup urèmic tractat amb paricalcitol (Figura 23B). En canvi, el receptor de la vitamina D (VDR) disminueix significativament en el grup de rates nefrectomitzades, mentre que amb els tractament amb paricalcitol augmenta (Figura 23C).

En el ronyó, els resultats són força diferents als de l'artèria. La 1 α hidroxilasa no augmenta significativament en la urèmia i amb els tractaments mostra una tendència a disminuir (Figura 24A), la 24hidroxilasa sí que augmenta en els tres casos estudiats (Figura 24B), mentre que el VDR no presenta variacions significatives (Figura 24C).

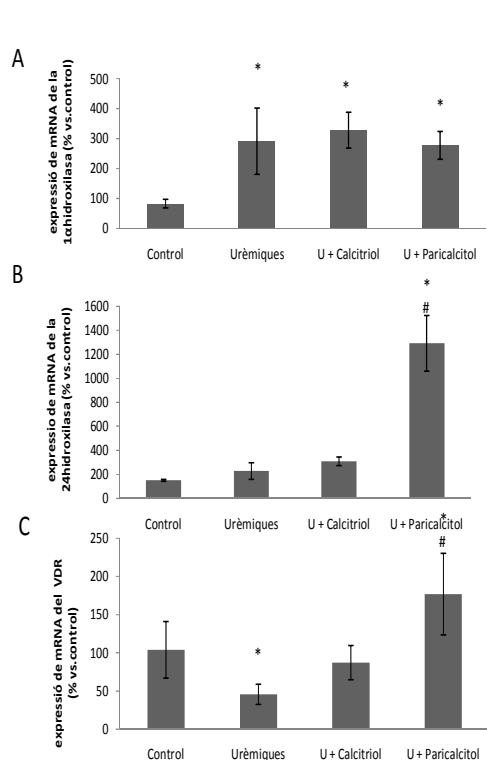


Figura 23.- Expressió de la 1 α hidroxilasa, 24hidroxilasa i VDR en l'artèria. Determinació per RTPCR de l'expressió de la (A) 1 α hidroxilasa, (B) de la 24hidroxilasa, i (C) del VDR respectivament en l'artèria de rates control, nefrectomitzades sense tractar i tractades amb calcitriol (100ng/kg) i paricalcitol (300ng/kg) durant 5 mesos. Els valors estan representats com a mitja \pm eem *p< 0,05 vs el control, # p<0,05 vs urèmic. # p<0,05, (n= 6-8).

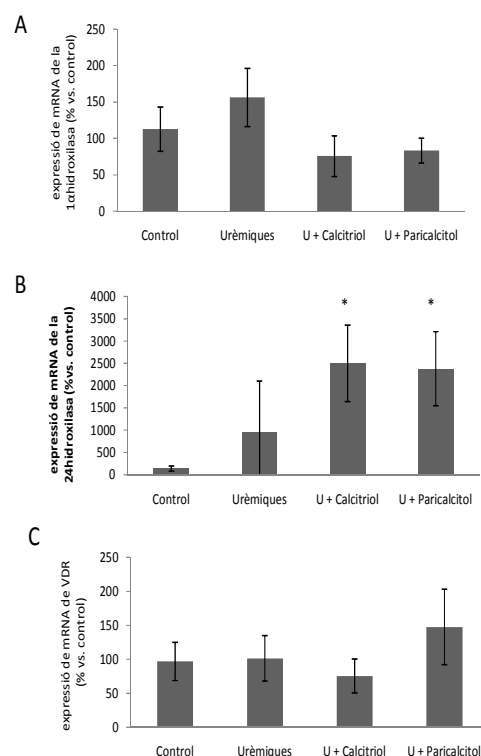


Figura 24.- Expressió de la 1 α hidroxilasa, 24hidroxilasa i VDR en el ronyó. Determinació per RTPCR de l'expressió de la (A) 1 α hidroxilasa, (B) de la 24hidroxilasa, (C) i del VDR respectivament en ronyó de rates control, nefrectomitzades sense tractar i tractades amb calcitriol (100ng/kg) i paricalcitol (300ng/kg) durant 5 mesos. Els valors estan representats com a mitja \pm eem *p< 0,05 vs el control, (n= 6-8).

1.2.-ESTUDI *IN VITRO*:

1.2.1.- Efecte de la urèmia i dels tractaments en l'expressió dels gens implicats en el metabolisme de la vitamina D en CMLV i CTR.

Per tal d'estudiar l'efecte de la urèmia i dels tractaments en l'expressió dels gens implicats en el metabolisme de la vitamina D en les CMLV i les CTR es van tractar durant 48 hores en medi amb fòsfor elevat, amb un 15% de sèrum de rata normal o urèmica i també amb calcitriol o paricalcitol (dosis de 10^{-7} M).

En les CMLV observem un augment significatiu dels nivells de mRNA de la 1α hidroxilasa amb el tractament amb calcitriol en sèrum urèmic respecte el tractament amb calcitriol en sèrum normal (Figura 25A). La 24hidroxilasa té una tendència a augmentar la seva expressió en condicions urèmiques, i amb els tractaments la seva expressió s'incrementa de forma significativa (Figura 25B). Els nivells de VDR disminueixen amb el sèrum urèmic i augmenten amb els tractaments amb calcitriol i paricalcitol (Figura 25C).

En les cèl·lules tubulars renals (CTR), no s'observa un increment de l'expressió de la 1α hidroxilasa en condicions urèmiques (Figura 26A). Com tampoc s'observa aquest canvi en l'expressió de la 24hidroxilasa. El VDR incrementa la seva expressió amb els tractaments amb calcitriol i paricalcitol. (Figura 26C).

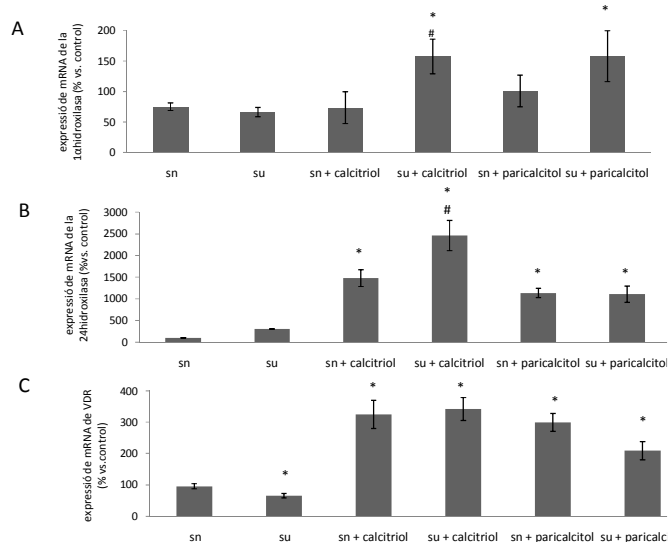


Figura 25.- Expressió de la 1α hidroxilasa, 24hidroxilasa i VDR determinat en CMLV. (A) Nivells de mRNA determinats per RTPCR de la 1α hidroxilasa, (B) de la 24hidroxilasa i (C) del VDR en CMLV tractades durant 48h amb medi amb fòsfor elevat amb un 15% de sèrum normal o urèmic i amb calcitriol o paricalcitol (10^{-7} M). Els valors estan representats com a mitja \pm eem * $p < 0,05$ vs control (sn), # $p < 0,05$ vs sn + calcitriol.

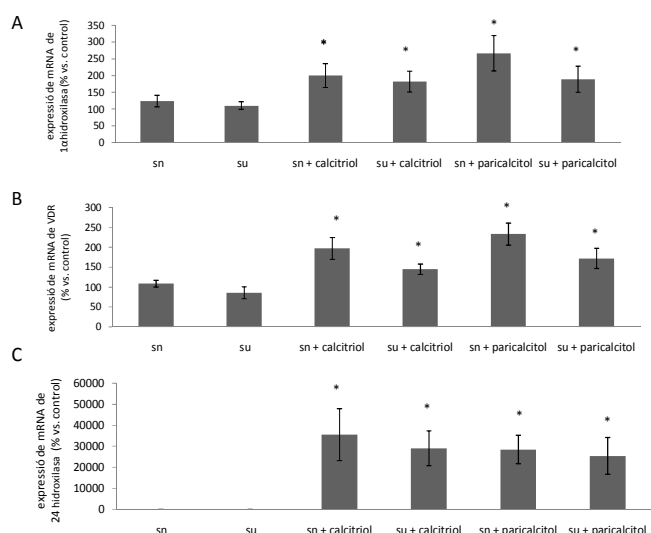


Figura 26.-Expressió de 1α hidroxilasa, 24hidroxilasa i VDR determinat en CTR. (A) Nivells de mRNA determinats per RTPCR de la 1α hidroxilasa, (B) de la 24hidroxilasa i (C) del VDR en CTR tractades durant 48h amb medi amb fòsfor elevat amb un 15% de sèrum normal o urèmic i amb calcitriol o paricalcitol (10^{-7} M). Els valors estan representats com a mitja \pm eem * $p < 0,05$ vs el control (sn).

1.2.2.- Efecte de la urèmia i del calcitriol en l'expressió de proteïnes del metabolisme de la vitamina D en CMLV i CTR

Vam analitzar per WB l'expressió proteica del VDR, la 24-hidroxilasa i la 1 α hidroxilasa tractant les CMLV i CTR amb un 15% de sèrum normal o urèmic i amb calcitriol durant 48h. En l'expressió de proteïna observem resultats similars als de l'expressió de mRNA; en les CMLV disminueix l'expressió del VDR en la urèmia i augmenta la de la 1 α hidroxilasa amb el tractament amb sèrum urèmic més calcitriol (27A). La 24hidroxilasa augmenta en CMLV amb el tractament amb calcitriol en els dos sèrums. En CTR el VDR no es modifica per la urèmia, com tampoc la 1 α hidroxilasa i la 24hidroxilasa (27B).

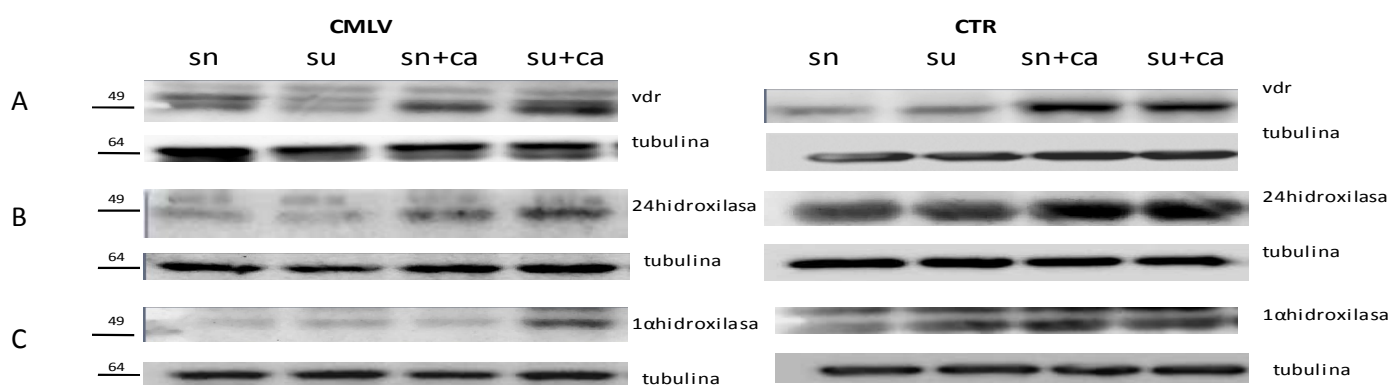


Figura 27.- Expressió de la 1 α hidroxilasa, 24hidroxilasa i VDR en CMLV i CTR. Detecció de l'expressió proteica de de la 1 α hidroxilasa, la 24 hidroxilasa i el VDR en CMLV i CTR les quals es van tractar durant 48h amb medi amb fòsfor elevat amb un 15% de sèrum normal o urèmic i amb calcitriol(10⁻⁷M). El control de càrrega de la mostra es va fer amb α -tubulina.

2.- EFECTE DE LA SÍNTESIS LOCAL DE CALCITRIOL PER LA 1 α HIDROXILASA I LA SEVA IMPLICACIÓ EN LA CALCIFICACIÓ VASCULAR EN LA URÈMIA.

A partir dels resultats anteriors on s'observava un augment de l'expressió de la 1 α hidroxilasa en l'artèria i en les CMLV en condicions urèmiques. Es va seguir amb l'estudi per determinar el paper de la 1 α hidroxilasa en la síntesis local de calcitriol i la seva implicació en la inducció de la calcificació vascular en la urèmia.

Per aquest estudis es va utilitzar com a model, un ratolí transgènic, el KO per la 1 α hidroxilasa, el qual no és capaç de sintetitzar la forma activa, la 1,25(OH)₂D₃. Es van utilitzar ratolins wild type i 1 α hidroxilasa KO de dotze setmanes i es van dividir en tres grups; el primer no es va nefrectomitzar (grup sham), el segon grup es van nefrectomitzar reduint un 75% la massa renal (urèmic), el tercer es va nefrectomitzar i tractar amb calcitriol (400ng/kg) (urèmic+calcitriol) durant dues setmanes.

La dosis va ser escollida a partir d'un experiment previ, i després d'observar que la dosis de 400 ng/Kg de calcitriol era la que igualava els nivells de 1,25D en els wild type i 1 α hidroxilasa KO. Com a control es van utilitzar ratolins nefrectomitzats i no tractats i també un grup de ratolins sham tant en cas dels wild type com en els KO. (Figura 28).

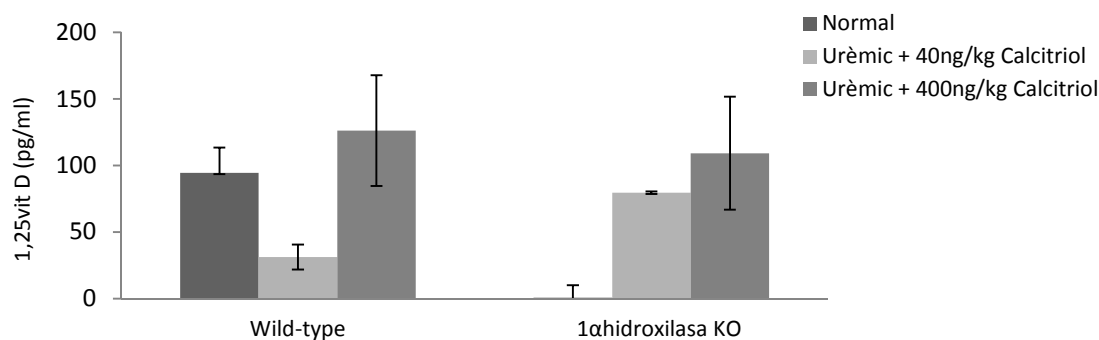


Figura 28.- Nivells de 1,25 vitamina D en els ratolins wild type i 1 α hidroxilasa KO. Nivells de 1,25vitD en ratolins wild type i 1 α hidroxilasaKO normal (sham) i nefrectomitzats tractats durant dues setmanes amb 40 i 400 ng/kg de calcitriol. Els resultats s'expressen com mitjana \pm eem (n = 4-5).

2.1.- ESTUDIS *IN VIVO*:

2.1.1-Efecte tòxic del tractament amb calcitriol, avaluació de la pèrdua de pes en els animals.

Per tal d'estudiar la toxicitat del tractament en els nostres ratolins wild type i 1 α hidroxilasaKO, es va mesurar el pes inicial i final de cada grup d'animals, els resultats indiquen que només hi han diferències significatives entre el pes a l'inici i al final en el grup de ratolins wild type urèmics tractats amb calcitriol (400ng/kg) (Figura 29). En canvi, no s'observen diferències significatives en el grup 1 α hidroxilasa KO urèmic i tractat amb calcitriol.

Aquesta pèrdua de pes en els wild type indica que el tractament amb calcitriol està produint un efecte tòxic sobre aquests animals, mentre que els KO no presenten cap senyal de toxicitat.

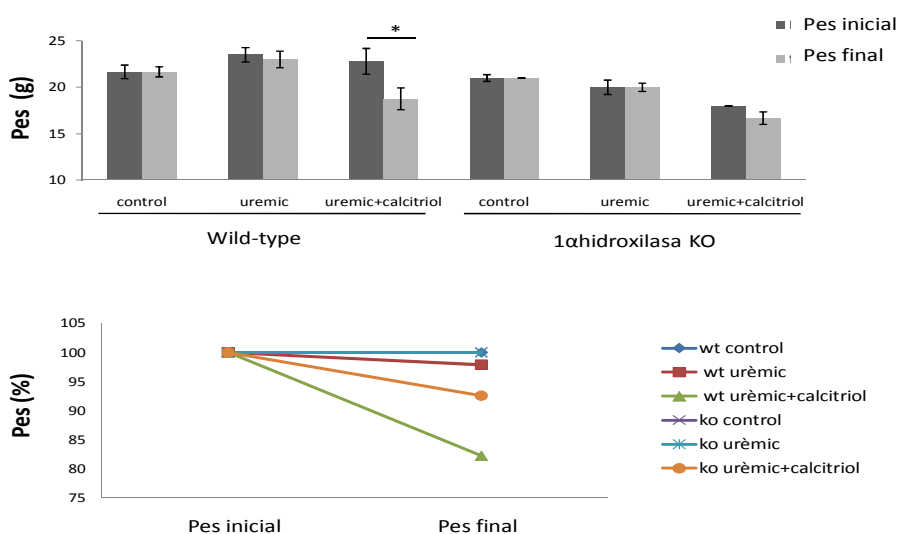


Figura 29.- Pes abans i després del tractament amb calcitriol (400ng/kg) en ratolins wild type i 1 α hidroxilasa KO.

Mesura del pes a l'inici i al final de l'experiment en ratolins wild type i 1 α hidroxilasa KO sham (grup control), nefrectomitzats (urèmic), nefrectomitzats i tractats amb calcitriol (400ng/kg) (urèmic+calcitriol) durant dues setmanes. Els resultats s'expressen en la primera gràfica en grams i en la segona en % on el pes inicial és el 100%, s'expressa com mitjana \pm eem (n = 6 a 8) * p < 0.05 significativament diferent respecte el pes inicial.

2.1.2.- Determinació dels nivells de Ca²⁺, P, BUN, PTH i 1,25D en els grups d'animals.

Després de nefrectomitzar i tractar els ratolins, es va extreure el sèrum i es van analitzar diferents analits: BUN, Ca²⁺, P, PTH, 1,25D.

Els nivells de BUN com cal esperar, són similars en els grups de ratolins que s'han nefrectomitzat (Figura 30A). Els nivells de calci en sèrum són inferiors en els 1 α hidroxilasa KO, però amb el tractament amb calcitriol aquests nivells s'igualen amb els wild type també tractats (WT: 16.38 \pm 0.48, KO: 15.18 \pm 0.46 mg/dl) (Figura 30B). El mateix passa amb el fòsfor, que després del tractament amb calcitriol els nivells entre WT i KO són semblants (WT: 8.15 \pm 0.42, KO: 8.43 \pm 0.46 mg/dl) (Figura 30C). Els nivells de PTH disminueixen en els dos grups tractats per sota dels valors normals (WT: 29,25 \pm 0,84, KO: 30,48 \pm 0.70 pg/ml) però amb nivells similars, indicant l'efecte del calcitriol en la inhibició de la síntesis de PTH (Figura 30D).

Finalment, els nivells de 1,25D que són molt baixos en els 1 α KO també s'igualen en els dos grups tractats (WT: 150,21 \pm 0,89; KO: 123,28 \pm 14,171 pg/ml) (Figura 30E).

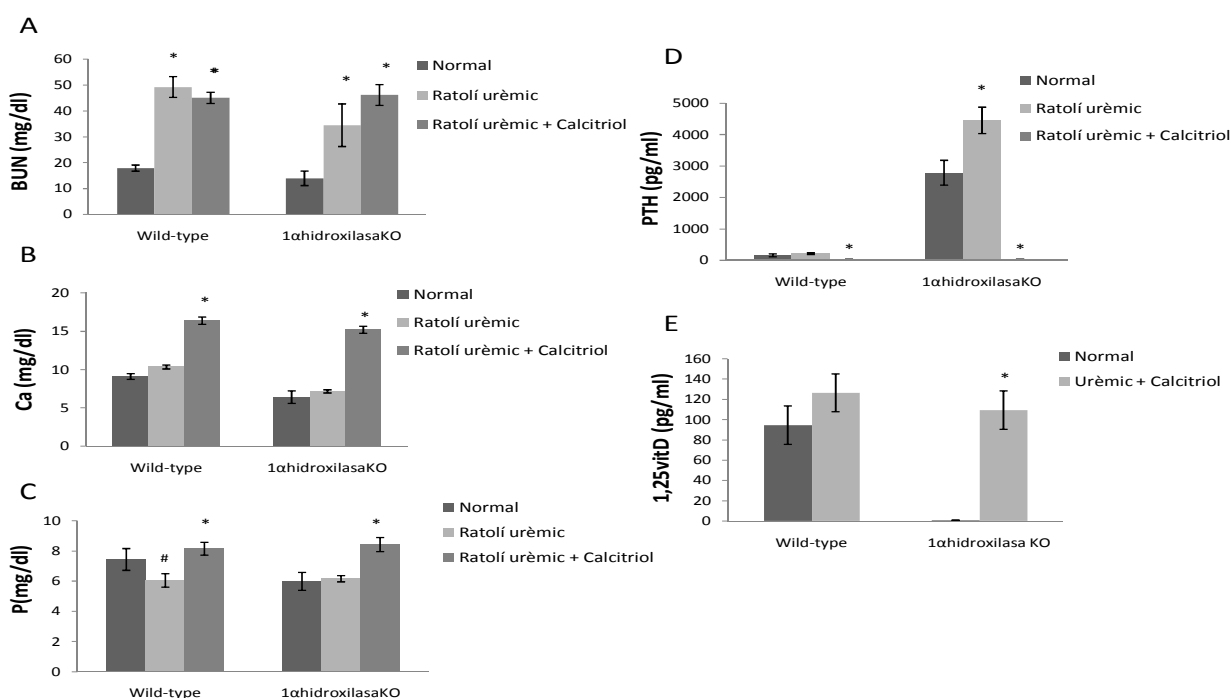


Figura 30.- Anàlisi bioquímica en sèrum en ratolins amb model de MRC en wild type i 1 α hidroxilasa KO. Nivells en sèrum de (A) Urea nitrogenada (BUN), (B) Calci, (C) fòsfor, (D) PTH, (E) 1,25hidroxivitamina D₃ en ratolins wild type i 1 α hidroxilasa KO sham (grup normal), nefrectomitzats (urèmic), i nefrectomitzats i tractats amb calcitriol (400ng/kg) (urèmic + calcitriol) durant dues setmanes. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm em (n=6 a 8)*, p<0,05 significativament diferent respecte el ratolí sham (control).

2.1.3.- Efecte sobre la calcificació vascular en ratolins wild type i 1 α hidroxilasa KO nefrectomitzats i tractats amb calcitriol.

Es va estudiar l'efecte del tractament amb calcitriol sobre la calcificació vascular en els ratolins wild type i els 1 α hidroxilasa KO nefrectomitzats. Com mostra la Figura 31, s'observa un increment molt elevat en el contingut de calci en el grup WT tractat amb calcitriol. Aquest increment és significativament menor que en el mateix grup 1 α KO (WT: 895,70 \pm 172,26; KO: 556.74 \pm 77.71 μ gCa/mg protein, p<0.05)(Figura 31A). Per la tinció amb vermell d'alizarina s'observa com els dipòsits vermells són més intensos en el grup WT urèmic tractat, mentre que en el KO no s'observa coloració vermella. A més la immunohistoquímica per Runx2 mostra també més expressió d'aquesta proteïna (coloració marró) en l'artèria de ratolins wild type urèmics que han estat tractats amb calcitriol (Figura 31B).

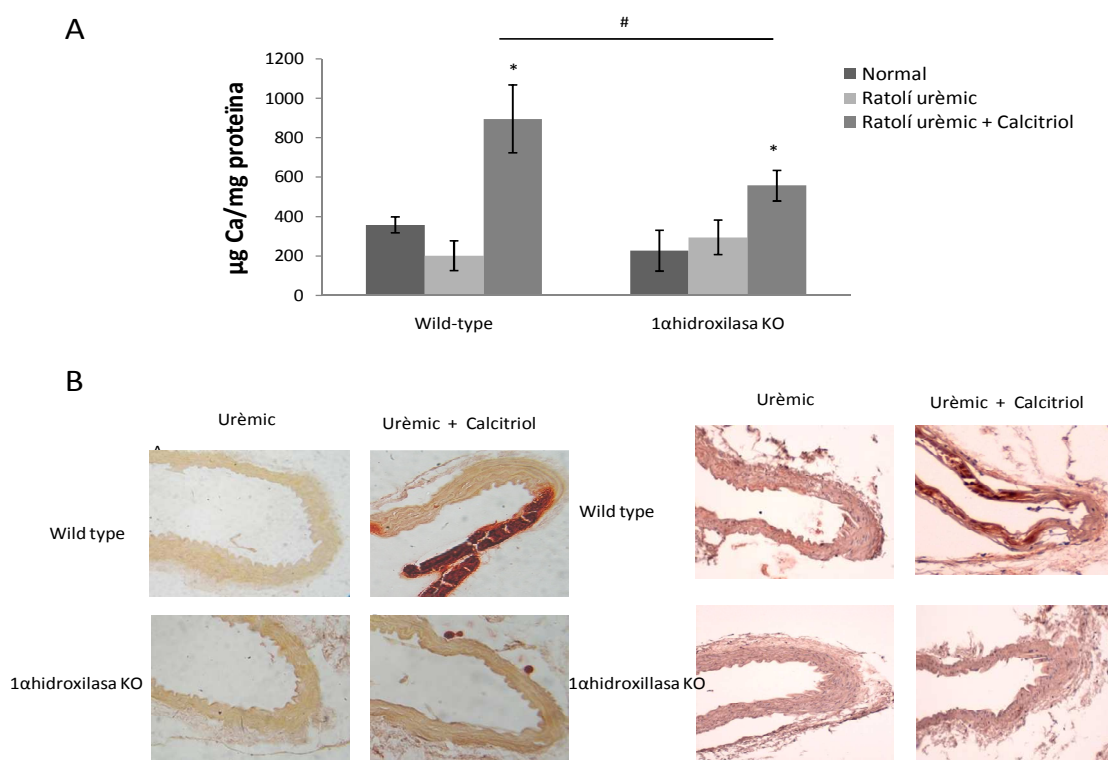


Figura 31.- Efecte en la calcificació vascular en ratolins wild type comparats amb els 1 α hidroxilasaKO en un model de MRC.

(A) Contingut de calci en l'aorta abdominal normalitzat per la proteïna en ratolins normals (no nefrectomitzats), ratolins urèmics (nefrectomitzats) i urèmics tractats durant dues setmanes amb calcitriol. (B) Histoquímica representativa de la tinció amb vermell d'alizarina i immunohistoquímica de Runx2, en ratolins wild type nefrectomitzat, wild type nefrectomitzat i tractat amb calcitriol, 1 α hidroxilasa KO nefrectomitzat i els KO tractat amb calcitriol. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm eem (n=6-8), * p<0,05, comparant ratolins control i urèmics. # p<0,05, comparant entre wild type tractat i KO tractat.

2.2.- ESTUDIS *IN VITRO*:

2.2.1- Efecte de la urèmia i del calcitriol en la calcificació de CMLV procedents de ratolins wild type i 1 α hidroxilasa KO.

Per tal d'estudiar l'efecte de la urèmia i del calcitriol en la calcificació *in vitro* les CMLV procedents de ratolins wild type i 1 α hidroxilasa KO es van incubar amb medi amb fòsfor elevat i es van tractar amb un 15% de sèrum normal i sèrum urèmic respectivament durant 6 dies. A l'estudiar-ne la calcificació, s'observa que només les cèl·lules WT tractades amb sèrum urèmic incrementen significativament el contingut en calci (Figura 32A) (WT:3452.50 \pm 498.07; KO: 510.72 \pm 94.82 μ gCa/mg proteïna. n=6 to 8, P <0.05).

En un altre experiment les CMLV es van tractar amb medi amb fòsfor elevat i amb o sense calcitriol (10⁻⁷M). Els resultats mostren un augment més elevat en el contingut de calci en les cèl·lules wild type i 1 α hidroxilasa KO tractades amb calcitriol. (32B).

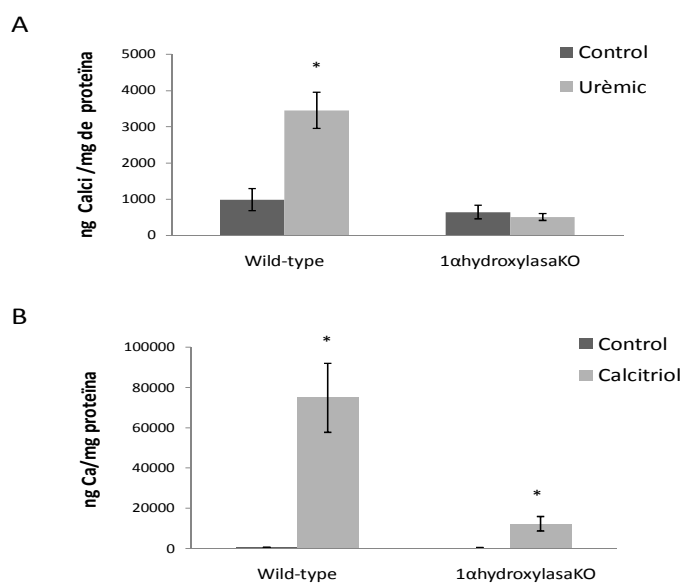


Figura 32.- Quantificació del calci en CMLV. (A) Contingut de calci normalitzat per mg de proteïna en CMLV procedents de ratolins wild type i 1 α hidroxilasa KO tractades amb fòsfor elevat i sèrum control o urèmic durant 6 dies. (B) Contingut de calci normalitzat per mg de proteïna en CMLV procedents de ratolins wild type i 1 α hidroxilasaKO tractats amb fòsfor elevat i calcitriol (10⁻⁷M) durant 6 dies. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm eem (n=6 a 8), * p<0,05 significativament diferent respecte les CMLV amb medi calcificant (control) o sèrum normal.

2.2.2- Estudi de l'expressió de proteïnes i gens implicats en el metabolisme de la vitamina D i de la calcificació en CMLV procedents de ratolins wild type i 1 α KO per efecte de la urèmia:

Les CMLV de ratolins wild type i 1 α hidroxilasa KO es van incubar durant 6 dies amb medi amb fòsfor elevat i es van tractar amb sèrum normal o sèrum urèmic de rata. La proteïna es va recollir i es van fer western blots per detectar l'expressió de Runx2, VDR, 1 α hidroxilasa i 24-hidroxilasa.

Observem un augment de l'expressió de Runx2, de VDR, de la 1 α hidroxilasa i de la 24hidroxilasa en CMLV WT tractades amb sèrum urèmic, mentre que en les 1 α KO no s'observa aquest augment per efecte de la urèmia (Figura 33).

Es va analitzar també l'efecte de la urèmia en les CMLV WT de ratolí sobre l'expressió de gens, per tal de corroborar els resultats observats en les CMLV de rata. Les CMLV es van tractar amb sèrum control o urèmic durant 48 hores i es va mesurar per RT-PCR l'expressió de la 1 α hidroxilasa i del VDR (Figura 33E i F). Observem en les gràfiques un increment significatiu de la 1 α hidroxilasa en la urèmia i una tendència a disminuir l'expressió del VDR.

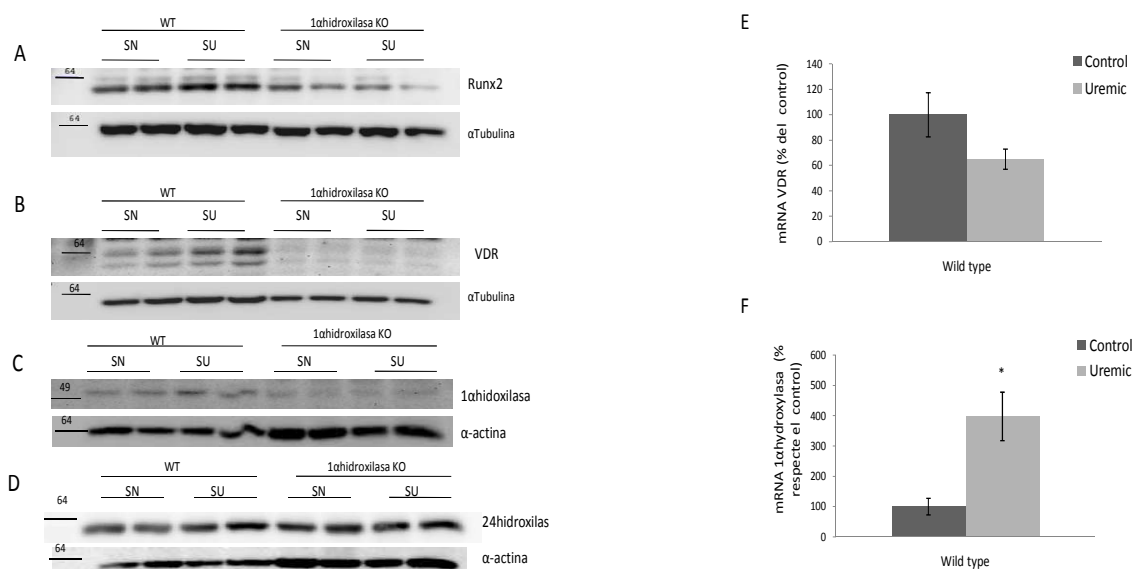


Figura 33.- Western blot en CMLV de ratolins wild type i 1 α hidroxilasa KO. Expressió dels nivells de proteïna de (A) Runx2, (B) VDR, (C) 1 α hidroxilasa, i (D) 24hidroxilasa per western blot en CMLV procedents de ratolins wild type i 1 α hidroxilasa KO tractades amb medi amb fòsfor elevat amb sèrum control o urèmic durant 6 dies. (E) Expressió de mRNA de la 1 α hidroxilasa en CMLV wild type tractades amb sèrum normal (control) i sèrum urèmic durant 48 hores. (F) Expressió de mRNA del VDR en CMLV wild type tractades amb sèrum normal (control) i sèrum urèmic durant 48 hores. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm eem (n=6 a 8), * p<0,05 significativament diferent respecte les CMLV amb sèrum normal (control).

2.2.3- Estudi de la sobreexpressió de la 1 α hidroxilasa en les CMLV i del seu efecte sobre la calcificació vascular.

Per tal d'estudiar l'efecte de la 1 α hidroxilasa sobre la calcificació vascular, les CMLV de rata van ser infectades amb el virus que contenia el vector per la 1 α hidroxilasa (PDSL1 α) per tal que sobreexpressessin aquesta proteïna. Com a control de l'experiment un grup de cèl·lules es van infectar amb el virus que tenia el vector buit. Es va comprovar la sobreexpressió de la 1 α hidroxilasa mitjançant un western blot anti V5 (la nostra proteïna estava fusionada amb l'epítot V5) (Figura 34A) i detectar per RT-PCR l'increment dels nivells de mRNA de la 1 α hidroxilasa (Figura 34B). Observem que la sobreexpressió de la nostra proteïna ha funcionat tant per WB com per RT-PCR. A continuació es va dur a terme un experiment de calcificació, cèl·lules amb el vector PDSL1 α i amb el vector buit, es van tractar amb medi amb fòsfor elevat durant 6 dies. Després es va quantificar el contingut de calci (Figura 34C) com també l'expressió de la proteïna Runx2 per western blot. S'observa un augment significatiu del contingut de calci i de l'expressió de Runx2 en les CMLV que sobreexpressen la 1 α hidroxilasa.

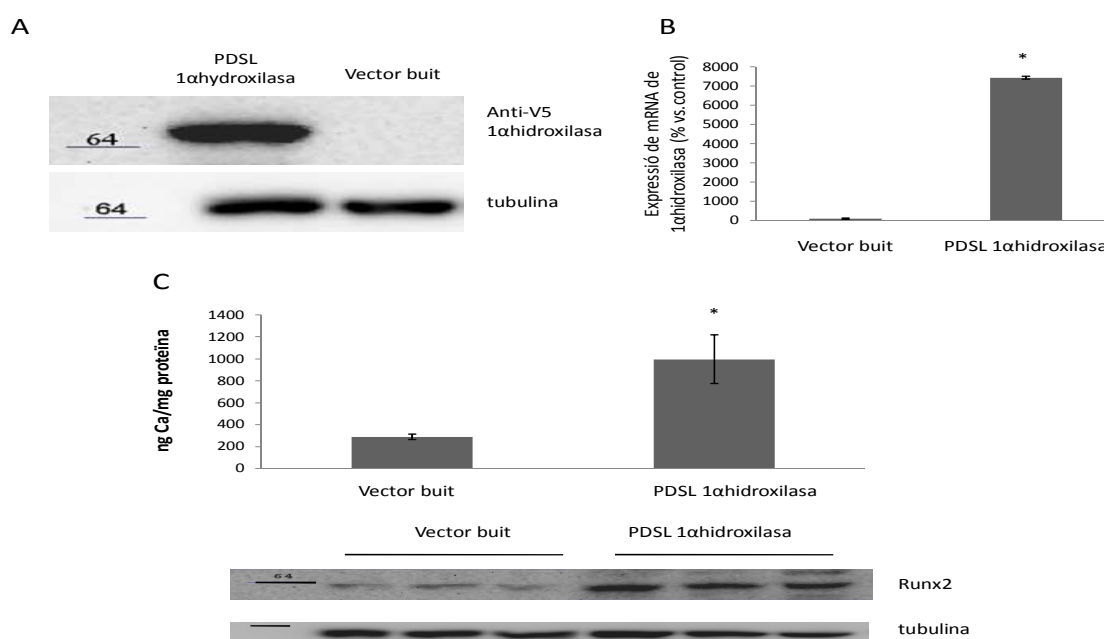


Figura 34.- Efecte de la sobreexpressió de la 1 α hidroxilasa en CMLV de rata sobre la calcificació vascular. (A) Detecció per western blot mitjançant l'anticòs anti V5, de la 1 α hidroxilasa en CMLV infectades amb el virus que contenia el vector per la 1 α hidroxilasa (PDSL1 α) i virus amb el vector buit. (B) Detecció per RT-PCR de l'increment dels nivells de mRNA de la 1 α hidroxilasa en CMLV infectades amb el virus que contenia el vector per la 1 α hidroxilasa (PDSL1 α) i virus amb el vector buit. (C) Quantificació química del calci normalitzat pel contingut en proteïna i detecció de l'expressió de Runx2 en CMLV de rata amb el vector buit o PDSL 1 α tractades amb medi amb fòsfor elevat durant 6 dies. Els resultats són expressats com a mitjana \pm eem (n=10 a 12). *p< 0,05 significativament diferent respecte CMLV sense la sobreexpressió de la 1 α hidroxilasa.

3.- EFECTE DIRECTE DE LA 25 HIDROXIVITAMINA D EN LA REGULACIÓ DE GENS I DEL METABOLISME MINERAL EN LA URÈMIA. EFECTE SOBRE LA CALCIFICACIÓ VASCULAR.

Un estudi dosi resposta es va dur a terme en ratolins KO 1α hidroxilasa nefrectomitzats (reducció del 75% de la massa renal) utilitzant 25, 50, i 100 ng/g de $25(\text{OH})\text{D}_3$ per tal d'estudiar l'eficàcia de la 25hidroxivitaminaD en l'activació del VDR comparant-ho amb una dosi de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (50pg/g). Les dosis de $25(\text{OH})\text{D}_3$ utilitzades es basen en la seva menor afinitat pel VDR, de 200 a 500 vegades inferiors en comparació amb la $1,25\text{D}$. Una part d'aquest procés experimental es va realitzar en col·laboració amb el grup de fisiologia del centre de Biologia Molecular de Nijmegen, dirigit pel Dr. René Bindels i Dr. Joost Hoenderop.

3.1.-ESTUDI EN RATOLINS 1α HIDROXILASA KO:

3.1.1-Nivells de Ca^{2+} , fòsfor, PTH i $25(\text{OH})\text{D}_3$ en sèrum de ratolins 1α hidroxilasa KO:

Per tal d'estudiar la capacitat de la $25(\text{OH})\text{D}_3$ en la regulació del metabolisme mineral sense ser convertida a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ es van utilitzar ratolins knockouts per la 1α hidroxilasa.

Els ratolins 1α hidroxilasa KO van ser nefrectomitzats a les vuit setmanes i al cap de 15 dies se'ls va administrar intraperitonealment tres dosis 25, 50, 100 ng/g de $25(\text{OH})_2\text{D}_3$, i una dosi de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (50pg/g) durant 4 setmanes, període requerit per a normalitzar el calci en sang en els 1α KO. Durant el procés experimental els ratolins es van alimentar amb dieta normal, per no interferir amb els tractaments.

Al finalitzar l'experiment es van sacrificar els animals i amb el sèrum obtingut es va mesurar els nivells de Ca^{2+} , fòsfor, PTH i $25(\text{OH})\text{D}_3$.

Els ratolins KO sham i 1α KO nx són hipocalcèmics amb valors similars de calci en sèrum entre 6-7 mg/dl i valors similars de 25OHD_3 (Figura 35). La normalització del calci en sèrum (nivells normals de calci entre 9 -10,5 mg/dl) es produeix amb les dosis de 25ng/g i 50 ng/g de $25(\text{OH})\text{D}_3$ (35A). Mentre que la dosi més alta de 25OHD_3 augmenta els nivells de calci per sobre dels valors normals. Els nivells de P són baixos en KO sham i en KO nx, amb els tractaments de $1,25\text{D}$ i de 25D (25ng/g i 50ng/g) es produeix un augment significatiu del P fins als nivells normals (35B). La dosi més alta de 25D produeix un augment que sobrepassa els nivells normals de P.

Resultats

Els ratolins 1 α hidroxilasaKO presenten un hiperparatiroidisme secundari sever amb PTH extremadament elevada. S'observa un efecte similar en la reducció de la PTH amb 50 ng/g de 25D i amb la 1,25D. La dosi més baixa de 25D és inefectiva per disminuir la PTH mentre que la dosi més alta produeix una reducció de la PTH per sota dels valors normals (35C). Els nivells de 25OHD₃ augmenten molt amb els tractaments de 25D, fins assolir valors entre 3000-5000 ng/ml (35D).

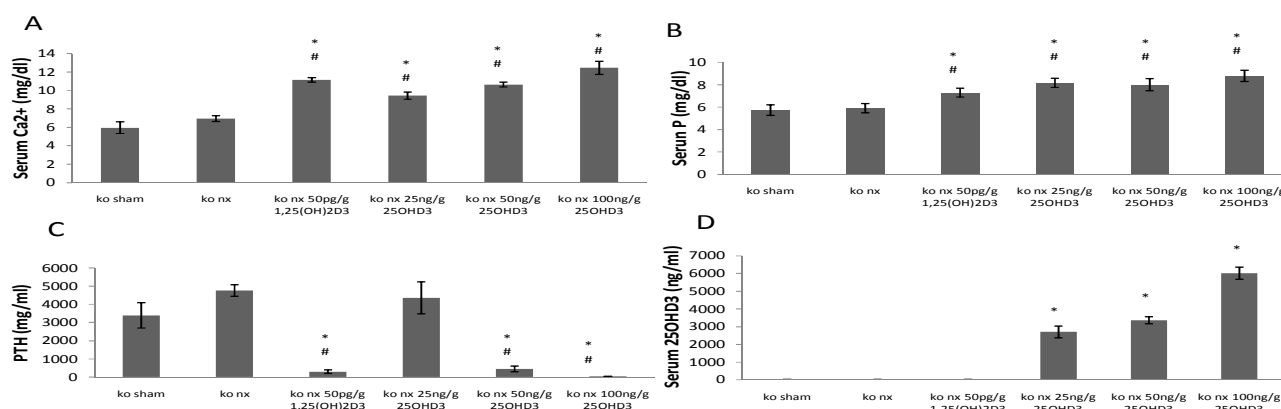


Figura 35.- Nivells de calci, fòsfor, PTH i 25(OH)D₃ en sèrum dels ratolins 1 α hidroxilasa KO. A) Calci, B) P, C) PTH i D) 25OHD₃ en sèrum de ratolins 1 α hidroxilasa KO nefrectomitzats i tractats amb tres dosis 25, 50, 100 ng/g de 25(OH)D₃ i una dosi de 1,25(OH)₂D₃ (50pg/g) durant 4 setmanes. Els valors estan representats com a mitja \pm eem *p<0,05 vs. 1 α hidroxilasa KO nx tractat amb vehicle (control), # p<0,05 vs 1 α hidroxilasa KO sham tractat amb vehicle (control), (n= 5 a 7).

	KO sham	KO nx	KONx+50pg/g 1,25(OH) ₂ D ₃	KO nx+25ng/g 25(OH) ₂ D ₃	KO nx+50ng/g 25(OH) ₂ D ₃	KO nx+100ng/g 25(OH) ₂ D ₃
Ca ²⁺ (mg/dl)	5,95 \pm 0,62	6,94 \pm 0,32	11,15 \pm 0,23 *#	9,43 \pm 0,39*#	10,63 \pm 0,26*#	12,46 \pm 0,71*#
P(mg/dl)	5,75 \pm 0,47	5,91 \pm 0,41	7,31 \pm 0,39*#	8,17 \pm 0,40*#	8,01 \pm 0,53*#	8,79 \pm 0,50*#
PTH (mg/ml)	3394,44 \pm 699,57	4763,19 \pm 318,33	297,65 \pm 97,05*#	4360,58 \pm 883,19	452,05 \pm 159,29*#	34,64 \pm 7,79*#
25OHD ₃ (ng/ml)	25,68 \pm 5,21	21,21 \pm 4,18	25,57 \pm 1,66	2702,20 \pm 340,02*#	3362,94 \pm 203,52*#	6015,13 \pm 342,46*#

Taula 1.- Nivells de calci, fòsfor, PTH i 25(OH)₂D₃ en sèrum dels ratolins 1 α hidroxilasa KO. Calci, P, PTH i 25OHD₃ en sèrum de ratolins 1 α hidroxilasa KO nefrectomitzats i tractats amb tres dosis 25, 50, 100 ng/g de 25(OH)₂D₃ i una dosi de 1,25(OH)₂D₃ (50pg/g) durant 4 setmanes. Els valors estan representats com a mitja \pm eem *p<0,05 vs 1 α hidroxilasa KO nx tractat amb vehicle (control), # p<0,05 vs 1 α hidroxilasa KO sham tractat només amb vehicle (control). (n= 5 a 7).

Resultats

3.1.2.-Expressió dels transportadors de Ca^{2+} en el ronyó:

Vam estudiar l'efecte de la 25D sobre els transportadors de calci, per tal de veure si l'augment del calci plasmàtic que em observat anteriorment està mediat pels transportadors de calci.

Es van examinar els nivells de mRNA dels gens transportadors de calci (TRPV5, Calbindina-D28k, NCX1 i PMCA1b) en el ronyó utilitzant la PCR quantitativa (Figura 36). Observem que els efectes de la 1,25D són imitats per la 25D (50ng/g, 100ng/g), augmentant cap a dues vegades l'expressió de mRNA de TRPV5 respecte els nivells del KO sham o del KO nefrectomitzat tractat amb vehicle (36A). L'expressió de la calbindina-D28k incrementa (1,5-2 cops) per la 1,25D i aquest efecte es imitat per les tres dosis de 25D sense haver-hi diferències entre elles (36C). Els nivells de mRNA de PMCA1b també augmenten significativament amb els tractaments (36B). En canvi, no hi han variacions en els nivells d'expressió de NCX1 (36D).

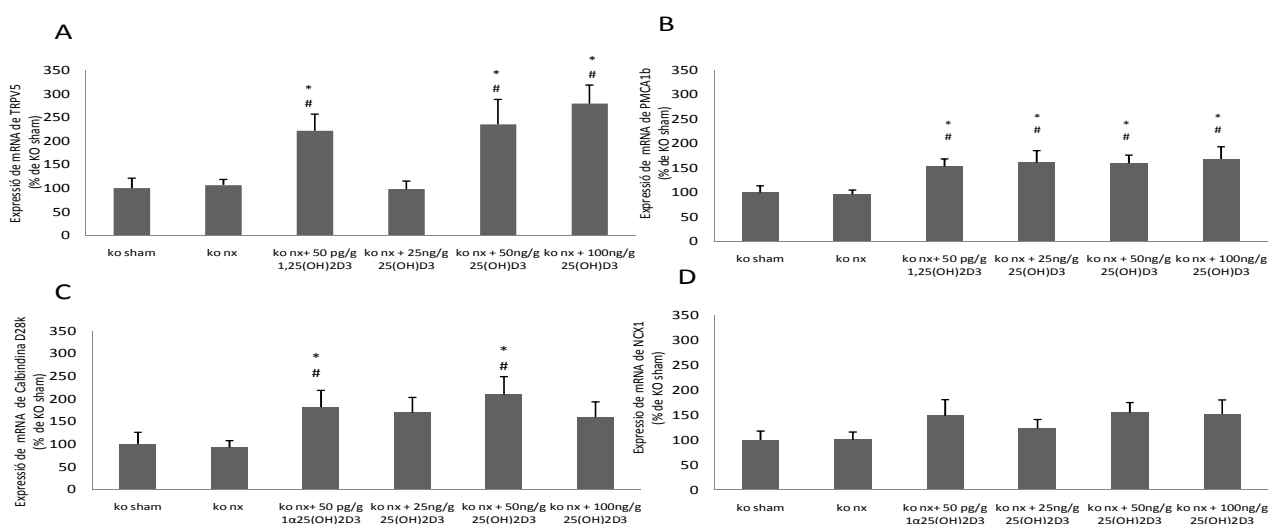


Figura 36.- Expressió dels gens transportadors de calci a nivell renal per la 25OHD₃ i la 1,25(OH)₂D₃. Expressió de mRNA determinat per RTPCR dels gens transportadors del calci renal, incluint (A) TRPV5, (C) calbindina-D28k, (B) PMCA1b i (D) NCX1 en ratolins KO per la 1αhidroxilasa nefrectomitzats i tractats amb tres dosis 25, 50, 100 ng/g de 25(OH)D₃ i una dosis de 1,25(OH)₂D₃ (50pg/g) durant 4 setmanes. Els valors estan calculats en referència als nivells de RNA de GAPDH i s'expressen de forma relativa a als nivells de 1αhidroxilasa -/- sham. Els resultats es presenten com a mitjana ± eem (n=5 a 7). * p<0,05, significativament diferent del KO per la 1αhidroxilasa nefrectomitzat tractat amb vehicle (control) i # p<0,05, significativament diferent del KO 1αhidroxilasa sham tractat amb vehicle (control).

Resultats

L'anàlisi dels nivells de proteïna al ronyó es va realitzar per immuno fluorescència i per western blot. En la immunofluorescència es mostra com el TRPV5 es localitza a la membrana apical del túbul contornejat distal (DCT) i en el túbul connector (CNT). Els nivells de TRPV5 augmenten lleugerament amb la 1,25D i amb la dosi més petita de 25D comparat amb el control (KO nefrectomitzat). Les altres dues dosis sí que augmenten significativament la seva expressió.

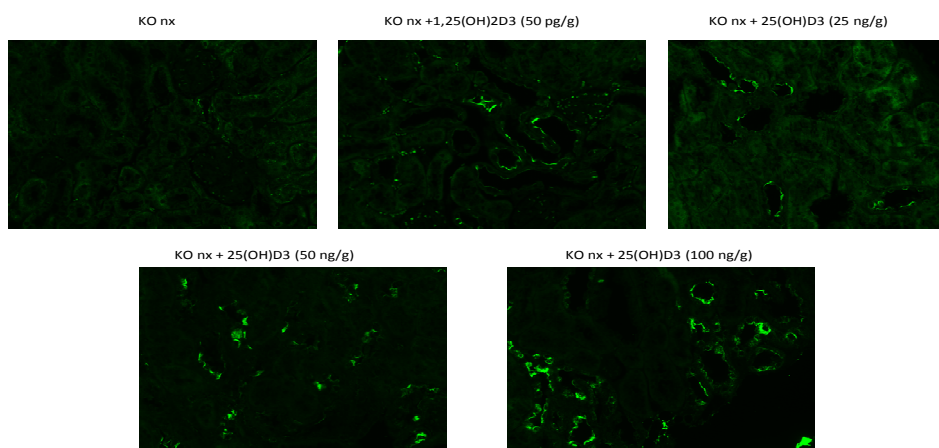


Figura 37.- Comparació de la potència de la 1,25(OH)₂D₃ i 25(OH)D₃ per induir l'expressió de la proteïna renal TRPV5 en un ratolí 1 α hidroxilasa KO. Detecció de l'expressió renal de la TRPV5 per immunohistoquímica en ratolins 1 α hidroxilasaKO nx van ser tractats amb tres dosis de 25OHD₃ (25, 50, i 100 ng/g) i una dosi de 1,25OH₂D₃ (50pg/g) durant 4 setmanes. Es mostra una imatge representativa d'una immunohistoquímica de TRPV5 (en verd) en el cortex renal (n=6).

L'expressió de la calbindina-D28k es va examinar amb immunoblots i amb immunohistoquímica. La figura 38A mostra un immunoblot representatiu de l'expressió de la calbindina-D28k en el ronyó de ratolins 1 α hidroxilasa KO nefrectomitzats tractats amb 1,25D o diferents dosis de 25D. El contingut de proteïna augmenta amb el tractament amb 1,25D i 25D, sense una diferència aparent entre les tres dosis de 25D. La quantificació de la intensitat de la banda mostra un increment entre 3 a 5 cops la up-regulació de l'expressió de la calbindina-D28k amb el tractament. La immunohistoquímica també mostra (Figura 38B) la localització de la calbindina-D28k al túbul contornejat distal (DCT) i al túbul connector (CNT) del còrtex renal. Observem, que els ratolins tractats amb 1,25D i 25D mostren un increment en la intensitat i el numero de cèl·lules tenyides positivament per la calbindina-D28k (fluorescència verda) en el citosol.

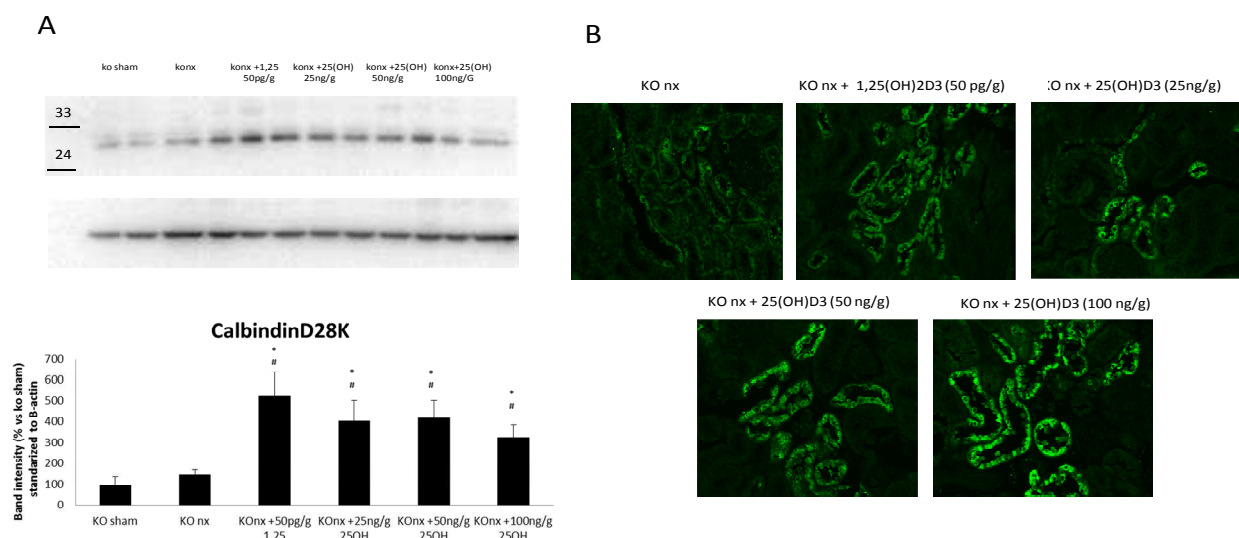


Figura 38.- Comparació de l'efecte de la 1,25(OH)₂D₃ i de la 25(OH)D₃ per induir l'expressió renal de la calbindina-D28k en el ratolí 1αhidroxilasa KO. (A) Western blot representatiu de la calbindina-D28k i quantificació de la intensitat de les bandes (n=6) en els ratolins 1αhidroxilasaKO nx tractats amb tres dosis de 25OHD₃ (25, 50, i 100 ng/g) i una dosis de 1,25OH₂D₃ (50pg/g) durant 4 setmanes. La β-actina es va utilitzar com a control de la càrrega. (B) Immunohistoquímica representativa de la calbindina-D28k (verd) en el cortex renal, (n=6). Els resultats es presenten com a mitjana ± eem (n=5 a 7). * p<0,05, significativament diferent del KO per la 1αhidroxilasa nefrectomitzat tractat amb vehicle (control) i # p<0,05, significativament diferent del KO 1αhidroxilasa sham tractat amb només vehicle (control).

3.1.3.-Expressió de transportadors de Ca²⁺ en el duodè:

A continuació vam investigar si el tractament amb 25D podia imitar la 1,25D en incrementar l'expressió dels gens que codifiquen per a proteïnes transportadores de calci i que medien l'absorció de calci transcel·lular en el duodè.

Es va analitzar l'expressió a nivell de mRNA del TRPV6, la calbindinaD9k i PMCA1b en el duodè. Vam observar que l'administració de 1,25D produïa un augment de 4-5 cops els nivells de mRNA del TRPV6 mentre que la 25D augmentava significativament TRPV6 però només 1,5 cops amb la dosis més baixa i 2 cops amb la dosis intermitja i alta. La calbindina-D9K s'up-regulava amb 50 i 100 ng/g de 25D (2 cops), amb una potència similar a la 1,25D (Figura 39). No vam observar diferències en els nivells de mRNA que codifiquen per PMCA1b.

Resultats

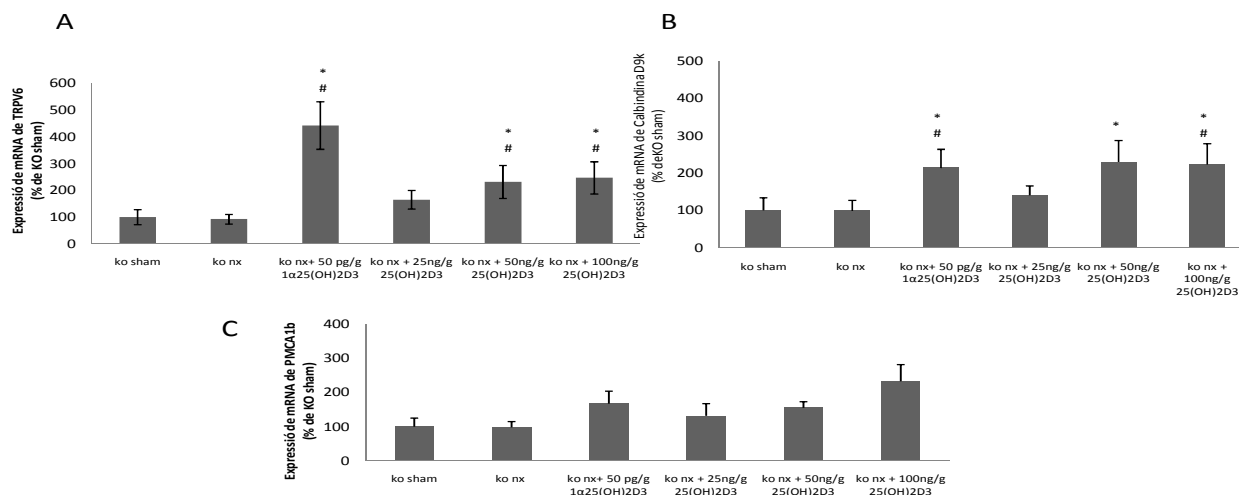


Figura 39.- Comparació de 1,25(OH)₂D₃ i 25(OH)D₃ per la inducció de l'expressió de gens transportadors de calci al duodè.

Detecció de l'expressió de mRNA mitjançant RTPCR al duodè de (A) TRPV5, (B) CalbindinaD9k i (C) PMCA1b en ratolins 1αhidroxilasaKO nx tractats amb tres dosis de 25OHD₃ (25, 50, i 100 ng/g) i una dosis de 1,25OH₂D₃ (50pg/g) durant 4 setmanes. Els valors són calculats en referència als nivells de GAPDH de mRNA. Els resultats es presenten com a mitjana ± eem (n=5 a 7). * p<0,05, significativament diferent del KO per la 1αhidroxilasa nefrectomitzat tractat amb vehicle (control) i # p<0,05, significativament diferent del KO 1αhidroxilasa sham tractat només amb vehicle (control).

La calbindina-D9k també es va analitzar al duodè a nivell de proteïna per wertern blot. L'expressió de la calbindina-D9k augmenta amb el tractament amb 1,25D i també amb 25D en totes les dosis. (Figura 40).

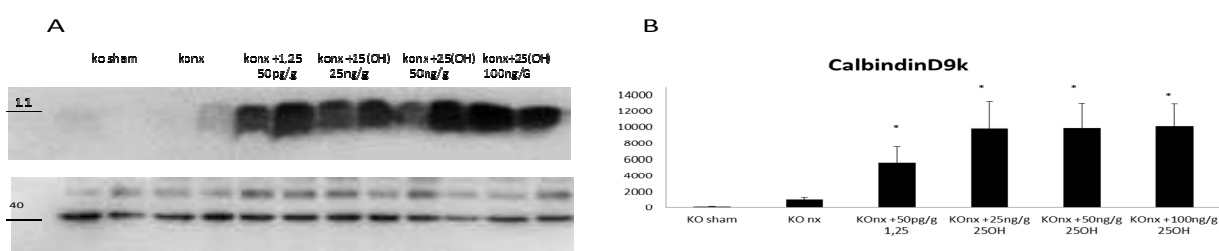


Figura 40.- Comparació de l'eficàcia de les dosis de 1,25(OH)₂D₃ i de 25(OH)D₃ en l'expressió de calbindina-D9k en el duodè del ratolí 1αhidroxilasa KO.

(A) Western blot representatiu i quantificació de la intensitat de les bandes (B) de la calbindinaD9k a partir de proteïna de duodè de ratolins 1αhidroxilasaKO nx tractats amb tres dosis de 25OHD₃ (25, 50, i 100 ng/g) i una dosis de 1,25OH₂D₃ (50pg/g) durant 4 setmanes (n=6). El control de càrrega es va fer amb la βactina. Els resultats es presenten com a mitjana ± eem (n=5 a 7). * p<0,05, significativament diferent del KO per la 1αhidroxilasa nefrectomitzat tractat amb vehicle (control) i # p<0,05, significativament diferent del KO 1αhidroxilasa sham tractat amb només vehicle (control).

3.1.4.- Calcificació vascular en els ratolins 1 α hidroxilasa KO:

Després de tractar els ratolins 1 α hidroxilasaKO nx amb tres dosis de 25OHD₃ (25, 50, i 100 ng/g) i una dosis de 1,25OH₂D₃ (50pg/g) durant 4 setmanes, es va quantificar el contingut en calci en les artèries com també es va fer una tinció amb vermell d'alizarina, per tal d'estudiar si els tractaments amb 1,25D i 25D havien produït algun efecte tòxic, mesurant-ne la calcificació vascular. Com s'observa en la (Figura 41A) no hi han diferències significatives en els nivells de calci entre els diferents grups de ratolins. Tampoc s'observen diferències en les artèries que han estat tenyides amb vermell d'alizarina (Figura 41B).

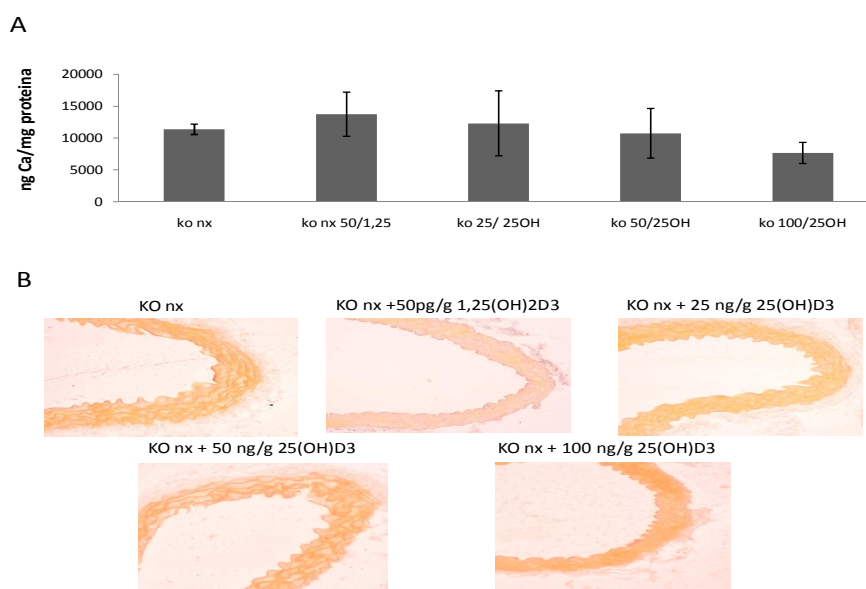


Figura 41.- Efecte sobre la calcificació vascular de la 25OHD₃ i de la 1,25(OH)₂D₃ en ratolins 1 α hidroxilasaKO. (A) Quantificació química del contingut de calci arterial expressada com a ng de calci/mg de proteïna. (B) Imatge representativa de la tinció de l'artèria aorta amb vermell d'alizarina. (n=6), en ratolins 1 α hidroxilasaKO nx tractats amb tres dosis de 25OHD₃ (25, 50, i 100 ng/g) i una dosis de 1,25OH₂D₃ (50pg/g) durant 4 setmanes. Els resultats es presenten com a mitjana \pm eem (n=5 a 7).

3.2.-ESTUDI EN RATOLINS WILD TYPE:

Es va realitzar un estudi similar a l'anterior utilitzant ratolins wild type nefrectomitzats i amb una dieta alta en fòsfor, els quals es van tractar amb diferents dosis de 25(OH)D₃ (5ng/g, 10ng/g, 25ng/g, 50ng/g) durant 4 setmanes. Les dosis es van escollir a partir de les utilitzades en els 1 α OHasaKO i tenint en compte que els wild type necessitaràn una dosis inferior de 25(OH)D₃ ja que tenen la capacitat de convertir la 25D a 1,25D.

Es volia estudiar l'efecte de les diferents dosis de 25D en la correcció del calci, el fosfat i la PTH en sang i l'impacte que podria tenir sobre la calcificació vascular en ratolins que poden convertir la 25D a 1,25D. D'aquesta manera podríem determinar l'efecte tòxic del tractament amb 25(OH)D₃ en un model de MRC que es similar als pacients.

3.2.1.- Nivells de Ca²⁺, fòsfor, PTH i 25(OH)₂D₃ en sèrum de ratolins wild type:

Després de tractar els ratolins wild type nx amb 25(OH)D₃ (5ng/g, 10ng/g, 25ng/g, 50ng/g) es va recollir el sèrum i es va quantificar el Ca²⁺, el fòsfor, la PTH i la 1,25D.

En el sèrum, els nivells de calci augmenten significativament amb els tractaments amb 10, 25 i 50ng/g de 25D. El fòsfor augmenta significativament en els grups que han rebut dieta alta en fòsfor. Els nivells de PTH que són elevats en els ratolins WT nefrectomitzats disminueix amb el tractament, però amb les dosis més altes (50ng/g) aquests nivells de PTH tendeixen a tornar a augmentar. S'observa també com la 25D s'incrementa de forma significativa amb les 3 dosis més altes (Figura 42 i Taula 2).

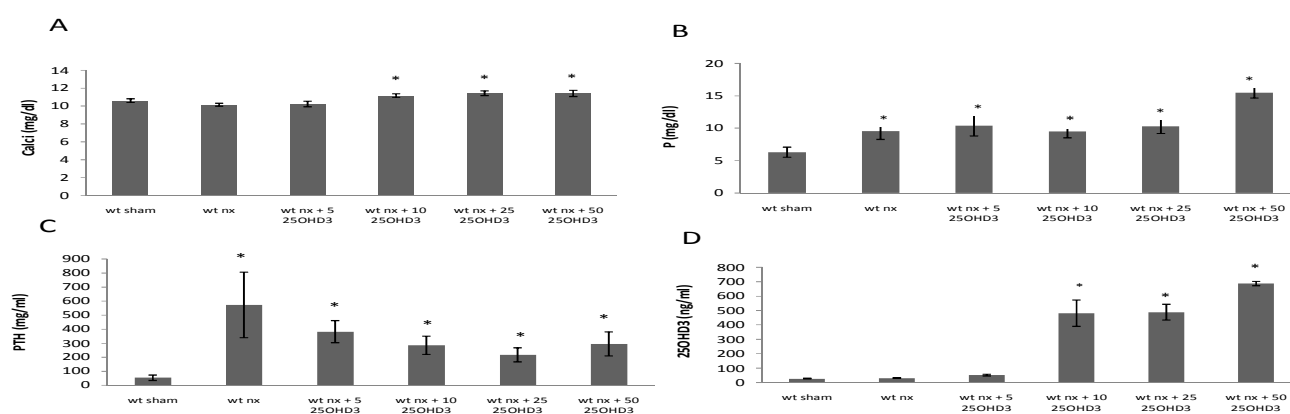


Figura 42.- Quantificació bioquímica dels nivells de calci, fòsfor, PTH i 25(OH)₂D₃ en sèrum de ratolins wild type. Nivells de (A) Ca²⁺, (B) fòsfor, (C) PTH i (D) 1,25D quantificats en sèrum de ratolins wild type nx i tractats amb 25(OH)D₃ (5ng/g, 10ng/g, 25ng/g, 50ng/g). Els valors estan representats com a mitja \pm eem *p < 0,05 vs WT sham (control).

Resultats

	WT Sham	WT nx	WT nx +5ng/g 25OHD ₃	WT nx+10ng/g 25OHD ₃	WT nx+25ng/g 25OHD ₃	WT nx+50ng/g 25OHD ₃
Ca ²⁺ (mg/dl)	10,61±0,21	10,15±0,16	10,23±0,32	11,17±0,20*	11,43±0,26*	11,41±0,34*
P (mg/dl)	6,30±0,78	9,58±1,31*	10,40±1,61*	9,52±1,00*	10,29±1,13*	15,50±0,85*
PTH (mg/ml)	53,89±19,15	572,69±239,16*	382,96±78,71*	285,08±64,95*	216,94±50,11*	294,79±85,53*
25OHD ₃ (ng/ml)	27,97±2,31	31,28±1,30	51,77±6,15	482,25±91,66*	488,85±54,83*	688,01±15,36*

Taula2.- Nivells de calci, fòsfor, PTH i 25(OH)₂D₃ en ratolins Wild type. Nivells de Ca²⁺ (A), fòsfor (B), PTH (C) i 1,25D (D) quantificats en sèrum de ratolins wild type nx i tractats amb 25(OH)₂D₃ (5ng/g, 10ng/g, 25ng/g, 50ng/g). Els valors estan representats com a mitja ± eem *p< 0,05 vs WT sham (control).

3.2.2.-Proteïnúria i microalbuminúria en ratolins WT i 1αhidroxilasa KO.

Per tal d'obtenir informació de l'estat del ronyó i de la presència de dany renal es va mesurar la proteïnúria i la microalbuminúria en els ratolins wild type i 1αhidroxilasa KO.

Els ratolins wild type nx i tractats amb 25(OH)₂D₃ (5ng/g, 10ng/g, 25ng/g, 50ng/g) es van posar en gàbies metabòliques per a recollir-ne la seva orina durant 24 hores. Analitzant l'orina dels ratolins WT s'observa, com és d'esperar que tots aquells que han estat nefrectomitzats presentin un augment en la microalbuminúria (Figura 43A), els tractaments amb 25(OH)₂D₃ tendeixen a augmentar la microalbuminúria. En canvi, els ratolins 1αhidroxilasa KO nx tenen una proteïnúria elevada i quan són tractats amb 25(OH)₂D₃, la proteïnúria disminueix significativament (Figura 43B).

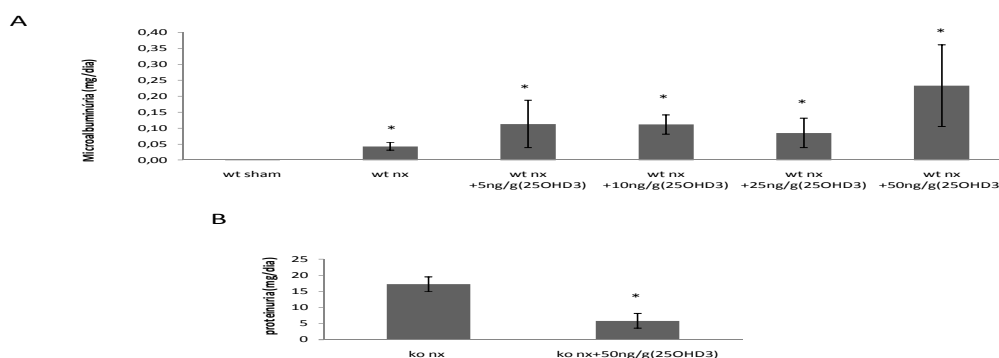


Figura 43.- Determinació de la microalbuminúria i de la proteïnúria en ratolins wild type i 1αhidroxilasa KO. (A) Microalbuminúria en ratolins wild type nx tractats amb 25(OH)₂D₃ (5ng/g, 10ng/g, 25ng/g, 50ng/g) durant 4 setmanes i (B) proteïnúria en ratolins 1αhidroxilasa ko nx tractats amb 25(OH)₂D₃ (50ng/g) quatre setmanes mesures a partir de l'orina recollida a les 24 hores amb gàbies metabòliques. Els valors estan representats com a mitja ± eem *p< 0,05 vs WT sham (control)/ko nefrectomitzat.

3.2.3.- Estudi de la calcificació vascular en els ratolins wild type:

Per tal d'estudiar l'efecte tòxic en els ratolins wild type nx amb 25(OH)D₃ (5ng/g, 10ng/g, 25ng/g, 50ng/g) es va procedir a estudiar-ne el seu efecte sobre la calcificació vascular.

S'observa un augment significatiu del contingut de Ca²⁺ (ng Ca/mg proteïna) en els ratolins que han estat tractats amb 25D (Figura 44A). En la tinció amb vermell d'alizarina observem un increment de la coloració taronja-vermella en els grups tractats amb les dues dosis més elevades de 25D (44B).

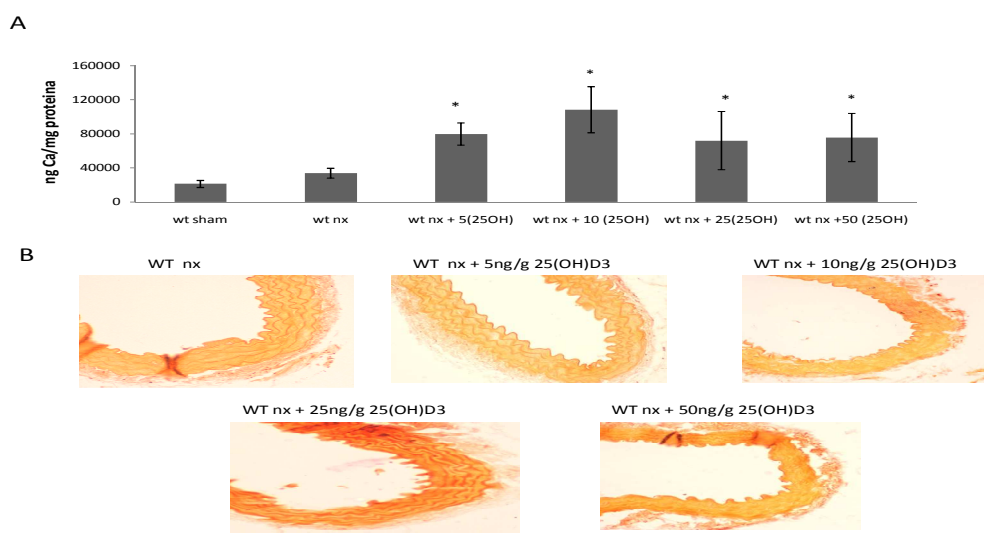


Figura 44.- Efecte de la 25OHD₃ sobre la calcificació vascular en ratolins wild type. A) Quantificació química del calci expressada com a ng de calci/mg de proteïna. (B) Imatge representativa de la tinció de l'artèria amb vermell d'alizarina. (n=6). Es van fer servir ratolins wild type nx tractats amb 25(OH)D₃ (5ng/g, 10ng/g, 25ng/g, 50ng/g) durant 4 setmanes. Els resultats es presenten com a mitjana ± eem (n=5 a 7). *p<0,05, significativament diferent del KO per la 1 α hidroxilasa nefrectomitzat tractat amb vehicle (control).

3.3.- IN VITRO:

3.3.1.- Efecte de la 1,25(OH)₂D₃ i de la 25OHD₃ en les CMLV wild type i 1 α hidroxilasa KO:

Es va estudiar l'efecte dels tractaments amb 1,25D i 25D en les CMLV de ratolins wild type i 1 α hidroxilasa KO, per tal de veure si la 25D podia tenir el mateix efecte que la 1,25D sobre l'expressió de gens implicats en el metabolisme de la vitamina D en aquest tipus cel·lular.

Resultats

Les CMLV es van tractar en medi DMEM amb 1,25D (10^{-8} M) i amb 25D (10^{-6} M) durant 24 hores i es va mesurar l'expressió de mRNA per RTPCR de la 24hidroxilasa i del VDR. Després es van tractar les mateixes cèl·lules durant 48 hores i es va quantificar per western blot l'expressió de VDR.

Els nivells de mRNA de la 24 hidroxilasa augmenten de forma significativa en els ratolins wild type i també en els ratolins 1 α hidroxilasa KO tractats amb 1,25D i 25D (Figura 45 A). Els nivells de VDR també augmenten significativament amb els dos tractaments en els dos ratolins (Figura 45B). Per western blot també s'observa que ambdós tractaments incrementen l'expressió del VDR (Figura 45C).

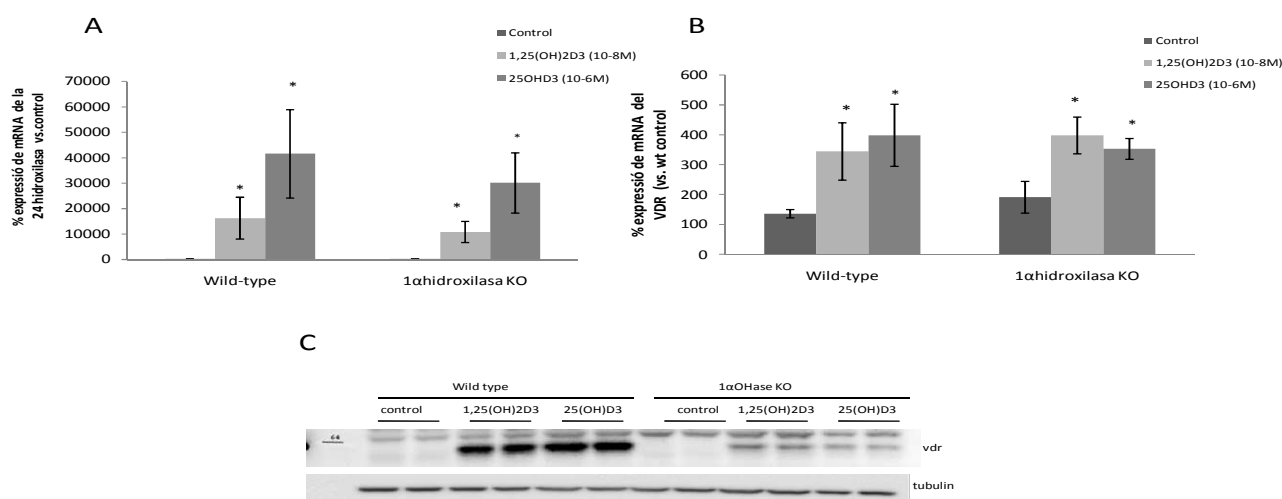


Figura 45.- Efecte de la 1,25(OH)₂D₃ i de la 25OHD₃ en les CMLV wild type i 1 α hidroxilasa KO. (A) Expressió de mRNA de la 24hidroxilasa en CMLV procedents de ratolins wild type i 1 α hidroxilasa KO tractades en medi DEMEM amb 1,25D (10^{-8} M) i amb 25D (10^{-6} M) durant 24 hores. (B) Expressió de mRNA del VDR en CMVL de ratolins wild type i 1 α hidroxilasaKO tractades en medi DEMEM amb 1,25D (10^{-8} M) i amb 25D (10^{-6} M) durant 24 hores. La GAPDH es va utilitzar com a control. (C) Representació del western blot del VDR de CMLV que han estat tractades amb medi DMEM durant 48 hores amb 25D (10^{-8} M) i 25D (10^{-6} M), com a control de càrrega s'utilitza l' α -tubulina. Els resultats es presenten com a mitjana \pm eem (n=5 a 7). * p<0,05, significativament diferent respecte CMLV del wild type control i del 1 α hidroxilasa control.

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

1.- REGULACIÓ DE LA FUNCIÓ RENAL I DELS GENS IMPLICATS EN EL METABOLISME DE LA VITAMINA D EN LA URÈMIA.

En la malaltia renal crònica, la disminució de la funció renal té una sèrie de conseqüències importants: el síndrome urèmic, l'hiperfosfatèmia, l'hiperparatiroidisme secundari i malalties cardiovasculars incloent en elles les calcificacions vasculares. La malaltia cardiovascular és una de les causes més freqüents de morbiditat i mortalitat en pacients amb malaltia renal crònica. En la població amb diàlisi l'aterosclerosi accelerada juntament amb la calcificació vascular són complicacions comuns. Els mecanismes pels quals la urèmia promou la calcificació vascular són poc coneguts i estan poc estudiats.

Els pacients amb malaltia renal crònica mostren un augment en la proliferació de CMLV, que pot donar lloc a complicacions arterials²²⁰. Aquests pacients es tracten amb calcitriol i el seu anàleg paricalcitol per disminuir l'hiperparatiroidisme secundari. Cardús et. al¹⁹ mostren que el calcitriol, té un efecte proliferatiu sobre les CMLV mentre que el paricalcitol té una menor resposta proliferativa. També mostren que el calcitriol presenta un efecte calcificant superior en les CMLV respecte el paricalcitol¹⁹. Aquestes diferències entre els dos fàrmacs, semblen indicar que l'augment de la supervivència demostrat pel paricalcitol pot ser degut a diferents efectes en la vasculatura²²¹. Els beneficis de la supervivència del paricalcitol podrien estar lligats a les accions no clàssiques de VDRA, el paricalcitol regula paràmetres cardiovasculars i renals més favorablement que els VDRA no selectius.

En el nostre estudi volíem veure quin efecte produeix la urèmia i els tractaments amb calcitriol o paricalcitol en les CMLV, com es regulen alguns dels gens del metabolisme de la vitaminaD i com afecta a la calcificació vascular.

Els tractaments amb calcitriol i paricalcitol en les rates urèmiques afecten a la concentració de calci en el sèrum, que ha augmentat, també hi ha hagut un augment significatiu en l'eliminació urinària de calci en el grup tractat amb calcitriol i paricalcitol respecte el grup urèmic. En condicions normals, el grup nefrectomitzat no pot sintetitzar el calcitriol correctament, es produeix hipocalcèmia i un augment de la PTH que fa augmentar la reabsorció de calci en el ronyó i la desmineralització de l'os. Quan es tracten amb calcitriol i paricalcitol s'incrementa la concentració de calci en sèrum per un augment de la seva absorció

intestinal, l'increment de calci fa bloquejar la producció de PTH, fet que fa augmentar l'eliminació urinària de calci per intentar equilibrar-ne els nivells.

Com mostren els nostres resultats, el fòsfor tendeix a acumular-se en malalts renals produint hiperfosfatèmia, ja que el ronyó perd la capacitat per eliminar-lo correctament. L'eliminació urinària de fòsfor que ha disminuït en les rates urèmiques augmenta significativament amb el tractament amb calcitriol, degut a que augmenta també la seva absorció a l'intestí.

Els resultats mostren que en les artèries de rates urèmiques, la urèmia i els tractaments amb calcitriol i paricalcitol augmenten el contingut de calci arterial, però que és el calcitriol el que l'augmenta més, indicant un efecte diferencial dels dos tractaments. A més, *in vitro*, observem com el calcitriol incrementa més l'expressió de la 1α hidroxilasa en les CMLV en condicions urèmiques en comparació amb el paricalcitol fet que podria estar relacionat amb les diferències sobre la calcificació. Aquestes diferències entre els dos compostos, mostren la importància en la seva elecció alhora de tractar els pacients.

Observem que en la urèmia hi ha una alteració del metabolisme de la vitamina D en l'artèria i en les CMLV. Hem observat un augment de l'expressió de la 1α hidroxilasa que podria estar implicada en un augment de la síntesis local de calcitriol. En el nostre estudi *in vivo* observem un efecte similar en l'augment d'aquest gen en la urèmia i amb els tractaments amb calcitriol i paricalcitol en condicions urèmiques, indicant que aquest efecte es probablement atribuït en major part per la urèmia.

La malaltia renal crònica es caracteritza per una disminució dels nivells de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en plasma a causa de la disminució dels nivells de la 1α hidroxilasa renal. En el ronyó, no s'observa un augment dels nivells de la 1α hidroxilasa en la urèmia, que si que observem en l'artèria i CMLV. Alguns articles suggereixen que la regulació de la 1α hidroxilasa es específica de teixit. La regulació de la 1α hidroxilasa en llocs extrarenals és una mica diferent de l'enzim renal, en el manteniment de la funció autocrina i paracrina de la producció local de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ²²². Com observem en els nostres resultats l'activitat de la 1α hidroxilasa en CMLV no es veu inhibida pel tractament amb calcitriol o paricalcitol, indicant aquesta diferent modulació per la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a nivell extra renal.

L'activitat autocrina/paracrina de la 1α hidroxilasa en teixits extrarenals es modula de forma diferent i és menys sensible a l'autoregulació per la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ²²³. Es coneix que els

reguladors clàssics de la 1α hidroxilasa a nivell renal, com són la PTH, o el calci no la estan regulant en els osteoblasts.

Els nivells de síntesis i de degradació de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ estan sota control de factors locals com ara les citoquines, els factors de creixement que optimitzen els nivells de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ per les accions cel·lulars específiques mitjançant mecanismes que no són coneguts¹³⁰. La regulació específica de teixit de la 1α hidroxilasa s'ha observat en altres malalties; l'hipercalcèmia associada a la síndrome granulomatosa de la pell sembla causada per la desregulació de l'expressió de la 1α hidroxilasa en les cèl·lules granulomatoses de l'epidermis i de la dermis²²⁴. En alguns càncers, β limfomes, disgerminomes i càncer de mama, hi ha també una desregulació de l'expressió extra renal de la 1α hidroxilasa.

Estudis mostren com la 1α hidroxilasa s'expressa en altres tipus cel·lulars, Van Driel et al²²⁵ mostra que la 1α hidroxilasa s'expressa també en osteoblasts humans. Anàlisis funcionals mostren que després d'incubar els osteoblasts amb $25(\text{OH})\text{D}_3$ poden produir $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ per modular la seva activitat e induir la fosfatasa alcalina (ALP), osteocalcina (OC) i la mineralització. Altres tipus cel·lulars com els macròfags en individus normals sintetitzen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.²²⁶ En la malaltia renal crònica, els macròfags perifèrics mostren un augment en l'activitat de la 1α hidroxilasa i una disminució de la capacitat per degradar $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. A més, els pacients urèmics tenen una PTH elevada, aquest estímul incrementaria l'expressió de la 1α hidroxilasa.

La desregulació de gens del metabolisme de la vitamina D per la urèmia també s'ha descrit per la 24 hidroxilasa. Koyama et al²²⁷ mostra la inducció en el duodè del gen de la 24hidroxilasa, el qual era superior en rates urèmiques que en rates sham operades. Hsu et al²²⁸ estudien com les toxines urèmiques juguen un paper en la supressió de la degradació del calcitriol. Es sap que en el ronyó la PTH inhibeix l'expressió de la 24hidroxilasa²²⁹. En els nostres experiments la urèmia no augmenta significativament l'expressió de la 24 hidroxilasa en l'artèria ni en el ronyó *in vivo* e *in vitro*. El fet que hi hagi un augment de la síntesi, per la 1α hidroxilasa i no es produeixi increment de la 24hidroxilasa en l'artèria a les CMLV afavoreix un augment en les concentracions locals de calcitriol.

En quant a la regulació del VDR, molts autors mostren una disminució del VDR en la glàndula paratiroides de rata²³⁰, gossos²³¹ i humans amb fracàs renal. A més l'efecte up-regulador de la

1,25(OH)₂D₃ en els nivells de proteïna del VDR en el duodè es troba atenuat en rates urèmiques²³².

Altres estudis mostren com la capacitat d'unió electroforètica al VDR esta reduïda en un 50% quan el receptor s'incuba amb ultrafiltrat urèmic i es compara amb el normal²³³. L'ultrafiltrat urèmic que deriva de pacients en diàlisi inhiuix la interacció del VDR amb el DNA. Estudis *in vivo* amb rates amb fracàs renal mostren una reducció important de la unió del VDR al VDREs comparat amb rates operades sham²³⁴. Szabo et al²³⁵ mostren que la capacitat d'unió de la 1,25D al VDR en l'intestí i la glàndula paratiroides esta fortament reduïda en rates urèmiques.

Nosaltres em observat en rates, una disminució significativa de l'expressió del VDR per efecte de la urèmia en l'artèria tant *in vivo* com *in vitro* a nivell de mRNA, que estaria corroborant els estudis anteriors.

Es sap que les toxines urèmiques estan implicades en la resistència a la 1,25(OH)₂D₃ que s'observa en pacients amb malaltia renal crònica²³⁶. El factor inhibidor de les toxines urèmiques a la unió VDR-VDRE pot donar lloc a la resistència al calcitriol en la malaltia renal. La disminució del contingut de VDR pot ser el responsable de l'augment de la 1 α hidroxilasa, a causa de l'eliminació de la retroalimentació negativa, que observem en l'artèria i en les CMLV en condicions urèmiques.

Aquests resultats indiquen un augment de la producció local de 1,25(OH)₂D₃ en l'artèria en la urèmia, i es relacionen amb altres estudis que mostren com el calcitriol estimula la síntesis de RANKL en les CMLV²³⁷, les quals començaran a expressar marcadors osteogènics i seràn semblants als osteoclasts incrementant així la calcificació vascular^{238,239}.

Com a conclusió, la urèmia produeix una desregulació dels enzims implicats en el metabolisme de la vitamina D, la qual és específica per cada teixit. En CMLV en la urèmia es produeix un augment significatiu de la 1 α hidroxilasa que sembla estar afavorit pel tractament amb calcitriol. Aquest increment, juntament amb la no modificació de la 24hidroxilasa podria incrementar la producció local de la 1,25(OH)₂D₃, la qual podria estar implicada amb la calcificació vascular. Aquests resultats són molt importants per tal d'esbrinar quin és l'efecte d'aquesta síntesis local en la urèmia, i si la 1 α hidroxilasa podria ser un mediador o efector de la calcificació vascular. Aquests estudis, formaran part del segon bloc d'aquesta tesis.

2.- EFECTE DE LA SÍNTESIS LOCAL DE CALCITRIOL PER LA 1 α HIDROXILASA I LA SEVA IMPLICACIÓ EN LA CALCIFICACIÓ VASCULAR EN LA URÈMIA.

La calcificació vascular és comú en pacients amb malaltia renal crònica i contribueix a augmentar la morbiditat i la mortalitat cardiovascular. Els mecanismes que regulen la calcificació vascular s'estan investigant; esta acceptat que la calcificació vascular és un procés actiu i complex on hi intervenen factors que promouen o inhibeixen la calcificació. Les CMLV es transformen cap a cèl·lules semblants a osteoblasts, aquesta transformació s'estimula pel fòsfor elevat, per les BMPs, l'estrès oxidatiu, l'hormona paratiroïdea i el calcitriol. És importat ressaltar que en estudis experimentals on s'han utilitzat models d'urèmia, demostren que el calcitriol estimula el procés de transformació osteoblàstica i accelera la calcificació vascular.

La 1 α hidroxilasa, a part d'expressar-se en el ronyó, també es pot trobar en altres tipus cel·lulars; les cèl·lules epitelials intestinals i de la pell, cèl·lules de la línia monocítica i macròfags,²⁴⁰ cèl·lules dendrítiques, cèl·lules β pancreàtiques, cèl·lules paratiroides, CMLV, cèl·lules endotelials. També està present en diversos teixits com: la pròstata, les mames, el cervell, el colon, el pulmó, l'intestí, l'estómac, els ganglis limfàtics, la placenta i la melsa. La regulació de la 1 α hidroxilasa en teixits extrarenals es modula de forma diferent i és menys sensible a l'autoregulació per la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ ²⁴¹.

A partir dels resultats obtinguts en l'apartat anterior, on la urèmia produeix una desregulació dels gens del metabolisme de la vitamina D, en especial un augment de la 1 α hidroxilasa en CMLV, es pretén estudiar si la 1 α és responsable de la calcificació vascular en la urèmia. Per a realitzar aquests estudis es va utilitzar un ratolí 1 α hidroxilasaKO amb un model de malaltia renal. Ratolins wild type i 1 α hidroxilasaKO es van tractar amb una dosi elevada de calcitriol (400ng/kg), dosi que va ser escollida per que era capaç d'igualar els nivells plasmàtics de 1,25(OH) $_2$ D $_3$ i induir calcificació.

Els nostres resultats mostren com el tractament amb una dosi elevada de calcitriol produeixen una pèrdua de pes significativament important en els ratolins wild type mentre que en els 1 α hidroxilasa KO no es produeix. Això ens informa que el tractament amb calcitriol esta ocasionant una alta toxicitat en els ratolins wild type mentre que els KO no.

El tractament amb 400 ng/kg de calcitriol ha estat capaç d'equilibrar els nivells de Ca^{2+} i P entre els ratolins WT i $1\alpha\text{KO}$ nefrectomitzats a uns nivells per sobre dels normals. Els nivells de PTH han disminuït en els dos grups fins arribar a valors similars, i la 1,25D també ha augmentat de manera similar en els dos grups. D'aquesta manera hem igualat les condicions entre els dos grups, per tal d'aconseguir que les diferències que puguem observar entre ells no siguin degudes a diferències en els nivells circulants de Ca^{2+} , P, etc.

Quan estudiem l'efecte sobre la calcificació vascular, en els ratolins wild type nefrectomitzats hi ha un augment significatiu de la calcificació vascular respecte els $1\alpha\text{KO}$ nefrectomitzats quan es tracten amb calcitriol. Aquesta diferència es podria explicar perquè els ratolins wild type tenen capacitat de sintetitzar la 1,25D extra-renal. En l'artèria es produeix aquesta síntesis, la qual es accelerada en condicions urèmiques i ocasiona un increment de la producció de 1,25D que tindria un efecte autocrí sobre l'artèria promovent la calcificació vascular.

En els estudis *in vitro* en CMLV observem resultats similars als obtingut *in vivo*, el contingut de calci es veu augmentat en la urèmia en les cèl·lules wild type, mentre que en les 1α hidroxilasa KO no augmenta. El tractament amb calcitriol, el qual afavoreix també l'increment de la 1α hidroxilasa, augmenta més la calcificació en els wild type. Sembla que les cèl·lules necessiten d'una producció interna de 1,25D per a que es pugui desenvolupar el procés de calcificació i el canvi de cèl·lula normal a osteoblàstica, fet que recolzaria la hipòtesis que la síntesis local de calcitriol media la transformació osteoblàstica. En altres tipus cel·lulars, com en els condrocits, la síntesis local de 1,25D podria tenir un paper important en la seva proliferació i diferenciació.²⁴²

Estudis mostren com els macròfags de les lesions ateroscleròtiques s'infiltraen en la paret arterial i tenen l'habilitat d'activar la vitamina D_3 a calcitriol²⁴³, aquest calcitriol contribueix en les lesions arterials: estimula el flux de Ca^{2+} , activant canals de calci tipus L fet que promou els dipòsits de calci en les fibres elàstiques²⁴⁴. Inhibeix la transcripció del pèptid relacionat PTH i estimula l'expressió de l'osteopontina promovent també la calcificació²⁴⁵. A més activa la proteïna quinasa p38²⁴⁶ i la fosfatidil inositol quinasa²⁴⁷. Un cop activada, les citoquines, els factors de creixement incloent-hi, l'angiotensina II indueixen diferenciació cel·lular,

promovent la migració cel·lular i augmentant l'estrès oxidatiu, produint una desintegració estructural, rigidesa arterial i hipertensió³.

Alguns estudis han relacionat la 1 α hidroxilasa amb algunes malalties; en la malaltia granulomatosa s'ha observat un augment de la 1 α hidroxilasa²⁴⁸. També en la malaltia de Crohn s'observa un augment de l'expressió d'aquest enzim juntament amb l'increment dels nivells de 1,25(OH)₂D₃ en sèrum²⁴⁹. Com els nostres resultats mostren, hi ha una relació entre la MRC i la 1 α hidroxilasa; en la malaltia renal hi ha un increment de la 1 α hidroxilasa que podria estar perjudicant el nostre sistema cardiovascular.

A nivell de proteïna, en les CMLV hi ha un augment de l'expressió de runx2 en la urèmia, que indica que aquestes cèl·lules s'estan diferenciant cap a osteoblasts. Un increment del VDR, que pot augmentar l'efecte genòmic de la 1,25D i també de la 24hidroxilasa que augmentaria per intentar compensar la sobreproducció de calcitriol. Hi han diferències en l'expressió del VDR, probablement a causa de la durada dels tractaments. A les 48h hi ha una disminució de l'expressió, mentre que als 6 dies la seva expressió augmenta.

Per corroborar els resultats anteriors, es va sobreexpressar la 1 α hidroxilasa en CMLV, es va comprovar l'augment de la seva expressió a nivell de mRNA i també de proteïna. Les cèl·lules que sobreexpresaven la 1 α hidroxilasa tractades amb medi calcificant presentaven un augment del contingut de calci i també un augment de l'expressió del marcador runx2. Aquests resultats confirmarien la implicació de la 1 α hidroxilasa en la calcificació vascular, indicant que podria ser un mediador de la calcificació.

Com a conclusions podem dir que l'absència de la 1 α hidroxilasa preveu la calcificació vascular i la transdiferenciació a cèl·lules semblants a osteoblasts en un model de calcificació urèmica tant *in vitro* com *in vivo*. Mentre que la sobrepressió de la 1 α hidroxilasa en les CMLV augmenta la calcificació *in vitro*.

Tots els resultants indiquen que la 1 α hidroxilasa actuaria com a mediador de la calcificació vascular en la urèmia, incrementant l'expressió de Runx2 i afavorint els processos de calcificació (Figura 45). Aquest fet, és d'especial interès pel pacient amb malaltia renal, ja que s'hauria de tenir en compte la síntesis local de 1,25D en la urèmia, per tal de donar el tractament adequat. De manera que un tractament amb 25D, podria ser problemàtic en

condicions urèmiques perquè es podria estar estimulant la síntesis local de 1,25D en l'artèria i amplificant l'efecte sobre la calcificació vascular.

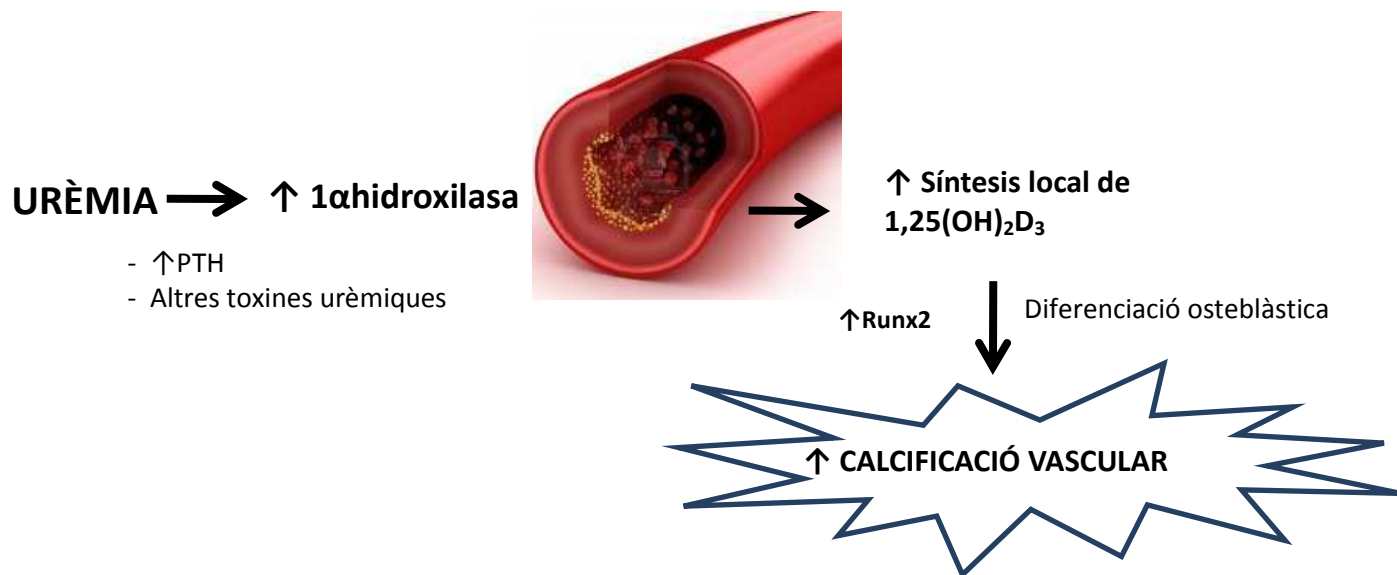


Figura 45.-Efecte de la urèmia en la calcificació vascular. Es produeix un augment de la 1αhidroxilasa en l'artèria en condicions urèmiques. Aquest fet indueix la síntesis local de 1,25(OH)₂D₃, la qual activa la diferenciació osteoblàstica (increment de l'expressió de runx2) e indueix la calcificació vascular.

3.- EFECTE DIRECTE DE LA 25 HIDROXIVITAMINA D EN LA REGULACIÓ DE GENS I DEL METABOLISME MINERAL EN LA URÈMIA. EFECTE SOBRE LA CALCIFICACIÓ VASCULAR.

El sistema endocrí de la vitamina D és indispensable pel manteniment de l'homeòstasis del calci i el creixement de l'esquelet. La vitamina D₃ es metabolitza en el fetge i dona lloc a la 25(OH)D₃, un metabòlit que té poca afinitat pel VDR i que ha estat tradicionalment considerat biològicament inactiu. Seguidament, la 25(OH)D₃ es metabolitza per la 1 α hidroxilasa renal per generar 1,25(OH)₂D₃, un lligand amb alta afinitat pel VDR. El control del calci (Ca²⁺) i el metabolisme de l'os pel complex VDR-1,25(OH)₂D₃ es mediat per la regulació transcripcional d'alguns gens en l'intestí i en el ronyó, donant lloc a una regulació de l'absorció i transport del calci.²⁵⁰

A Espanya, actualment s'està utilitzant la 25(OH)D₃ o hidroferol com a tractament de l'HPT2 en pacients amb malaltia renal crònica, sense el coneixement de la seva eficàcia i de la seva toxicitat. Així i tenint en compte els resultats del bloc anterior, aquest estudi vol determinar si el tractament amb 25OHD₃ en malalts renals pot produir toxicitat en aquests pacients. A més es pretén estudiar l'efecte de la 25OHD₃ com a activador directe del VDR i també determinar-ne la seva eficàcia.

Els resultats obtinguts mostren que l'administració de 25D en ratolins 1 α hidroxilasa KO que desenvolupen malaltia renal pot normalitzar els nivells de Ca, P i PTH de manera similar a la de la 1,25D, confirmant un efecte directe sobre l'activació del VDR per la 25D. Altres estudis, com el de Zhang ZL. mostren un rescat parcial del fenotip en ratolins 1 α hidroxilasa KO per l'administració de vitaminaD₃ on no s'aconsegueix una disminució de la PTH fins als nivells normal, ni una llargada del fèmur com en els WT; indicant també que la 25D pot actuar sense convertir-se en 1,25D.²⁵¹

Els ratolins 1 α hidroxilasaKO (CYP27B1KO) desenvolupen raquitisme dependent de vitamina D tipus I (PDDR)²⁵², tenen pèrdua de pes, hiperparatiroidisme, hipocalcèmia, anomalies òssies. Es coneix que aquest fenotip es pot revertir completament amb l'administració de 1,25(OH)₂D₃²⁵³ i es millora amb una dieta alta en calci i alta en lactosa "dieta de rescat".²⁵⁴ Eliminant la hipocalcèmia amb la "dieta de rescat" en els ratolins 1 α hidroxilasaKO no s'aconsegueix revertir totalment el creixement ossi d'aquests animals. Es pensa que la producció local de 1,25(OH)₂D₃ és important en la proliferació i la maduració dels condrocits

en el creixement i que alguns d'aquets efectes involucren mecanismes d'acció no genòmica per al creixement normal dels ratolins.²⁵⁵

Estudis previs dels transportadors de calci indiquen que l'expressió del TRPV5 està controlada per la vitamina D, suggerint un lligam estret entre aquesta proteïna i el manteniment del calci.²⁵⁶ Hoenderop. et al. demostren els efectes del calci i de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en l'increment de l'expressió dels transportadors de calci i la normalització dels nivells de calci en sèrum en ratolins 1α hidroxilasa KO.²⁵⁷ Altres estudis com els de Rowling et al. mostren que alimentant ratolins 1α KO amb una dieta alta en VD_3 s'augmenta l'expressió de la 24hidroxilasa en el ronyó com també de la calbindina D9k en l'intestí.²⁵⁸

Els nostres resultats mostren tant a nivell de RNA com de proteïna que la 25D activa al VDR de forma similar a la 1,25D en la up-regulació de gens i proteïnes que medien el transport transcel·lular de calci en el ronyó (TRPV5, Calbindina-D28k, PMCa1b) i en el duodè (TRPV6, Calbindina-D9k i PMCA1b) en els ratolins 1α hidroxilasa KO nefrectomitzats.

La inducció de dany renal per la nefrectomia en aquests ratolins (1α hidroxilasa KO) no empitjora els nivells de calci, fosfat, PTH ni la 25D quan ho comparem amb els ratolins sham. Aquest fet indica que les condicions urèmiques no afecten la capacitat renal per a mantenir els nivells de 25D en el període de temps examinat en aquest experiment després de la inducció del dany renal. A més, els nostres resultats indiquen que la 25D té una potència inferior en la inducció de TRPV6 en l'enteròcit comparat amb la de la 1,25D. Aquests descobriments i l'eficàcia de la dieta de "rescat" en el manteniment del creixement d'aquets animals suggereixen que hi ha una resposta adaptativa per mantenir l'homeòstasis del calci tot hi la deficiència de 1,25D, i que el transport paracel·lular de calci hi podria tenir un paper important. Mesures directes de la regulació diferencial de la Claudina12 al duodè per la 25D i la 1,25D ho podrien aclarir.

Aquests resultats mostren que l'eficàcia de la 25D a la dosis més alta per a suprimir la PTH és més elevada que la del 1,25D. Aquestes diferències es poden atribuir no exclusivament a una alta activació del VDR, sinó més aviat a la hipercalcèmia. A més, pot indicar que la 25D no està tan degradada per la 24-hidroxilasa com la 1,25D, la qual té una afinitat 25 cops més alta per la 1,25D i podria prevenir la hipercalcèmia. Mesures de la inducció diferencial de la 24-hidroxilasa per la 1,25D i per les tres dosis de 25D podrien ajudar a entendre si hi ha una

activació diferencial en la via catabòlica i no la baixa afinitat de la 24hidroxilasa per la 25D perjudica la seva degradació per evitar la toxicitat per la vitaminaD.

Els nivells de 25D necessaris per a normalitzar els nivells de calci i PTH en els ratolins KO (3000-6000 ng/ml) es troben molt lluny de les recomanacions legals per evitar la toxicitat per la vitamina D (100-200ng/ml) en humans sans (Melamed M 2008), posant en dubte el seu ús terapèutic. Tot i els alts nivells en 25D no hi ha un augment en el contingut de calci ni en la calcificació en les artèries dels ratolins 1 α hidroxilasa KO, s'hauria de mirar el seu efecte en els ratolins wild type.

Els ratolins wild type nefrectomitzats tractats amb 25D (25 i 50 ng/g), presenten uns nivells d'aproximadament 5 cops inferiors en 25(OH)D₃ respecte als KO. La disminució de la concentració de 25D es sèrum podria ser deguda a la capacitat de conversió de la 25D a la 1,25D, i esperaríem nivells més alts de 1,25D en aquets ratolins que es podrien veure compensats per un augment de la seva degradació. Quan analitzem les artèries dels ratolins wild type nefrectomitzats observem que hi ha un augment en el contingut de calci en els grups tractats amb 25D, i com mostra la tinció per vermell d'alizarina hi ha un increment de la coloració taronja-vermella. Aquests resultats suggereixen que les dosis efectives de 25D poden promoure hipercalcèmia i malaltia ossea adinàmica i que el seu ús hauria d'estar molt controlat per evitar intoxicacions.

En els ratolins wild type el tractament amb 25D també es efectiu per a reduir els nivells de PTH, tot hi això no arribem aconseguir un nivells normals. El grup tractat amb la dosis més alta de 25D (50 ng/g) no disminueix la PTH com ho fa el grup tractat amb la dosis inferior, ja que aquest grup presenta nivells més elevats de fòsfor que podria estar activant la síntesis de la PTH.

En l'anàlisi d'orina dels ratolins estudiats, cal destacar que els ratolins 1 α hidroxilasa KO presenten proteïnúria, probablement a causa del dèficit en vitamina D. Quant són tractats amb 25(OH)D₃ la proteïnúria disminueix considerablement. Estudis mostren com el dèficit de vitamina D afavoreix el dany renal augmentant la proteïnúria en pacients amb MRC, mentre que suplement amb vitamina D poden millorar aquest efecte.²⁵⁹ Altres estudis mostren com tractaments amb calcitriol i paricalcitol disminueixen la inflamació renal en un model experimental de nefropatia diabètica.²⁶⁰ En els ratolins WT, en canvi la diferència en els nivells

de vitamina D no és tan gran i no s'observen efectes en els nivells de proteïnúria que, per altra part, són molt inferiors als observats en els KO.

En el nostre estudi *in vitro*, s'observa que la 25D té un efecte directe sobre les CMLV 1 α hidroxilasa KO incrementant l'expressió de la 24hidroxilasa i del VDR. Resultat que confirmaria l'efecte de la 25(OH)D₃ com a agonista del VDR i per tant aquest fet podria estar relacionat amb un efecte tòxic de la 25D en l'artèria.

Estudis de Lou et al. també mostren l'efecte de la 25D com a agonista del VDR. En els seus estudis utilitzen cèl·lules de ronyó, de la pell, pròstata de ratolí 1 α KO com també cèl·lules MCF-7 de càncer de mama. On s'evidencia que la 25(OH)D₃ té propietats reguladores de gens i un efecte sinèrgic amb la 1,25(OH)₂D₃ que podrien tenir uns efectes fisiològics importants.²⁶¹

En conclusió, aquests resultats demostren que l'administració de 25D pot normalitza el Ca, P i la PTH en sèrum d'una manera similar a la que faria la 1,25D sense ser activada per la 1 α hidroxilasa. Tot i que les concentracions necessàries de 25D són molt altres i podrien ocasionar toxicitat en els pacients amb MRC. Per això, caldria un control exhaustiu de la dosis per tal d'utilitzar la mínima dosis possible per tal de regular els nivells de PTH sense produir efectes secundaris en el pacient.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS:

- 1.- La urèmia desregula l'expressió de proteïnes implicades en el metabolisme de la vitamina D (VDR, 24hidroxilasa i 1 α hidroxilasa), incrementant significativament l'expressió de la 1 α hidroxilasa.
- 2.- La urèmia també incrementa la calcificació vascular *in vivo* e *in vitro*.
- 3.- L'absència de la 1 α hidroxilasa (model 1 α KO amb MRC) preveu la calcificació vascular i la diferenciació osteoblàstica *in vivo* e *in vitro* en un model de calcificació urèmica.
- 4.- La sobreexpressió de la 1 α hidroxilasa en CMLV de rates normals augmenta la calcificació *in vitro*.
- 5.- Els resultats obtinguts indiquen que la producció local de calcitriol per la 1 α hidroxilasa en l'artèria mediària la calcificació vascular en la urèmia.
- 6.- La 25(OH)D₃ pot normalitzar el Ca, P, la PTH amb una potencia similar al 1,25(OH)₂D₃ en un model de ratolí 1 α KO amb MRC. Confirmant la unió directa i l'activació del VDR per la 25D.
- 7.-La 25(OH)D₃ pot també activar el VDR imitant a la 1,25D, en la up-regulació de gens i proteïnes que medien el transport transcel·lular de calci en el ronyó (TRPV5, calbindinaD28k, PMCA1b) i en el duodè (TRPV6, Calbindina-D9k i PMCA1b) en un model de MRC de ratolí 1 α KO.
- 8.-La dosi requerida de 25D per imitar l'efecte de la 1,25D, està molt per sobre dels nivells recomanats de seguretat en pacients amb MRC. En els ratolins wild type es produeix un increment en la calcificació vascular que mostraria un efecte tòxic en aquets animals.
- 9.- La 25(OH)D₃ es capaç d'activar la 24 hidroxilasa i el VDR en les CMLV, indicant també l'activació directa del VDR per la 25D en l'artèria.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA:

1. Levey,A.S. *et al.* Definition and classification of chronic kidney disease: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney International* **67**, 2089-2100 (2005).
2. Eknoyan,G. & Levin,N.W. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: Evaluation, classification, and stratification - Foreword. *American Journal of Kidney Diseases* **39**, S14-S266 (2002).
3. La Piedra,C., Fernandez,E., Casaus,M.L.G. & Parra,E.G. Different biological functions in PTH molecules.? What are we measuring? *Nefrologia* **28**, 123-128 (2008).
4. Saliba,W. & El Haddad,B. Secondary Hyperparathyroidism: Pathophysiology and Treatment. *Journal of the American Board of Family Medicine* **22**, 574-581 (2009).
5. Brown,E.M. & Hebert,S.C. Calcium-receptor-regulated parathyroid and renal function 20. *Bone* **20**, 303-309 (1997).
6. Slatopolsky,E. *et al.* Phosphate (Po4) Restriction Prevents Parathyroid Cell-Growth in Uremic Rats and High Phosphate Directly Stimulates Pth Secretion in Tissue-Culture. *Journal of the American Society of Nephrology* **6**, 971 (1995).
7. Slatopolsky,E. & Delmez,J.A. Pathogenesis of Secondary Hyperparathyroidism. *Mineral and Electrolyte Metabolism* **21**, 91-96 (1995).
8. Holick,M.F. Vitamin-D and the Kidney. *Kidney International* **32**, 912-929 (1987).
9. Nabeshima,Y. The discovery of alpha-Klotho and FGF23 unveiled new insight into calcium and phosphate homeostasis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**, 3218-3230 (2008).
10. Krajisnik,T. *et al.* Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1 alpha-hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells 1. *Journal of Endocrinology* **195**, 125-131 (2007).
11. Krajisnik,T. *et al.* Parathyroid hormone expression is negatively regulated by FGF23 in primary bovine parathyroid cells. *Journal of Bone and Mineral Research* **22**, S54 (2007).
12. Cozzolino,M., Gallieni,M., Corsi,C., Bastagli,A. & Brancaccio,D. Management of calcium refilling post-parathyroidectomy in end-stage renal disease 6. *Journal of Nephrology* **17**, 3-8 (2004).
13. Gallieni,M. *et al.* Low-Dose Intravenous Calcitriol Treatment of Secondary Hyperparathyroidism in Hemodialysis-Patients. *Kidney International* **42**, 1191-1198 (1992).
14. Slatopolsky,E. *et al.* Marked Suppression of Secondary Hyperparathyroidism by Intravenous Administration of 1,25-Dihydroxycholecalciferol in Uremic Patients. *Journal of Clinical Investigation* **74**, 2136-2143 (1984).
15. Quarles,L.D. *et al.* Aluminum-Induced Dna-Synthesis in Osteoblasts - Mediation by A G-Protein Coupled Cation Sensing Mechanism. *Journal of Cellular Biochemistry* **56**, 106-117 (1994).
16. Delmez,J.A. & Slatopolsky,E. Hyperphosphatemia - Its Consequences and Treatment in Patients with Chronic Renal-Disease 4. *American Journal of Kidney Diseases* **19**, 303-317 (1992).

Bibliografia

17. Slatopolsky,E. *et al.* A New Analog of Calcitriol, 19-Nor-1,25-(Oh)2D2, Suppresses Pth Secretion in Uremic Rats in the Absence of Hypercalcemia. *Journal of Bone and Mineral Research* **10**, S167 (1995).
18. Finch,J.L., Brown,A.J. & 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 4. *Journal of the American Society of Nephrology* **10**, 980-985 (1999).
19. Cardus,A., Panizo,S., Parisi,E., Fernandez,E. & Valdivielso,J.M. Differential effects of vitamin D analogs on vascular calcification. *J. Bone Miner. Res.* **22**, 860-866 (2007).
20. Block,G.A., Hulbert-Shearon,T.E., Levin,N.W. & Port,F.K. Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: A national study 6. *American Journal of Kidney Diseases* **31**, 607-617 (1998).
21. Kovesdy,C.P. & Kalantar-Zadeh,K. Bone and mineral disorders in pre-dialysis CKD. *International Urology and Nephrology* **40**, 427-440 (2008).
22. Schwarz,S., Trivedi,B.K., Kalantar-Zadeh,K. & Kovesdy,C.P. Association of disorders in mineral metabolism with progression of chronic kidney disease 3. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **1**, 825-831 (2006).
23. Wills,M.R. & Savory,J. Aluminum and Chronic Renal-Failure - Sources, Absorption, Transport, and Toxicity 1. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **27**, 59-107 (1989).
24. Goodman,W.G. *et al.* Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *New England Journal of Medicine* **342**, 1478-1483 (2000).
25. Hilfiker,H. *et al.* Characterization of a murine type II sodium-phosphate cotransporter expressed in mammalian small intestine 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 14564-14569 (1998).
26. Levin,A. *et al.* Left ventricular mass index increase in early renal disease: Impact of decline in hemoglobin. *American Journal of Kidney Diseases* **34**, 125-134 (1999).
27. McMahon,L.P., Roger,S.D. & Levin,A. Development, prevention, and potential reversal of left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology* **15**, 1640-1647 (2004).
28. Wheeler,D.C., Townend,J.N. & Landray,M.J. Cardiovascular risk factors in predialysis patients: Baseline data from the Chronic Renal Impairment in Birmingham (CRIB) study. *Kidney International* **63**, S201-S203 (2003).
29. Brahim,M., Dahan,M., Dabire,H. & Levy,B.I. Impact of pulse pressure on degree of cardiac hypertrophy in patients with chronic uraemia. *Journal of Hypertension* **18**, 1645-1650 (2000).
30. Fagugli,R.M. *et al.* Association between extracellular water, left ventricular mass and hypertension in haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* **18**, 2332-2338 (2003).
31. London,G.M. Cardiovascular calcifications in uremic patients: Clinical impact on cardiovascular function. *Journal of the American Society of Nephrology* **14**, S305-S309 (2003).

Bibliografia

32. Nitta,K. *et al.* Left ventricular hypertrophy is associated with arterial stiffness and vascular calcification in hemodialysis patients. *Hypertension Research* **27**, 47-52 (2004).
33. Parfrey,P.S. & Foley,R.N. Ischemic heart disease in chronic uremia. *Blood Purification* **14**, 321-326 (1996).
34. Silberberg,J.S., Barre,P.E., Prichard,S.S. & Sniderman,A.D. Impact of Left-Ventricular Hypertrophy on Survival in End-Stage Renal-Disease. *Kidney International* **36**, 286-290 (1989).
35. Sarnak,M.J. *et al.* Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease - A statement from the American Heart Association councils on kidney in cardiovascular disease, high blood pressure research, clinical cardiology, and epidemiology and prevention. *Circulation* **108**, 2154-2169 (2003).
36. Christian,R.C. & Fitzpatrick,L.A. Vascular calcification. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* **8**, 443-448 (1999).
37. Hunt,J.L. *et al.* Bone formation in carotid plaques - A clinicopathological study. *Stroke* **33**, 1214-1219 (2002).
38. Edmonds,M.E., Morrison,N., Laws,J.W. & Watkins,P.J. Medial Arterial Calcification and Diabetic Neuropathy. *British Medical Journal* **284**, 928-930 (1982).
39. London,G.M., Marchais,S.J., Guerin,A.P. & Metivier,F. Arteriosclerosis, vascular calcifications and cardiovascular disease in uremia. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* **14**, 525-531 (2005).
40. London,G.M. Vascular disease and atherosclerosis in uremia. *Nefrologia* **25**, 91-95 (2005).
41. Ibels,L.S. *et al.* Arterial Calcification and Pathology in Uremic Patients Undergoing Dialysis. *American Journal of Medicine* **66**, 790-796 (1979).
42. Schwarz,U. *et al.* Morphology of coronary atherosclerotic lesions in patients with end-stage renal failure. *Nephrology Dialysis Transplantation* **15**, 218-223 (2000).
43. Gonzalez,E.A. & Martin,K.J. Renal Osteodystrophy - Pathogenesis and Management. *Nephrology Dialysis Transplantation* **10**, 13-21 (1995).
44. Jono,S., Shioi,A., Ikari,Y. & Nishizawa,Y. Vascular calcification in chronic kidney disease. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* **24**, 176-181 (2006).
45. Demer,L.L. A Skeleton in the Atherosclerosis Closet. *Circulation* **92**, 2029-2032 (1995).
46. Watson,K.E. *et al.* Tgf-Beta-1 and 25-Hydroxycholesterol Stimulate Osteoblast-Like Vascular Cells to Calcify. *Journal of Clinical Investigation* **93**, 2106-2113 (1994).
47. Bostrom,K. *et al.* Bone Morphogenetic Protein Expression in Human Atherosclerotic Lesions. *Journal of Clinical Investigation* **91**, 1800-1809 (1993).
48. Reynolds,J.L. *et al.* 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. *Journal of the American Society of Nephrology* **15**, 2857-2867 (2004).

Bibliografia

49. Yang,H., Curinga,G. & Giachelli,C.M. Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro. *Kidney International* **66**, 2293-2299 (2004).
50. Cozzolino,M., Dusso,C.S. & Slatopolsky,E. Role of calcium-phosphate product and bone-associated proteins on vascular calcification in renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology* **12**, 2511-2516 (2001).
51. Block,G.A. Prevalence and clinical consequences of elevated Ca x P product in hemodialysis patients. *Clinical Nephrology* **54**, 318-324 (2000).
52. Block,G.A. & Port,F.K. Re-evaluation of risks associated with hyperphosphatemia and hyperparathyroidism in dialysis patients: Recommendations for a change in management. *American Journal of Kidney Diseases* **35**, 1226-1237 (2000).
53. Reynolds,J.L. *et al.* 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. *Journal of the American Society of Nephrology* **15**, 2857-2867 (2004).
54. Yang,H., Curinga,G. & Giachelli,C.M. Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro. *Kidney International* **66**, 2293-2299 (2004).
55. Steitz,S.A. *et al.* Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification - Upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circulation Research* **89**, 1147-1154 (2001).
56. Moe,S.M., Duan,D., Doehle,B.P., O'Neill,K.D. & Chen,N.X. Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels. *Kidney International* **63**, 1003-1011 (2003).
57. Moe,S.M. *et al.* Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins. *Kidney International* **61**, 638-647 (2002).
58. Giachelli,C.M. Vascular calcification mechanisms. *Journal of the American Society of Nephrology* **15**, 2959-2964 (2004).
59. Clarke,M.C.H. *et al.* Chronic apoptosis of vascular smooth muscle cells accelerates atherosclerosis and promotes calcification and medial degeneration. *Circulation Research* **102**, 1529-1538 (2008).
60. Proudfoot,D. *et al.* Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro - Evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circulation Research* **87**, 1055-1062 (2000).
61. Luo,G.B. *et al.* Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* **386**, 78-81 (1997).
62. Tyson,K.L. *et al.* Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **23**, 489-494 (2003).
63. Cassidy-Bushrow,A.E. *et al.* Matrix Gla Protein Gene Polymorphism Is Associated With Increased Coronary Artery Calcification Progression. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **33**, 645-+ (2013).

Bibliografia

64. Bostrom,K., Tsao,D., Shen,S., Wang,Y. & Demer,L.L. Matrix GLA protein modulates differentiation induced by done morphogenetic protein-2 in C3H10T1/2 cells. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 14044-14052 (2001).
65. Jono,S. *et al.* Matrix Gla protein is associated with coronary artery calcification as assessed by electron-beam computed tomography. *Thrombosis and Haemostasis* **91**, 790-794 (2004).
66. Luo,G.B. *et al.* Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* **386**, 78-81 (1997).
67. Heiss,A. *et al.* Structural basis of calcification inhibition by alpha(2)-HS glycoprotein/fetuin-A - Formation of colloidal calciprotein particles. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 13333-13341 (2003).
68. Ketteler,M. *et al.* Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet* **361**, 827-833 (2003).
69. Giachelli,C.M. & Steitz,S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biology* **19**, 615-622 (2000).
70. Giachelli,C.M. *et al.* Osteopontin Is Elevated During Neointima Formation in Rat Arteries and Is A Novel Component of Human Atherosclerotic Plaques. *Journal of Clinical Investigation* **92**, 1686-1696 (1993).
71. Jono,S., Peinado,C. & Giachelli,C.M. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 20197-20203 (2000).
72. Speer,M.Y. *et al.* 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. *Journal of Experimental Medicine* **196**, 1047-1055 (2002).
73. Simonet,W.S. *et al.* Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**, 309-319 (1997).
74. Collin-Osdoby,P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circulation Research* **95**, 1046-1057 (2004).
75. Bucay,N. *et al.* osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes & Development* **12**, 1260-1268 (1998).
76. Jono,S. *et al.* Serum osteoprotegerin levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circulation* **106**, 1192-1194 (2002).
77. Jono,S. *et al.* Serum osteoprotegerin levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circulation* **106**, 1192-1194 (2002).
78. Schoppet,M. *et al.* 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. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **89**, 4104-4112 (2004).

Bibliografia

79. Davies,M.R., Lund,R.J. & Hruska,K.A. BMP-7 is an efficacious treatment of vascular calcification in a murine model of atherosclerosis and chronic renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology* **14**, 1559-1567 (2003).
80. Stompor,T. An overview of the pathophysiology of vascular calcification in chronic kidney disease. *Peritoneal Dialysis International* **27**, S215-S222 (2007).
81. Lomashvili,K.A., Khawandi,W. & O'Neill,W.C. Reduced plasma pyrophosphate levels in hemodialysis patients. *Journal of the American Society of Nephrology* **16**, 2495-2500 (2005).
82. Moe,S.M., Duan,D., Doehle,B.P., O'Neill,K.D. & Chen,N.X. Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels. *Kidney International* **63**, 1003-1011 (2003).
83. Yin,T.T., Patel,J., Parhami,F. & Demer,L.L. Tumor necrosis factor-alpha promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation* **102**, 2636-2642 (2000).
84. Stenvinkel,P. *et al.* IL-10, IL-6, and TNF-alpha: Central factors in the altered cytokine network of uremia - The good, the bad, and the ugly. *Kidney International* **67**, 1216-1233 (2005).
85. Watson,K.E., Parhami,F., Shin,V. & Demer,L.L. Fibronectin and collagen I matrixes promote calcification of vascular cells in vitro, whereas collagen IV matrix is inhibitory. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **18**, 1964-1971 (1998).
86. Watson,K.E. *et al.* Tgf-Beta-1 and 25-Hydroxycholesterol Stimulate Osteoblast-Like Vascular Cells to Calcify. *Journal of Clinical Investigation* **93**, 2106-2113 (1994).
87. Shioi,A. *et al.* Induction of bone-type alkaline phosphatase in human vascular smooth muscle cells - Roles of tumor necrosis factor-alpha and oncostatin M derived from macrophages. *Circulation Research* **91**, 9-16 (2002).
88. 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).
89. Otto,F. *et al.* Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* **89**, 765-771 (1997).
90. Tyson,K.L. *et al.* Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **23**, 489-494 (2003).
91. Jono,S. *et al.* Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circulation Research* **87**, E10-E17 (2000).
92. Moe,S.M., Duan,D., Doehle,B.P., O'Neill,K.D. & Chen,N.X. Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels. *Kidney International* **63**, 1003-1011 (2003).
93. Chen,N.X., O'Neill,K.D., Duan,D. & Moe,S.M. Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. *Kidney International* **62**, 1724-1731 (2002).

Bibliografia

94. Kong,Y.Y., Boyle,W.J. & Penninger,J.M. Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology. *Immunology Today* **21**, 495-502 (2000).
95. Kong,Y.Y. *et al.* Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* **402**, 304-309 (1999).
96. Jimi,E. *et al.* Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. *Journal of Immunology* **163**, 434-442 (1999).
97. Bucay,N. *et al.* osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes & Development* **12**, 1260-1268 (1998).
98. Boukhris,R. & Becker,K.L. Calcification of Aorta and Osteoporosis - Roentgenographic Study. *Journal of the American Medical Association* **219**, 1307-& (1972).
99. Hak,A.E., Pols,H.A.P., van Hemert,A.M., Hofman,A. & Witteman,J.C.M. Progression of aortic calcification is associated with metacarpal bone loss during menopause - A population-based longitudinal study. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **20**, 1926-1931 (2000).
100. Panizo,S. *et al.* RANKL Increases Vascular Smooth Muscle Cell Calcification Through a RANK-BMP4-Dependent Pathway. *Circulation Research* **104**, 1041-1048 (2009).
101. Chen,A.L. *et al.* Expression of bone morphogenetic proteins, receptors, and tissue inhibitors in human fetal, adult, and osteoarthritic articular cartilage. *Journal of Orthopaedic Research* **22**, 1188-1192 (2004).
102. Chen,D., Zhao,M. & Mundy,G.R. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* **22**, 233-241 (2004).
103. Massague,J. & Wotton,D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *Embo Journal* **19**, 1745-1754 (2000).
104. Hruska,K.A., Mathew,S. & Saab,G. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circulation Research* **97**, 105-114 (2005).
105. Chen,N.X. *et al.* The mechanisms of uremic serum-induced expression of bone matrix proteins in bovine vascular smooth muscle cells. *Kidney International* **70**, 1046-1053 (2006).
106. Zebboudj,A.F., Imura,M. & Bostrom,K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 4388-4394 (2002).
107. Glisson,F. Classic - De-Rachitide-Sive-Marbo-Puerili, Qui-Vulgo-Rickets-Dicitur. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 4-9 (1973).
108. Norman,A.W., Roth,J. & Orci,L. The Vitamin-D Endocrine System - Steroid-Metabolism, Hormone Receptors, and Biological Response (Calcium-Binding Proteins). *Endocrine Reviews* **3**, 331-366 (1982).
109. Gurlek,A., Pittelkow,M.R. & Kumar,R. Modulation of growth factor/cytokine synthesis and signaling by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3: Implications in cell growth and differentiation. *Endocrine Reviews* **23**, 763-786 (2002).
110. Chertow,B.S. *et al.* Cellular Mechanisms of Insulin Release - the Effects of Vitamin-D Deficiency and Repletion on Rat Insulin-Secretion. *Endocrinology* **113**, 1511-1518 (1983).

Bibliografia

111. Lin,R. & White,J.H. The pleiotropic actions of vitamin D. *Bioessays* **26**, 21-28 (2004).
112. Brown,A.J., Dusso,A. & Slatopolsky,E. Vitamin D. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **277**, F157-F175 (1999).
113. Brown,A.J., Dusso,A. & Slatopolsky,E. Vitamin D. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **277**, F157-F175 (1999).
114. Zehnder,D. *et al.* 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).
115. Somjen,D. *et al.* 25-hydroxyvitamin D-3-1 alpha-hydroxylase is expressed in human vascular smooth muscle cells and is upregulated by parathyroid hormone and estrogenic compounds. *Circulation* **111**, 1666-1671 (2005).
116. Cross,H.S. *et al.* 25-Hydroxyvitamin D-3-1 alpha-hydroxylase and vitamin D receptor gene expression in human colonic mucosa is elevated during early cancerogenesis. *Steroids* **66**, 287-292 (2001).
117. Adams,J.S. & Gacad,M.A. Characterization of 1-Alpha-Hydroxylation of Vitamin-D3 Sterols by Cultured Alveolar Macrophages from Patients with Sarcoidosis. *Journal of Experimental Medicine* **161**, 755-765 (1985).
118. Huang,D.C., Papavasiliou,V., Rhim,J.S., Horst,R.L. & Kremer,R. Targeted disruption of the 25-hydroxyvitamin D-3 1 alpha-hydroxylase gene in ras-transformed keratinocytes demonstrates that locally produced 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3 suppresses growth and induces differentiation in an autocrine fashion. *Molecular Cancer Research* **1**, 56-67 (2002).
119. Quesada,J.M., Mata-Granados,J.M. & de Castro,M.D.L. Automated method for the determination of fat-soluble vitamins in serum. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **89-90**, 473-477 (2004).
120. Quesada,J.M., Mata-Granados,J.M. & de Castro,M.D.L. Automated method for the determination of fat-soluble vitamins in serum. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **89-90**, 473-477 (2004).
121. St Arnaud,R. & Glorieux,F.H. Editorial: 24, 25-dihydroxyvitamin D-active metabolite or inactive catabolite? *Endocrinology* **139**, 3371-3374 (1998).
122. Quesada,J.M., Mata-Granados,J.M. & de Castro,M.D.L. Automated method for the determination of fat-soluble vitamins in serum. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **89-90**, 473-477 (2004).
123. Nykjaer,A. *et al.* An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D-3. *Cell* **96**, 507-515 (1999).
124. Omdahl,J.L., Boyle,I.T., Gray,R.W., Knutson,J. & Deluca,H.F. Regulation of Metabolism of 25-Hydroxycholecalciferol by Kidney Tissue In-Vitro by Dietary Calcium. *Nature-New Biology* **237**, 63-& (1972).
125. Murayama,A. *et al.* The promoter of the human 25-hydroxyvitamin D-3 1 alpha-hydroxylase gene confers positive and negative responsiveness to PTH, calcitonin, and 1 alpha,25(OH)(2)D-3. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **249**, 11-16 (1998).

Bibliografia

126. Yoshida,T., Fujimori,T. & Nabeshima,Y. Mediation of unusually high concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D in homozygous klotho mutant mice by increased expression of renal 1 alpha-hydroxylase gene. *Endocrinology* **143**, 683-689 (2002).
127. Tsujikawa,H., Kurotaki,Y., Fujimori,T., Fukuda,K. & Nabeshima,Y.I. Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Molecular Endocrinology* **17**, 2393-2403 (2003).
128. Mellon,W.S. & Deluca,H.F. Equilibrium and Kinetic Study of 1,25-Dihydroxyvitamin-D3 Binding to Chicken Intestinal Cytosol Employing High Specific Activity 1,25-Dihydroxy[H-3-26, 27]Vitamin-D3. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **197**, 90-95 (1979).
129. Dusso,A.S., Brown,A.J. & Slatopolsky,E. Vitamin D. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **289**, F8-F28 (2005).
130. Brown,A.J., Dusso,A. & Slatopolsky,E. Vitamin D. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **277**, F157-F175 (1999).
131. Bourdeau,A., Atmani,F., Grosse,B. & Lieberherr,M. Rapid Effects of 1,25-Dihydroxyvitamin-D3 and Extracellular Ca-2+ on Phospholipid-Metabolism in Dispersed Porcine Parathyroid Cells. *Endocrinology* **127**, 2738-2743 (1990).
132. Lieberherr,M., Grosse,B., Duchambon,P. & Drueke,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. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 20403-20406 (1989).
133. Hruska,K.A., Barshavit,Z., Malone,J.D. & Teitelbaum,S. Ca-2+ Priming During Vitamin-D-Induced Monocytic Differentiation of A Human-Leukemia Cell-Line. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 16039-16044 (1988).
134. Guillemant,J. & Guillemant,S. Early Rise in Cyclic-Gmp After 1,25-Dihydroxycholecalciferol Administration in the Chick Intestinal-Mucosa. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **93**, 906-911 (1980).
135. Beno,D.W.A., Brady,L.M., Bissonnette,M. & Davis,B.H. Protein-Kinase-C and Mitogen-Activated Protein-Kinase Are Required for 1,25-Dihydroxyvitamin D-3-Stimulated Egr Induction. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 3642-3647 (1995).
136. Zanello,L.P. & Norman,A.W. 1 alpha,25(OH)(2) vitamin D-3-mediated stimulation of outward anionic currents in osteoblast-like ROS 17/2.8 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **225**, 551-556 (1996).
137. Nemere,I., Dormanen,M.C., Hammond,M.W., Okamura,W.H. & Norman,A.W. Identification of A Specific Binding-Protein for 1-Alpha,25-Dihydroxyvitamin D-3 in Basal-Lateral Membranes of Chick Intestinal Epithelium and Relationship to Transcaltachia. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 23750-23756 (1994).
138. Holick,M.F. Vitamin D: A millenium perspective. *Journal of Cellular Biochemistry* **88**, 296-307 (2003).
139. Brown,A.J., Krits,I. & Armbrecht,H.J. Effect of age, vitamin D, and calcium on the regulation of rat intestinal epithelial calcium channels. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **437**, 51-58 (2005).

Bibliografia

140. Kondo,T., Kitazawa,R., Maeda,S. & Kitazawa,S. 1 alpha,25 dihydroxyvitamin D-3 rapidly regulates the mouse osteoprotegerin gene through dual pathways. *Journal of Bone and Mineral Research* **19**, 1411-1419 (2004).
141. Dusso,A.S., Thadhani,R. & Slatopolsky,E. Vitamin D receptor and analogs. *Seminars in Nephrology* **24**, 10-16 (2004).
142. Nykjaer,A. *et al.* An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D-3. *Cell* **96**, 507-515 (1999).
143. Hoenderop,J.G.J., Nilius,B. & Bindels,R.J.M. Calcium absorption across epithelia. *Physiological Reviews* **85**, 373-422 (2005).
144. Brown,A.J., Dusso,A. & Slatopolsky,E. Vitamin D. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **277**, F157-F175 (1999).
145. Monkawa,T., Yoshida,T., Hayashi,M. & Saruta,T. Identification of 25-hydroxyvitamin D-3 1 alpha-hydroxylase gene expression in macrophages. *Kidney International* **58**, 559-568 (2000).
146. Martinez,M.E. & Willett,W.C. Calcium, vitamin D, and colorectal cancer: A review of the epidemiologic evidence. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **7**, 163-168 (1998).
147. Ruggiero,M. *et al.* Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with metastatic breast cancer. *Oncology Research* **10**, 43-46 (1998).
148. Ma,J. *et al.* Vitamin D receptor polymorphisms, circulating vitamin D metabolites, and risk of prostate cancer in united states physicians. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **7**, 385-390 (1998).
149. Delissalde,F. *et al.* Vitamin D induces proliferation in rat endometrium cultured cells. *Revista de Investigacion Clinica* **50**, 113-118 (1998).
150. Krohn,K. *et al.* 1,25(OH)(2)D-3 and dihydrotestosterone interact to regulate proliferation and differentiation of epiphyseal chondrocytes. *Calcified Tissue International* **73**, 400-410 (2003).
151. Bikle,D.D. Clinical Counterpoint - Vitamin-D - New Actions, New Analogs, New Therapeutic Potential. *Endocrine Reviews* **13**, 765-784 (1992).
152. Brown,A.J., Dusso,A. & Slatopolsky,E. Selective vitamin D analogs and their therapeutic applications. *Semin. Nephrol.* **14**, 156-174 (1994).
153. Brown,A.J. *et al.* 1 alpha,25-dihydroxy-3-epi-vitamin D-3, a natural metabolite of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3, is a potent suppressor of parathyroid hormone secretion. *Journal of Cellular Biochemistry* **73**, 106-113 (1999).
154. Llach,F. & Yudd,M. Paricalcitol in dialysis patients with calcitriol-resistant secondary hyperparathyroidism. *American Journal of Kidney Diseases* **38**, S45-S50 (2001).
155. Martin,K.J. *et al.* Paricalcitol dosing according to body weight or severity of hyperparathyroidism: A double-blind, multicenter, randomized study. *American Journal of Kidney Diseases* **38**, S57-S63 (2001).

Bibliografia

156. Slatopolsky,E. *et al.* A New Analog of Calcitriol, 19-Nor-1,25-(OH)(2)D-2, Suppresses Parathyroid-Hormone Secretion in Uremic Rats in the Absence of Hypercalcemia. *American Journal of Kidney Diseases* **26**, 852-860 (1995).
157. Takahashi,F. *et al.* A new analog of 1,25-(OH)(2)D-3, 19-NOR-1,25-(OH)(2)D-2, suppresses serum PTH and parathyroid gland growth in uremic rats without elevation of intestinal vitamin D receptor content. *American Journal of Kidney Diseases* **30**, 105-112 (1997).
158. Holick,M.F. Vitamin D: A millenium perspective. *Journal of Cellular Biochemistry* **88**, 296-307 (2003).
159. Martin,K.J. *et al.* Paricalcitol dosing according to body weight or severity of hyperparathyroidism: A double-blind, multicenter, randomized study. *American Journal of Kidney Diseases* **38**, S57-S63 (2001).
160. Inoue,T. & Kawashima,H. 1,25-Dihydroxyvitamin-D3 Stimulates Ca-45(2+)-Uptake by Cultured Vascular Smooth-Muscle Cells Derived from Rat Aorta. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **152**, 1388-1394 (1988).
161. Rajasree,S., Umashankar,P.R., Lal,A.V., Sarma,P.S. & Kartha,C.C. 1,25-dihydroxyvitamin D-3 receptor is upregulated in aortic smooth muscle cells during hypervitaminosis D. *Life Sciences* **70**, 1777-1788 (2002).
162. Rajasree,S., Umashankar,P.R., Lal,A.V., Sarma,P.S. & Kartha,C.C. 1,25-dihydroxyvitamin D-3 receptor is upregulated in aortic smooth muscle cells during hypervitaminosis D. *Life Sciences* **70**, 1777-1788 (2002).
163. Maccarthy,E.P., Yamashita,W., Hsu,A. & Ooi,B.S. 1,25-Dihydroxyvitamin-D3 and Rat Vascular Smooth-Muscle Cell-Growth. *Hypertension* **13**, 954-959 (1989).
164. Rebsamen,M.C., Sun,J.X., Norman,A.W. & Liao,J.K. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3 induces vascular smooth muscle cell migration via activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Circulation Research* **91**, 17-24 (2002).
165. Cardus,A. *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through a VEGF-mediated pathway. *Kidney Int.* **69**, 1377-1384 (2006).
166. Cardus,A. *et al.* Calcitriol stimulates vascular smooth muscle cells (VSMCs) proliferation. *Journal of the American Society of Nephrology* **13**, 197A (2002).
167. 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. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **17**, 1135-1142 (1997).
168. Shroff,R. *et al.* A bimodal association of vitamin D levels and vascular disease in children on dialysis. *Journal of the American Society of Nephrology* **19**, 1239-1246 (2008).
169. Montell,C., Birnbaumer,L. & Flockerzi,V. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* **108**, 595-598 (2002).
170. Montell,C. *et al.* A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Molecular Cell* **9**, 229-231 (2002).

Bibliografia

171. Montell,C. *et al.* A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Molecular Cell* **9**, 229-231 (2002).
172. Pedersen,S.F., Owsianik,G. & Nilius,B. TRP channels: An overview. *Cell Calcium* **38**, 233-252 (2005).
173. Clapham,D.E. TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**, 517-524 (2003).
174. Venkatachalam,K. & Montell,C. TRP channels. *Annual Review of Biochemistry* **76**, 387-417 (2007).
175. Montell,C., Birnbaumer,L. & Flockerzi,V. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* **108**, 595-598 (2002).
176. Nilius,B., Owsianik,G., Voets,T. & Peters,J.A. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiological Reviews* **87**, 165-217 (2007).
177. Yamagishi,N. *et al.* Expression of Calbindin-D-9k messenger ribonucleic acid in the gastrointestinal tract of dairy cattle. *Journal of Veterinary Medicine Series A-Physiology Pathology Clinical Medicine* **49**, 461-465 (2002).
178. Hildmann,B., Schmidt,A. & Murer,H. Ca⁺⁺⁺-Transport Across Basal-Lateral Plasma-Membranes from Rat Small Intestinal Epithelial-Cells. *Journal of Membrane Biology* **65**, 55-62 (1982).
179. van Abel,M., Hoenderop,J.G.J., van der Kemp,A.W.C.M., van Leeuwen,J.P.T.M. & Bindels,R.J.M. Regulation of the epithelial Ca²⁺ channels in small intestine as studied by quantitative mRNA detection. *Journal of the American Society of Nephrology* **14**, 465A-466A (2003).
180. Hoenderop,J.G.J. *et al.* Renal Ca²⁺ wasting, hyperabsorption, and reduced bone thickness in mice lacking TRPV5. *Journal of Clinical Investigation* **112**, 1906-1914 (2003).
181. Hsu,Y.J., Hoenderop,J.G.J. & Bindels,R.J.M. TRP channels in kidney disease. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* **1772**, 928-936 (2007).
182. Goel,M., Sinkins,W.G., Zuo,C.D., Estacion,M. & Schilling,W.P. Identification and localization of TRPC channels in the rat kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **290**, F1241-F1252 (2006).
183. Hoenderop,J.G.J., Nilius,B. & Bindels,R.J.M. Calcium absorption across epithelia. *Physiological Reviews* **85**, 373-422 (2005).
184. Hoenderop,J.G.J. *et al.* Molecular identification of the apical Ca²⁺ channel in 1,25-dihydroxyvitamin D-3-responsive epithelia. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 8375-8378 (1999).
185. Nijenhuis,T., Hoenderop,J.G.J., van der Kemp,A.W.C.M. & Bindels,R.J.M. Localization and regulation of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV6 in the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology* **14**, 2731-2740 (2003).
186. Hoenderop,J.G.J. & Bindels,R.J.M. Calcitropic and magnetotropic TRP channels. *Physiology* **23**, 32-40 (2008).

Bibliografia

187. Hoenderop,J.G.J. *et al.* Molecular identification of the apical Ca²⁺ channel in 1,25-dihydroxyvitamin D-3-responsive epithelia. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 8375-8378 (1999).
188. Hoenderop,J.G.J. *et al.* Localization of the epithelial Ca²⁺ channel in rabbit kidney and intestine. *Journal of the American Society of Nephrology* **11**, 1171-1178 (2000).
189. de Groot,T. *et al.* Parathyroid Hormone Activates TRPV5 via PKA-Dependent Phosphorylation. *Journal of the American Society of Nephrology* **20**, 1693-1704 (2009).
190. Riccardi,D. *et al.* Localization of the extracellular Ca²⁺-sensing receptor and PTH/PTHrP receptor in rat kidney. *American Journal of Physiology-Renal Fluid and Electrolyte Physiology* **271**, F951-F956 (1996).
191. van Abel,M. *et al.* Coordinated control of renal Ca²⁺ transport proteins by parathyroid hormone. *Kidney International* **68**, 1708-1721 (2005).
192. Dardenne,O., Prud'homme,J., Hacking,S.A., Glorieux,F.H. & St Arnaud,R. Correction of the abnormal mineral ion homeostasis with a high-calcium, high-phosphorus, high-lactose diet rescues the PDDR phenotype of mice deficient for the 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase (CYP27B1). *Bone* **32**, 332-340 (2003).
193. Hoenderop,J.G.J. *et al.* Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney. *Journal of the American Society of Nephrology* **12**, 1342-1349 (2001).
194. Hoenderop,J.G.J. *et al.* Modulation of renal Ca²⁺ transport protein genes by dietary Ca²⁺ and 1,25-dihydroxyvitamin D-3 in 25-hydroxyvitamin D-3-1 alpha-hydroxylase knockout mice. *Faseb Journal* **16**, 1398-1406 (2002).
195. Van Cromphaut,S.J. *et al.* Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: Functional and molecular aspects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 13324-13329 (2001).
196. Muller,D., Hoenderop,J.G.J., Merks,G.F.M., van Os,C.H. & Bindels,R.J.M. Gene structure and chromosomal mapping of human epithelial calcium channel. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **275**, 47-52 (2000).
197. Bro,S. & Olgaard,K. Effects of excess PTH on nonclassical target organs. *American Journal of Kidney Diseases* **30**, 606-620 (1997).
198. Slatopolsky,E. & Brown,A.J. Vitamin D analogs for the treatment of secondary hyperparathyroidism. *Blood Purification* **20**, 109-112 (2002).
199. Bro,S. & Olgaard,K. Effects of excess PTH on nonclassical target organs. *American Journal of Kidney Diseases* **30**, 606-620 (1997).
200. Knutson,J.C., Levan,L.W., Valliere,C.R. & Bishop,C.W. Pharmacokinetics and systemic effect on calcium homeostasis of 1 alpha,24-dihydroxyvitamin D-2 in rats - Comparison with 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-2, calcitriol, and calcipotriol. *Biochemical Pharmacology* **53**, 829-837 (1997).
201. Knutson,J.C. *et al.* Metabolism of 1-Alpha-Hydroxyvitamin D-2 to Activated Dihydroxyvitamin D-2 Metabolites Decreases Endogenous 1-Alpha-25-Dihydroxyvitamin D-3 in Rats and Monkeys. *Endocrinology* **136**, 4749-4753 (1995).

Bibliografia

202. Hoenderop,J.G.J., van der Kemp,A.W.C.M., Urben,C.M., Strugnell,S.A. & Bindels,R.J.M. Effects of vitamin D compounds on renal and intestinal Ca²⁺ transport proteins in 25-hydroxyvitamin D-3-1 alpha-hydroxylase knockout mice. *Kidney International* **66**, 1082-1089 (2004).
203. Urakawa,I. *et al.* Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* **444**, 770-774 (2006).
204. Reichel,H. Current treatment options in secondary renal hyperparathyroidism - Reply. *Nephrology Dialysis Transplantation* **21**, 2989-2990 (2006).
205. Kuroo,M. *et al.* Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* **390**, 45-51 (1997).
206. Koh,N. *et al.* Severely reduced production of Klotho in human chronic renal failure kidney. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **280**, 1015-1020 (2001).
207. Chang,Q. *et al.* The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science* **310**, 490-493 (2005).
208. Segawa,H. *et al.* Correlation between hyperphosphatemia and type IINa-P(i) cotransporter activity in klotho mice. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **292**, F769-F779 (2007).
209. Chang,Q. *et al.* The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science* **310**, 490-493 (2005).
210. Pickering,J.G. *et al.* Smooth-Muscle Cell Outgrowth from Human Atherosclerotic Plaque - Implications for the Assessment of Lesion Biology. *Journal of the American College of Cardiology* **20**, 1430-1439 (1992).
211. Li,Y.C. *et al.* Targeted ablation of the vitamin D receptor: An animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 9831-9835 (1997).
212. Dardenne,O., Prud'homme,J., Arabian,A., Glorieux,F.H. & St Arnaud,R. Targeted inactivation of the 25-hydroxyvitamin D-3-1 alpha-hydroxylase gene (CYP27B1) creates an animal model of pseudovitamin D-deficiency rickets. *Endocrinology* **142**, 3135-3141 (2001).
213. Panda,D.K. *et al.* Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin D 1 alpha-hydroxylase enzyme: Evidence for skeletal, reproductive and immune dysfunction. *Journal of Bone and Mineral Research* **16**, S232 (2001).
214. Panda,D.K. *et al.* Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin D 1a-hydroxylase enzyme: Evidence for skeletal, reproductive and immune dysfunction. *Journal of Bone and Mineral Research* **16**, S314 (2001).
215. Dardenne,O., Prud'Homme,J., Hacking,S.A., Glorieux,F.H. & St Arnaud,R. Rescue of the pseudovitamin D deficiency rickets phenotype of CYP27B1-deficient mice by treatment with 1,25-dihydroxyvitamin D-3: Biochemical, histomorphometric, and biomechanical analyses. *Journal of Bone and Mineral Research* **18**, 637-643 (2003).
216. Rowling,M.J., Gliniak,C., Welsh,J. & Fleet,J.C. High dietary vitamin D prevents hypocalcemia and osteomalacia in CYP27B1 knockout mice. *Journal of Nutrition* **137**, 2608-2615 (2007).

Bibliografia

217. Panda,D.K. *et al.* Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase enzyme: Evidence for skeletal, reproductive and immune dysfunction. *Journal of Bone and Mineral Research* **16**, S314 (2001).
218. St Arnaud,R. *et al.* Deficient mineralization of intramembranous bone in vitamin D-24-hydroxylase-ablated mice is due to elevated 1,25-dihydroxyvitamin D and not to the absence of 24,25-dihydroxyvitamin D. *Endocrinology* **141**, 2658-2666 (2000).
219. Panda,D.K. *et al.* Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase enzyme: Evidence for skeletal, reproductive and immune dysfunction. *Journal of Bone and Mineral Research* **16**, S314 (2001).
220. Amann,K. *et al.* Aortic changes in experimental renal failure - Hyperplasia or hypertrophy of smooth muscle cells? *Hypertension* **29**, 770-775 (1997).
221. Moe,S.M., Duan,D., Doehle,B.P., O'Neill,K.D. & Chen,N.X. Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels 16. *Kidney International* **63**, 1003-1011 (2003).
222. Tsujikawa,H., Kurotaki,Y., Fujimori,T., Fukuda,K. & Nabeshima,Y.I. Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Molecular Endocrinology* **17**, 2393-2403 (2003).
223. Hewison,M., Zehnder,D., Bland,R. & Stewart,P.M. 1 α -hydroxylase and the action of vitamin D. *Journal of Molecular Endocrinology* **25**, 141-148 (2000).
224. Karakelides,H. *et al.* Vitamin D-mediated hypercalcemia in slack skin disease: Evidence for involvement of extrarenal 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase. *Journal of Bone and Mineral Research* **21**, 1496-1499 (2006).
225. van Driel,M. *et al.* Evidence for auto/paracrine actions of vitamin D in bone: 1 α -hydroxylase expression and activity in human bone cells. *Faseb Journal* **20**, 2417-+ (2006).
226. Dusso,A.S. *et al.* Extrarenal Production of Calcitriol in Normal and Uremic Humans. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **72**, 157-164 (1991).
227. Koyama,H. *et al.* Potentiated 1,25(OH)₂D-3-Induced 24-Hydroxylase Gene-Expression in Uremic Rat Intestine. *American Journal of Physiology-Renal Fluid and Electrolyte Physiology* **267**, F926-F930 (1994).
228. Hsu,C.H., Patel,S.R. & Young,E.W. Mechanism of Decreased Calcitriol Degradation in Renal-Failure. *American Journal of Physiology* **262**, F192-F198 (1992).
229. Shinki,T. *et al.* Parathyroid-Hormone Inhibits 25-Hydroxyvitamin-D(3)-24-Hydroxylase Messenger-Rna Expression Stimulated by 1-Alpha,25-Dihydroxyvitamin-D(3) in Rat-Kidney But Not in Intestine. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 13757-13762 (1992).
230. Koyama,H. *et al.* Impaired Homologous Up-Regulation of Vitamin-D Receptor in Rats with Chronic-Renal-Failure. *American Journal of Physiology* **266**, F706-F712 (1994).
231. Brown,A.J. *et al.* 1,25-(OH)₂D Receptors Are Decreased in Parathyroid-Glands from Chronically Uremic Dogs. *Kidney International* **35**, 19-23 (1989).

Bibliografia

232. Koyama,H. *et al.* Impaired Homologous Up-Regulation of Vitamin-D Receptor in Rats with Chronic-Renal-Failure. *American Journal of Physiology* **266**, F706-F712 (1994).
233. Patel,S.R., Ke,H.Q., Vanholder,R., Koenig,R.J. & Hsu,C.H. Inhibition of Calcitriol Receptor-Binding to Vitamin-D Response Elements by Uremic Toxins. *Journal of Clinical Investigation* **96**, 50-59 (1995).
234. Sawaya,B.P. *et al.* Secondary hyperparathyroidism and vitamin D receptor binding to vitamin D response elements in rats with incipient renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology* **8**, 271-278 (1997).
235. Szabo,A., Ritz,E., SchmidtGayk,H. & Reichel,H. Abnormal expression and regulation of vitamin D receptor in experimental uremia. *Nephron* **73**, 619-628 (1996).
236. Dusso,A.S. *et al.* Extrarenal Production of Calcitriol in Normal and Uremic Humans. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **72**, 157-164 (1991).
237. Panizo,S. *et al.* RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. *Circ. Res.* **104**, 1041-1048 (2009).
238. Moe,S.M., Duan,D., Doehle,B.P., O'Neill,K.D. & Chen,N.X. Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels. *Kidney International* **63**, 1003-1011 (2003).
239. Chen,N.X. *et al.* The mechanisms of uremic serum-induced expression of bone matrix proteins in bovine vascular smooth muscle cells 5. *Kidney International* **70**, 1046-1053 (2006).
240. Hewison,M., Zehnder,D., Chakraverty,R. & Adams,J.S. Vitamin D and barrier function: a novel role for extra-renal 1 alpha-hydroxylase. *Molecular and Cellular Endocrinology* **215**, 31-38 (2004).
241. Hewison,M., Zehnder,D., Bland,R. & Stewart,P.M. 1 alpha-hydroxylase and the action of vitamin D. *Journal of Molecular Endocrinology* **25**, 141-148 (2000).
242. Naja,R.P., Dardenne,O., Arabian,A. & Arnaud,R.S. Chondrocyte-Specific Modulation of Cyp27b1 Expression Supports a Role for Local Synthesis of 1,25-Dihydroxyvitamin D-3 in Growth Plate Development. *Endocrinology* **150**, 4024-4032 (2009).
243. Hewison,M., Zehnder,D., Chakraverty,R. & Adams,J.S. Vitamin D and barrier function: a novel role for extra-renal 1 alpha-hydroxylase. *Molecular and Cellular Endocrinology* **215**, 31-38 (2004).
244. Shan,J.J., Li,B., Taniguchi,N. & Pang,P.K.T. Inhibition of membrane L-type calcium channel activity and intracellular calcium concentration by 24R,25-dihydroxyvitamin D-3 in vascular smooth muscle. *Steroids* **61**, 657-663 (1996).
245. 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).
246. Yamamoto,T. *et al.* 1,25-dihydroxyvitamin D-3 stimulates vascular endothelial growth factor release in aortic smooth muscle cells: Role of p38 mitogen-activated protein kinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **398**, 1-6 (2002).

Bibliografia

247. Rebsamen,M.C., Sun,J.X., Norman,A.W. & Liao,J.K. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3 induces vascular smooth muscle cell migration via activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Circulation Research* **91**, 17-24 (2002).
248. Hewison,M. *et al.* Extra-renal 25-hydroxyvitamin D-3-1 alpha-hydroxylase in human health and disease. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **103**, 316-321 (2007).
249. Abreu,M.T. *et al.* Measurement of vitamin D levels in inflammatory bowel disease patients reveals a subset of Crohn's disease patients with elevated 1,25-dihydroxyvitamin D and low bone mineral density. *Gut* **53**, 1129-1136 (2004).
250. Fleet,J.C. & Schoch,R.D. Molecular mechanisms for regulation of intestinal calcium absorption by vitamin D and other factors. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **47**, 181-195 (2010).
251. Zhang,Z.L., Ding,X.F., Tong,J. & Li,B.Y. Partial Rescue of the Phenotype in 1 alpha-Hydroxylase Gene Knockout Mice by Vitamin D3 Injection. *Endocrine Research* **36**, 101-108 (2011).
252. Panda,D.K. *et al.* Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin D 1 alpha-hydroxylase enzyme: Evidence for skeletal, reproductive and immune dysfunction. *Journal of Bone and Mineral Research* **16**, S232 (2001).
253. Dardenne,O., Prud'homme,J., Hacking,S.A., Glorieux,F.H. & St Arnaud,R. Rescue of the pseudo-vitamin D deficiency rickets phenotype of CYP27B1-deficient mice by treatment with 1,25-dihydroxyvitamin D-3: Biochemical, histomorphometric, and biomechanical analyses. *Journal of Bone and Mineral Research* **18**, 637-643 (2003).
254. Dardenne,O., Prud'homme,J., Hacking,S.A., Glorieux,F.H. & St Arnaud,R. Correction of the abnormal mineral ion homeostasis with a high-calcium, high-phosphorus, high-lactose diet rescues the PDDR phenotype of mice deficient for the 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase (CYP27B1). *Bone* **32**, 332-340 (2003).
255. Dardenne,O., Prud'homme,J., Hacking,S.A., Glorieux,F.H. & St Arnaud,R. Correction of the abnormal mineral ion homeostasis with a high-calcium, high-phosphorus, high-lactose diet rescues the PDDR phenotype of mice deficient for the 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase (CYP27B1). *Bone* **32**, 332-340 (2003).
256. Hoenderop,J.G.J., van der Kemp,A.W.C.M., Urben,C.M., Strugnell,S.A. & Bindels,R.J.M. Effects of vitamin D compounds on renal and intestinal Ca²⁺ transport proteins in 25-hydroxyvitamin D-3-1 alpha-hydroxylase knockout mice. *Kidney International* **66**, 1082-1089 (2004).
257. Hoenderop,J.G.J. *et al.* Modulation of renal Ca²⁺ transport protein genes by dietary Ca²⁺ and 1,25-dihydroxyvitamin D-3 in 25-hydroxyvitamin D-3-1 alpha-hydroxylase knockout mice. *Faseb Journal* **16**, 1398-1406 (2002).
258. Rowling,M.J., Gliniak,C., Welsh,J. & Fleet,J.C. High dietary vitamin D prevents hypocalcemia and osteomalacia in CYP27B1 knockout mice. *Journal of Nutrition* **137**, 2608-2615 (2007).
259. Lee,D.R., Kong,J.M., Cho,K.I. & Chan,L. Impact of Vitamin D on Proteinuria, Insulin Resistance, and Cardiovascular Parameters in Kidney Transplant Recipients. *Transplantation Proceedings* **43**, 3723-3729 (2011).

Bibliografia

260. Sanchez-Nino, M.D. *et al.* Beyond proteinuria: VDR activation reduces renal inflammation in experimental diabetic nephropathy. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **302**, F647-F657 (2012).
261. Lou, Y.R. *et al.* 25-Hydroxyvitamin D-3 is an agonistic vitamin D receptor ligand. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **118**, 162-170 (2010).

