

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Departamento de Medicina

**EFECTO DIFERENCIAL DEL CALCITRIOL Y
DEL PARICALCITOL SOBRE EL PROCESO
DE CALCIFICACION EN CELULAS DE
MUSCULO LISO VASCULAR. MECANISMOS
INTRACELULARES IMPLICADOS**

**Trabajo presentado por Julio Manuel Martínez Moreno,
licenciado en Bioquímica, para optar al grado de Doctor.**

TITULO: *EFEECTO DIFERENCIAL DEL CALCITRIOL Y DEL PARICALCITOL
SOBRE EL PROCESO DE CALCIFICACION EN CELULAS DE
MUSCULO LISO VASCULAR. MECANISMOS INTRACELULARES
IMPLICADOS*

AUTOR: *Julio Manuel Martínez Moreno*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2015
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: Efecto diferencial del calcitriol y del paricalcitol sobre el proceso de calcificación en células de músculo liso vascular. Mecanismos intracelulares implicados.

DOCTORANDO/A: Julio Manuel Martínez Moreno

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

El trabajo de investigación que se presenta es un trabajo original que ha permitido avanzar en el conocimiento de los mecanismos intracelulares específicos relacionados con el desarrollo de la Calcificación Vascular e Inflamación inducidos por niveles elevados de fósforo, así como en los efectos que la Vitamina D (Calcitriol) y su análogo Paricalcitol ejercen sobre dichos procesos. Los resultados obtenidos en este estudio, que han sido publicados (Am J Physiol Renal Physiology, 2012) o están en fase de preparación para ser sometidos en revistas internacionales de alto impacto, tienen un evidente carácter traslacional, pues ofrecen claves novedosas que ayudarán a mejorar los aspectos terapéuticos, y por tanto, el pronóstico de los pacientes con insuficiencia renal, que muestran una alta prevalencia de calcificaciones vasculares. Asimismo, cabe destacar que el desarrollo de esta tesis ha permitido que el doctorando adquiera conocimientos teóricos y metodológicos que le capacitan para desarrollar nuevas hipótesis y participar activamente en la coordinación y desarrollo de nuevos proyectos de investigación.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, __17__ de _____ Diciembre _____ de __2014__

Firma del/de los director/es

Fdo.: Yolanda Almadén Peña

Fdo.: Juan Rafael Muñoz Castañeda

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	13
RESUMEN	23
SUMMARY	29
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	35
1. ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.	37
1.1. ALTERACIONES DEL METABOLISMO MINERAL EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA	39
1.1.1. Homeostasis del fósforo en la enfermedad renal crónica.....	41
1.1.2. Homeostasis del calcio en la enfermedad renal crónica.	43
1.1.3. Hiperparatiroidismo Secundario.....	44
1.1.4. Klotho y FGF23.....	46
2. LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA	48
2.1. ESTRUCTURA DE LOS VASOS SANGUÍNEOS	50

2.2. LA CÉLULA DE MÚSCULO LISO VASCULAR.....	51
2.2.1. Plasticidad fenotípica.....	52
2.2.2. Proteínas miogénicas.....	54
<u>2.2.2.1 Alfa actina de músculo liso (α-SMA).....</u>	55
<u>2.2.2.2. Calponina.....</u>	55
<u>2.2.2.3 SM22α.....</u>	56
2.3. TIPOS DE CALCIFICACION VASCULAR.....	57
2.3.1. Calcificación de la íntima.....	58
2.3.2. Calcificación de la túnica media.....	59
ELEMENTOS CELULARES Y MOLECULARES RESPONSABLES DE LAS CALCIFICACIONES VASCULARES.....	60
2.4.1. Factores inductores de las Calcificaciones Vasculares.....	61
<u>2.4.1.1. Calcio y fósforo.....</u>	61
<u>2.4.1.2. Calcitriol.....</u>	66
<u>2.4.1.3. Suero urémico y citoquinas pro-inflamatorias.....</u>	68

2.4.2. Genes y proteínas implicadas en la diferenciación osteogénica.....	70
<u>2.4.2.1. Runx2</u>	70
<u>2.4.2.2. BMP2</u>	72
<u>2.4.2.3. Msx2</u>	75
<u>2.4.2.4. Osteocalcina</u>	76
2.4.3. Pérdida de factores inhibidores de la calcificación.....	77
<u>2.4.3.1. MGP</u>	78
<u>2.4.3.2. Osteopontina</u>	80
<u>2.4.3.3. Pirofosfato</u>	82
<u>2.4.3.4. Fetuína-A</u>	82
2.4.4. Micropartículas y Apoptosis.....	84
2.4.5. Degradación de la elastina.....	86
3. RUTAS MOLECULARES DE SEÑALIZACIÓN DURANTE EL PROCESO DE CALCIFICACIÓN.....	87
1) <u>Ruta canónica Wnt/β-Catenina</u>	89

2) <u>Vía de polaridad celular planar</u>	91
3) <u>Vía Wnt dependiente de Ca⁺²</u>	92
4. INFLAMACIÓN EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.....	94
4.1. CITOQUINAS.....	96
<u>4.1.1 ICAM-1 (CD54)</u>	98
<u>4.1.2 Interleuquina 6 (IL-6)</u>	99
<u>4.1.3 Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF-α)</u>	101
<u>4.1.4 Interleuquina-1 (IL-1)</u>	103
<u>4.1.5 Interleuquina-8 (IL-8)</u>	106
4.2. EL ESTADO OXIDATIVO EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA....	106
4.3. INFLAMACIÓN COMO FACTOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR....	108
4.4. PRINCIPALES CAUSAS DE INFLAMACIÓN EN LA	
ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.....	109
5. VITAMINA D.....	112

5.1. ESTRUCTURA, BIOSÍNTESIS Y MECANISMO DE ACCIÓN DE LA VITAMINA D.....	113
5.2. VITAMINA D EN ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.....	119
5.3. LA VITAMINA D Y EL SISTEMA INMUNE.....	120
5.3.1. Metabolismo de la vitamina D en el sistema inmune.....	120
5.3.2. Efecto inmunomodulador de la vitamina D.....	122
5.3. ANÁLOGOS DE LA VITAMINA D.....	125
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	129
MATERIAL Y MÉTODOS.....	135
1. CULTIVO DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR.....	137
1.1. RECUENTO Y DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR...	138
2. DISEÑOS Y TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES.....	139
3. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE CALCIFICACION.....	145
3.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO BRADFORD	146

4. DETERMINACION DE LA EXPRESION GENICA DE MARCADORES OSTEOGENICOS POR RT-PCR.....	148
4.1. RT-PCR.....	149
4.1.1. Recogida de muestras de cultivo de Células de Músculo Liso Vascular.....	149
4.1.2. Extracción de ARN.....	149
4.1.3. Cuantificación de ARN.....	150
4.1.4 Tratamiento con ADNasa.....	151
4.1.5. RT-PCR a tiempo real.....	151
4.1.6. Eficiencia de las reacciones.....	155
4.1.7. Verificación del producto amplificado.....	157
5. ESTUDIO DE LA RUTA CANÓNICA WNT/B-CATENINA.....	158
5.1. MICROSCOPIA CONFOCAL.....	158
5.2. WESTERN BLOT.....	160
5.2.1. Electroforesis.....	161
5.2.2. Preparación de las muestras.....	161

5.2.3 Transferencia de proteínas.....	161
5.2.4. Bloqueo de la membrana.....	162
5.2.5. Inmunodetección con anticuerpo primario y secundario.....	162
5.2.6. Revelado.....	163
5.3. RT-PCR.....	165
6. VALORACION DE LOS CAMBIOS EN EL ESTADO INFLAMATORIO INDUCIDOS POR LOS TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES.	165
6.1. MICROSCOPIA CONFOCAL.....	166
6.2. WESTERN BLOT.....	166
6.3 RT-PCR.....	167
6.4 DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS INFLAMATORIAS POR BIO-PLEX.....	168
6.5. CITOMETRÍA DE FLUJO.....	169
7. PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....	170
7.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA LA DETERMINACIÓN DE EROS.....	171

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	172
9. REDACCIÓN Y PRESENTACIÓN GRÁFICA.....	172
RESULTADOS	173
1. EFECTO DIFERENCIAL DEL CALCITRIOL Y DEL PARICALCITOL SOBRE LA CALCIFICACIÓN INDUCIDA POR NIVELES ELEVADOS DE FOSFATO EN CELULAS DE MUSCULO LISO VASCULAR (CMLV).....	175
2. EFECTO DEL CALCITRIOL Y DEL PARICALCITOL SOBRE LA EXPRESION DE MARCADORES DE DIFERENCIACION OSTEOGÉNICA DURANTE LA CALCIFICACION.....	176
3. IMPLICACIÓN DE LA RUTA CANÓNICA WNT/BETA-CATENINA EN LA TRANSDIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE LAS CMLV DURANTE EL PROCESO DE CALCIFICACIÓN. EFECTO DIFERENCIAL DEL CALCITRIOL Y PARICALCITOL.....	178
3.1. Niveles de β -Catenina nuclear.....	178
3.2. Efecto del fosfato, calcitriol y paricalcitol sobre la expresión de genes diana de la Ruta Wnt/ β -Catenina.....	181
3.3. Efecto de la inhibición de la ruta Wnt/ β -Catenina sobre los procesos de transdiferenciación y la calcificación en CMLV.....	183

3.3.1. <i>Efecto de la inhibición de la ruta Wnt/β-Catenina con Dkk-1 sobre la translocación nuclear de β-Catenina</i>	183
3.3.2. <i>Efecto de la inhibición de la vía Wnt/β-catenina mediante Dkk-1 sobre la expresión de genes diana de dicha ruta</i>	185
3.3.3. <i>Efecto de la inhibición de la vía Wnt/β-catenina mediante Dkk-1 sobre la calcificación en CMLV</i>	187
4. EFECTO DEL FOSFATO, DEL CALCITRIOL Y DEL PARICALCITOL SOBRE LA INFLAMACIÓN EN CMLV	188
4.1. Efecto de niveles elevados de fosfato sobre la expresión génica de citoquinas inflamatorias en células del músculo liso vascular. Modulación diferencial por calcitriol y paricalcitol	188
4.2. Efecto del fosfato, calcitriol y paricalcitol sobre la presentación de ICAM-1 en la superficie celular y la secreción de citoquinas en CMLV	191
4.3. Activación de la ruta de señalización de NFκB/p65 por niveles elevados de fosfato. Efecto diferencial del calcitriol y del paricalcitol	195
5. EFECTO DEL FOSFATO, DEL CALCITRIOL Y DEL PARICALCITOL SOBRE LA GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROs) EN CMLV	198

6. EFECTO “DOSIS DEPENDIENTE” DEL CALCITRIOL SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CITOQUINAS, LA ACTIVACIÓN DE NFκβ Y LA GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....	200
6.1. Efecto “dosis-dependiente” del calcitriol sobre la expresión génica de citoquinas inflamatorias en CMLV cultivadas con niveles elevados de fosfato.....	200
6.2 Efecto “dosis-dependiente” del calcitriol sobre el nivel de ICAM-1 en la superficie de CMLV y la secreción de citoquinas inducidos por fosfato.....	202
6.3. Efecto “dosis-dependiente” del calcitriol sobre la translocación nuclear de NFκβ en CMLV cultivadas con fosfato alto.....	206
6.4. Efecto “dosis-dependiente” del CTR sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en CMLV tratadas con fosfato alto.....	208
DISCUSIÓN.....	209
CONCLUSIONES.....	235
BIOGRAFÍA.....	239

ABREVIATURAS

1,25(OH)2D3	1,25-dihidroxitamina D3 Vitamina D, Calcitriol
25(OH)D3	Calcidiol, calcifediol, 25-hidroxicolecalciferol
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia.
AKT	Proteína kinasa B
APC	Adenomatous polyposis coli
ApoE	Apolipoproteína E
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosil trifosfato
BGP	Osteocalcina (del inglés <i>Bone Gla Protein</i>)
BMP2	Proteína Morfogénica de Hueso 2 (del inglés <i>bone morphogenetic protein 2</i>)
BMP4	Proteína Morfogénica de Hueso 4 (del inglés <i>bone morphogenetic protein 4</i>)
BMPR2	Receptor de proteína morfogénica de hueso tipo II
BrEt	Bromuro de Etidio
BSA	Sero Albúmina bovina (del inglés <i>bovine serum albumin</i>)
BSP	Sialoproteína Ósea (del inglés <i>bone sialoprotein</i>)
Ca	Calcio
CaMKII	Calmodulina

CAT	Catalasa
Cbfa1	Factor de unión al núcleo α -1, Runx2
CBP	Proteína de unión a CREB (del inglés, CREB binding protein)
CD1	Ciclina D1
CKD-MBD	Enfermedad renal crónica-tesorden mineral y óseo (del inglés <i>Chronic kidney disease-mineral and bone disorder</i>)
CKIα	Caseín quinasa-I α
CM	Calcimimético
CML	Células de Músculo Liso
CMLV	Células de Músculo Liso Vascular
Ct:	Ciclo umbral (del inglés <i>threshold cycle</i>)
CTR	Calcitriol
CUA	Arteriopatía Urémica Calcificante
CV	Calcificaciones Vasculares
CVC	Células Vasculares Calcificantes
Daam1	Activador de morfogénesis 1 asociado a Dishevelled (del inglés <i>Disheveled-associated activator of morphogenesis 1</i>)
DAG	Diacilglicerol
DBP	Proteína de unión a la vitamina D (del inglés <i>Vitamin D-Binding-Protein</i>)
DCP	Deposición de Ca y Pi

Dkk1	<i>Dickkopf-related protein 1</i>
Dlx5	Distal-less homeobox 5
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DO	Densidad Optica
Dsh	(del inglés <i>Dishevelled</i>)
DTT	Ditiotreitol
EA	Explantos de Aorta de rata
ECV	Enfermedad cardiovascular
EDTA	Etilendiaminotetraacético
ELISA:	Inmunoensayo enzimático (del inglés <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EO	Estrés oxidativo
ERC	Enfermedad renal crónica
EROs	Especies reactivas de oxígeno
ERT	Enfermedad renal terminal
FBS	Suero fetal bovino (del inglés <i>fetal bovine serum</i>)
FG	Filtrado glomerular
FGF23	Factor de crecimiento de fibroblastos 23 (del inglés <i>Fibroblast growth factor 23</i>)
FGFR	receptor de FGF23
FITC	Isotiocianato de fluoresceína

FZD	Frizzled
g	Gravedad
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa
GSH	Glutati3n reducido
GSK-3β	Gluc3geno sintasa quinasa-3 β
H2DCFDA	Diacetato de 2', 7'dihidro-dicloro-fluoresce3na (del ingl3s 2',7'- <i>dichlorodihydrofluorescein diacetate</i>)
HBSS	Soluci3n Hanks (del ingl3s <i>Hanks Balanced Salt Solution</i>)
HD	Hemodi3lisis
HPT2^o	Hiperparatiroidismo secundario
HRP	Peroxidasa (del ingl3s <i>horseradish peroxidase</i>)
ICAM-1	CD 54, Mol3cula de Adhesi3n Intercelular-1 (del ingl3s <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>)
IFNγ	Interferon gamma
IL-1β	Interleuquina 1 Beta
IL-6	Interleuquina 6
IL-8	Interleuquina 8
IP3	Inositol trifosfato
IRC	Insuficiencia Renal Cr3nica
LBD	Dominio de uni3n al ligando (del ingl3s <i>Ligand binding domain</i>)
LBD	dominio de uni3n al ligando

LDL	Lipoproteína de baja densidad
LFA-1	Antígeno-1 de Función Asociada de Leucocito (del inglés <i>leukocyte function-associated antigen-1</i>)
LPS	Lipopolisacáridos
LRP5	Coreceptor, Proteína 5 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad
M	Molar
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos-1 (del inglés <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>)
MGP	Proteína Gla de Matriz
MHC	Miosina de cadena pesada de músculo liso
MMP	Metaloproteinasas de la matriz extracelular (del inglés <i>Matrix metalloproteinase</i>)
Msx2	Msh homeobox 2
NFκβ	Factor nuclear κβ (del inglés <i>Nuclear Factor κβ</i>)
NKT	Células T “Natural Killer”
OC	Osteocalcina, BGP (del inglés <i>Bone Gla Protein</i>)
ODR	Osteodistrofia renal
OPN	Osteopontina , BSP-1 o BNSP
P	Fósforo, fosfato
P	Probabilidad en el sentido de la significación estadística
PAA	Ácido Fosfonoacético

PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (del inglés <i>polyacrilamide gel electrophoresis</i>)
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés <i>Phosphate-buffered saline</i>)
PC	Paricalcitol
PCA	Ácidos Fosfonocarboxílicos
PCP	Vía de la polaridad celular planar
PCR	Proteína C-reactiva
PDE	Posfodiesterasa
PFA	Ácido fosfonofórmico
PFA	Ácido Fosfonofórmico
Pi	Fosfato inorgánico
PIP2	Fosfatidil inositol 4,5-bifosfato
Pit-1	Cotransportador de Fósforo Dependiente de Sodio Tipo III
PKC	Proteína kinasa C (del inglés <i>protein kinase C</i>)
PKG	Proteína kinasa G (del inglés <i>protein kinase G</i>)
PLC	Fosfolipasa C
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PO	Fosfato alto (elevada concentración)
PTH	Hormona Paratiroidea
RCF	Número de veces la fuerza de la gravedad

RT	Retrotranscriptasa, retrotranscripción
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (del inglés <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
Runx2	Runt-related transcription factor 2, Cbfa1
RXR	Receptor X del ácido retinoico
SDS	Sulfato dodecil sódico
SEM	Error estándar de la media
sFRP	del inglés <i>Secreted Frizzled related protein</i>
SM22α	Transgelina, WS3-10
SM-MHC	Miosina de Cadena Pesada de Músculo Liso
SMα-actina	α - actina de Músculo Liso.
SOD	Superóxido dismutasa
SRF	Factor de Respuesta a Suero (del inglés <i>Serum Response Factor</i>)
TACE	Enzima convertidora de TNF α (del inglés <i>tnf-alpha-converting enzyme</i>)
TAE	Tris acetato EDTA
TCR	Receptor específico de linfocito T (del inglés <i>T cell receptor</i>)
TFIIB	Factor de transcripción IIB (del inglés <i>Transcription factor IIB</i>)
TGF-β	Factor de Crecimiento Tumoral β (del inglés <i>Transforming growth factor beta</i>)
TLR	del inglés <i>Toll Like Receptor</i>
Tm	Temperatura de fusión o melting

TNAP	Fosfatasa alcalina no específica de tejidos
TNFα	Factor de Necrosis Tumoral α
TTBS	del inglés <i>Tween 20-Tris Buffered Saline</i>
UTR	Región no codificante (del inglés <i>untranslated region</i>)
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular 1 (del inglés <i>vascular cell adhesion molecule 1</i>)
VCAN	Versican
VDR	Receptor de Vitamina D
VDRE	Elemento de respuesta de vitamina D
WB	Western Blot
α-SMA	Alfa actina de músculo liso

RESUMEN

La primera causa de muerte en pacientes con Enfermedad Renal Crónica (ERC) es la enfermedad cardiovascular (ECV), siendo su índice al menos 20 veces más alto en pacientes en diálisis que en la población general. Los pacientes con ERC sufren hiperfosfatemia y otras alteraciones del metabolismo mineral que les conducen al desarrollo de Hiperparatiroidismo Secundario (HPT2º) y de calcificaciones vasculares (CV); estas últimas contribuyen a la alta tasa de morbilidad y mortalidad cardiovascular observada en estos pacientes. La CV es un proceso activo que implica la transformación osteogénica de las células de músculo liso vascular (CMLV), aunque los mecanismos celulares y moleculares por los que ocurren no están completamente definidos. Se ha descrito que niveles elevados de fosfato (PO) inducen la calcificación y la diferenciación de las CMLV.

El calcitriol (CTR), molécula empleada en el tratamiento del HPT2º en las últimas décadas, induce hipercalcemia y un aumento del producto calcio x fósforo, favoreciendo el desarrollo de CV. Actualmente, se vienen usando análogos de la vitamina D menos calcémicos como el paricalcitol (PC), que ha resultado ser efectivo en el tratamiento del HPT2º sin inducir CV. No obstante, los mecanismos moleculares que median el efecto diferencial del calcitriol y del paricalcitol sobre las CV no están del todo claros. Uno de los objetivos de este estudio es determinar si los tratamientos con calcitriol o con paricalcitol modularán de manera desigual la calcificación, la transformación osteogénica y las vías de señalización intracelular relacionadas con la CV de las CMLV inducidas por niveles elevados de fosfato.

Por otro lado, dos de los principales factores asociados al progreso y a la severidad de la ERC son la inflamación crónica y el estrés oxidativo (EO), los cuales se han relacionado también de manera causal con las CV. Sin embargo, no está claro en qué medida el fosfato ejerce un efecto directo y específico como agente pro-inflamatorio y pro-oxidante sobre las CMLV. Por lo tanto, otro objetivo del presente estudio es determinar si el fosfato elevado actúa directamente sobre las CMLV como un elemento generador de especies reactivas de oxígeno (EROs) e inductor de la respuesta proinflamatoria, además de esclarecer qué efecto ejercerían el CTR y el PC sobre la posible inducción de EO e inflamación por niveles elevados de fosfato.

Para abordar este trabajo de investigación se llevaron a cabo cultivos in vitro de CMLV durante 9 días con los siguientes grupos experimentales: Control, PO (3,3 mM fosfato), PO+CTR (10^{-8} M) y PO+PC (3×10^{-8} M) y se evaluó la **diferenciación osteogénica** mediante expresión génica y la **calcificación**. Asimismo, en relación con los mecanismos intracelulares implicados, se realizaron cultivos de 24 horas para valorar la influencia de estos grupos sobre la activación de la **ruta canónica Wnt/ β -Catenina** por western blot, microscopía confocal y expresión de genes diana de la ruta. Para evaluar el efecto de inhibir la **ruta Wnt/ β -Catenina** sobre la calcificación y la actividad de la ruta, se llevaron a cabo tratamientos de 24 horas con el inhibidor Dkk-1. Los grupos estudiados fueron: Control, PO, PO+CTR, PO+PC, PO+Dkk-1, PO+CTR+Dkk-1 y PO+PC+Dkk-1. La actividad de la ruta se midió por microscopía confocal y mediante la expresión de genes diana de la ruta.

Además, se incubaron CMLV durante 24 horas con los grupos Control, PO, PO+CTR y PO+PC para evaluar la **generación de EROs** y la activación de la **vía de señalización canónica de NFκβ** mediante western blot y microscopía confocal. Asimismo, cultivos de 9 días fueron realizados para determinar expresión génica de **marcadores inflamatorios**, niveles de **ICAM-1** por citometría de flujo y niveles de **citoquinas secretadas** al medio de cultivo por ensayo Bio-Plex. Concentraciones más bajas de CTR (10^{-10} M y 10^{-12} M) fueron utilizadas para valorar su efecto sobre el estrés oxidativo y la inflamación; los grupos experimentales fueron: Control, PO, PO+CTR⁻⁸, PO+CTR⁻¹⁰ y PO+CTR⁻¹². Tras 24 horas de cultivo se evaluaron la **generación de EROs** y la activación de la **vía de señalización canónica de NFκβ** por western blot.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis demuestran que el desarrollo de calcificación y la diferenciación de CMLV a células de estirpe osteogénica que ocurre con niveles elevados de fosfato son mediados por la activación de la ruta canónica Wnt/β-Catenina. La adición de CTR (10^{-8} M) en condiciones de fosfato elevado produce una sobreactivación de la ruta Wnt/β-Catenina, resultando en mayor calcificación y mayor diferenciación osteogénica. Sin embargo, el paricalcitol inhibe la activación de la ruta canónica Wnt/β-Catenina, reduciendo la calcificación y la diferenciación osteogénica.

Por otro lado, niveles elevados de fosfato producen un incremento en la producción de EROs, la activación de la ruta canónica de NFκβ y un aumento en la expresión de ICAM-1 y de citoquinas inflamatorias (IL-1β, IL-6, IL-8 y TNF-alfa) en CMLV. La adición de calcitriol (10^{-8} M) a CMLV incubadas con fosfato

elevado incrementa la producción de EROs, la activación de NFκβ y la expresión de los marcadores inflamatorios ICAM-1, IL-6 y TNFα. Por el contrario, el tratamiento con dosis más bajas de CTR (10^{-10} y 10^{-12} M) resulta en una reducción del estado inflamatorio y del estrés oxidativo. De igual forma el PC inhibe el estrés oxidativo, la activación de la vía NFκβ y la expresión de marcadores inflamatorios en CMLV cultivadas con niveles elevados de fosfato.

En base a todo lo expuesto anteriormente, los resultados de este estudio describen nuevos mecanismos por los que el fosfato elevado favorece la disfunción vascular. Además, dada la efectividad de los análogos de la vitamina D inhibiendo la calcificación, el estado inflamatorio y el estrés oxidativo inducidos por el fosfato, éstos podrían proporcionar beneficios clínicos adicionales previniendo las complicaciones cardiovasculares en los pacientes con ERC.

SUMMARY

Cardiovascular disease (CVD) is the main cause of death in patients with chronic kidney disease (CKD), with a frequency 20 times higher than the observed in the general population. CKD patients exhibit hyperphosphatemia and other disorders of mineral metabolism that lead to the development of Secondary Hyperparathyroidism (HPT^{2°}) and vascular calcification (VC). Both of them contribute to the high rate of cardiovascular morbidity and mortality observed in uremic patients. VC is an active process involving osteogenic transformation of vascular smooth muscle cells (VSMC), although the underlying cellular and molecular mechanisms are not fully elucidated. It has been described that elevated levels of phosphate (PO) induce calcification and differentiation of VSMCs.

Calcitriol (CTR), molecule which has been used for the treatment of HPT^{2°} during the last decades, has an effect producing hypercalcemia and increasing the calcium x phosphorus product, as well as promoting the development of VC. Currently, less calcemic vitamin D analogues are being used. For instance, paricalcitol (PC) has been proved to be effective in controlling HPT^{2°} without inducing VC. Nevertheless, the molecular mechanisms mediating the differential effect of CTR and PC are not entirely clear. One objective of this study is to determine whether treatment with CTR or PC will modulate differently calcification, osteogenic transformation and intracellular signaling pathways associated with high phosphate-induced VC.

Furthermore, two of the main factors associated with the progression and severity of CKD are chronic inflammation and oxidative stress (OS), which have also been related to VC. However, it is unclear to what extent phosphate has a

direct and specific effect as pro-inflammatory and pro-oxidant agent on VSMC. Therefore, another objective of this study is to determine whether elevated phosphate acts directly on VSMC as an inducer of reactive oxygen species (ROS) and of a pro-inflammatory response, as well as to clarify the effects that CTR and PC exert on the possible induction of OS and inflammation by high phosphorus levels.

In order to address these aims, VSMC were cultured for 9 days and experimental groups were as follows: Control, PO (3.3 mM), PO+CTR (10^{-8} M) and PO+PC (3×10^{-8} M). Calcification and osteogenic differentiation (in terms of gene expression) were assessed. In addition, cells were treated for 24 hours to evaluate the effect of these treatments on the activation of the canonical Wnt/ β -Catenin pathway by western blot, confocal microscopy and expression of target genes. Furthermore, cells were treated for 24 hours with the inhibitor Dkk-1 to evaluate the effect of inhibiting the Wnt/ β -Catenin pathway on calcification and pathway activity. The groups were: Control, PO, PO+CTR, PO+PC, PO+Dkk-1, PO+CTR+Dkk-1, and PO+PC+Dkk-1. The pathway activity was tested by confocal microscopy and the expression of target genes.

On the other hand, VSMC were incubated for 24 hours (groups Control, PO, PO+CTR, and PO+PC) to evaluate the ROS generation as well as the activation of the canonical NF κ B pathway by western blot and confocal microscopy. Likewise, 9-day cultures were performed to determine the expression of inflammatory markers, the levels of ICAM-1 by flow cytometry and the cytokines secreted into the culture medium by Bio-Plex assay. Lower concentrations of CTR (10^{-10} M and 10^{-12} M) were also used to assess its effect on

OS and inflammation. The experimental groups were: Control, PO, PO+CTR⁻⁸, PO+CTR⁻¹⁰, and PO+CTR⁻¹². ROS generation and the activity of the canonical NFκβ pathway were evaluated by western blot after 24 hours of culture.

The results obtained in this study show that the development of calcification and the osteogenic differentiation of VSMCs induced by high levels of phosphate are mediated by activation of the canonical Wnt/β-Catenin pathway. The addition of CTR (10⁻⁸ M) with high phosphate induces an overactivation of the Wnt/β-Catenin pathway, resulting in increased calcification and osteogenic differentiation. However, paricalcitol inhibits activation of the canonical Wnt/β-Catenin pathway, therefore reducing both the calcification and osteogenic differentiation processes.

Furthermore, high phosphate levels cause an elevation in ROS production, activation of the canonical NFκβ pathway and increased expression of ICAM-1 and inflammatory cytokines (IL-1β, IL-6, IL 8 and TNF-alpha) in VSMC. The addition of CTR (10⁻⁸ M) to VSMC incubated with high phosphate increases ROS production, NFκβ activation and the expression of inflammatory markers ICAM-1, IL-6 and TNF alpha. By contrast, treatment with low doses of calcitriol (10⁻¹⁰ and 10⁻¹² M) results in reduced inflammation and OS. Similarly, PC inhibits OS, activation of the NFκβ pathway and the expression of inflammatory markers in VSMCs cultured with high levels of phosphate.

On the basis of these results, this study describes novel mechanisms whereby elevated phosphate promotes vascular dysfunction. In addition, given the effectiveness of vitamin D analogues to inhibit the calcification, the inflammatory status and the OS induced by high phosphate, they might provide additional clinical benefits by preventing cardiovascular complications in CKD patients.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

La enfermedad renal crónica (ERC) conlleva una pérdida progresiva e irreversible de las funciones renales, cuyo grado de afección se determina a través del filtrado glomerular (FG), siendo $<60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ indicativo del daño renal. A consecuencia de ello los riñones pierden su capacidad para eliminar desechos, concentrar la orina y conservar los electrolitos en la sangre. Las causas más comunes de ERC son la nefropatía diabética, la hipertensión arterial, y la glomerulonefritis. Juntas causan aproximadamente el 75% de todos los casos de ERC en adultos.

El pronóstico de pacientes con ERC es pobre y empeora a medida que la función renal disminuye. Los pacientes con ERC sufren de aterosclerosis acelerada y tienen una incidencia más alta de enfermedades cardiovasculares. La principal causa de muerte en pacientes con ERC es la enfermedad cardiovascular (ECV) (1,2).

En el año 2002, la Fundación Nacional del Riñón de Estados Unidos (National Kidney Foundation) propuso, a través de las guías de práctica clínica K/DOQI, una definición y una clasificación de la ERC con el objetivo de aunar criterios y facilitar de forma sencilla y práctica el diagnóstico precoz de la enfermedad independientemente de la causa original.

Las Guías K/DOQI proponen la siguiente definición de ERC:

1. Daño renal durante al menos tres meses, definido como alteraciones renales funcionales o estructurales, con o sin descenso del FG, manifestado por: la

presencia de marcadores de daño renal, que incluyen alteraciones en la composición de la sangre u la orina y/o alteraciones detectadas por estudios de imagen.

2. Disminución de la función renal, expresada mediante FG o por un aclaramiento de creatinina inferior a 60 ml/min/1,73 m² durante al menos tres meses, con o sin daño renal aparente. En los últimos años se ha puesto de manifiesto que las alteraciones del metabolismo mineral asociadas a la ERC tienen efecto adverso incrementando la morbimortalidad por causas cardiovasculares. Por ello, el enfoque actual del enfermo urémico debe abordarse en conjunto con las alteraciones del hueso, del metabolismo mineral y de la enfermedad cardiovascular asociada. Existe una conexión estrecha entre todas estas alteraciones. La Fundación KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) ha propuesto nuevas definiciones:

- Osteodistrofia renal (ODR). Este término queda restringido a las alteraciones de morfología y arquitectura óseas propias de la ERC. El diagnóstico exacto sólo se consigue mediante análisis histomorfométrico, es decir mediante biopsia ósea.

- Trastorno mineral y óseo asociado a la ERC. Hace referencia a todas las alteraciones bioquímicas, esqueléticas y calcificaciones extraesqueléticas que ocurren como consecuencia de la ERC. Esta entidad clínica se denomina "chronic kidney disease-mineral and bone disorder" (CKD-MBD). Se manifiesta por una o la combinación de las siguientes manifestaciones:

- 1) Anormalidades en la regulación del calcio (Ca), fósforo (P), hormona paratiroidea (PTH) y vitamina D.
- 2) Alteraciones en el remodelado, mineralización, volumen, crecimiento o fragilidad del esqueleto.
- 3) Calcificaciones vasculares o de otros tejidos blandos.

1.1. ALTERACIONES DEL METABOLISMO MINERAL EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

Los riñones, junto con otros órganos como son las glándulas paratiroides, el intestino y el hueso, juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del Ca y del P. Durante la progresión de la ERC se producen alteraciones en el metabolismo mineral que finalmente darán lugar a la aparición de calcificaciones extraesqueléticas, dando como resultado complicaciones cardiovasculares y un aumento de la mortalidad (3, 4).

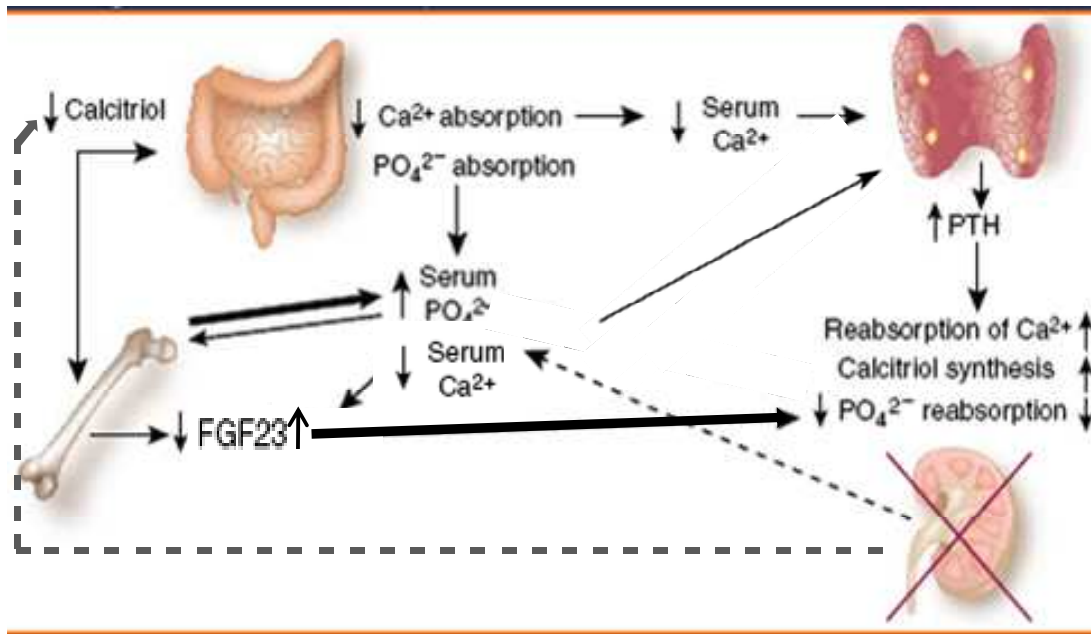


Figura 1. Alteraciones del metabolismo mineral en la ERC.

Dichas alteraciones comienzan con un descenso en los niveles de calcitriol (CTR) y con un aumento de P sérico debido a su retención renal. Además, el déficit de CTR provoca a su vez un descenso de Ca sérico. Todo ello produce un aumento en la secreción de la hormona paratiroidea o paratohormona (PTH).

La PTH es una hormona con acción fosfatúrica que tiene como objetivo, entre otros, regular los niveles de Ca en sangre. Para ello, la PTH estimula la liberación de Ca y de P procedente de la matriz ósea, la reabsorción de Ca por el riñón y la producción renal de CTR, el cual aumenta la absorción de Ca y P a través del intestino.

Por otro lado, la producción del factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23, del inglés *Fibroblast growth factor 23*) en el hueso es estimulada por CTR (5) y por el contenido de P en la dieta (6, 7). FGF23 es una hormona fosfatúrica que requiere de la proteína klotho para su activación y actúa sobre el riñón como órgano diana inhibiendo la actividad 1- α -hidroxilasa en el túbulo proximal, reduciendo indirectamente la absorción intestinal de P y Ca, e inhibiendo la reabsorción de P en el riñón. Todo esto con el fin de mantener la fosfatemia dentro de la normalidad.

1.1.1. Homeostasis del fósforo en la enfermedad renal crónica.

El P, mayoritariamente en la forma de fosfato inorgánico (Pi), es un factor importante en la homeostasis celular y sistémica. Asimismo, es uno de los principales componentes del hueso, los fosfolípidos y los ácidos nucleicos, así como necesario para la generación de ATP, la señalización intracelular y el mantenimiento del pH.

Cuando los niveles séricos de fosfato exceden los 2 mmol/L (valores normales entre 1 y 1,5 mmol/L) se produce la hiperfosfatemia. Por otro lado, la hiperfosfatemia y el consiguiente aumento del producto calcio x fósforo (Ca x P) en pacientes con insuficiencia renal están estrechamente relacionados con la calcificación de arterias coronarias, arterias periféricas y válvulas cardíacas (8) (9), y están significativamente ligados a la mortalidad en pacientes en hemodiálisis (10). Además, la hiperfosfatemia es el principal factor de riesgo para la mortalidad cardiovascular en pacientes con ERC (11, 12).

En humanos, la mayoría del P (85%) se encuentra en el hueso, el 14% es intracelular y el 1% está en el fluido extracelular. La mayoría del P ingerido es absorbido por el tracto gastrointestinal, por transporte pasivo a través de los enterocitos o mediante un cotransportador de P dependiente de sodio (NaPi-2b) (13). Bajo condiciones normales, el 80-90% del P filtrado es reabsorbido en el túbulo proximal renal, principalmente a través de NaPi-2a (14). Aunque el riñón es el principal regulador de la homeostasis del P bajo condiciones normales, el hueso también sirve como un reservorio de P que puede contribuir a la regulación de P sérico mediante procesos de formación y resorción ósea (15).

La regulación de los niveles de P depende fundamentalmente de la PTH, la fosfatona FGF23, cuya función está íntimamente ligada a la proteína transmembrana Klotho, y del CTR. Estas moléculas actúan principalmente modulando la reabsorción renal y/o la absorción intestinal de P (15). PTH y FGF23, promueven la eliminación de P renal estimulando la internalización e inactivación del cotransportador NaPi-2a, y, de esta manera, disminuye la reabsorción renal de P (16). La PTH también estimula la liberación de Ca y P de los huesos a través del proceso de resorción. La proteína Klotho es un cofactor para FGF23, pero también promueve la fosfaturia independientemente de la inactivación de NaPi-2a (17). El CTR promueve la absorción intestinal de P por incremento de NaPi-2b. Todos estos sistemas actúan para mantener los niveles de P sérico en un estrecho rango, normalmente entre 2,8 y 4,5 mg/dl (18). Uno de los primeros síntomas en la insuficiencia renal es el aumento sérico del P debido a la disminución de la función renal.

La insuficiencia renal conduce a la alteración de la excreción de P y a la disminución en los niveles de klotho (19), aunque los niveles de P séricos se mantienen inicialmente en el rango normal por una regulación al alza de FGF23 y PTH (20). Desafortunadamente, este mecanismo compensador se ve desbordado a medida que la función renal va declinando. Así, a medida que avanza la ERC, el filtrado glomerular disminuye y con ello se reduce la excreción de P. Además, el aumento en el remodelado óseo provocado por un exceso de PTH y la continua ingestión de P resulta en una marcada hiperfosfatemia.

1.1.2. Homeostasis del calcio en la enfermedad renal crónica.

El Ca en su forma ionizada además de ser un importante componente del hueso, es crucial para numerosos procesos fisiológicos, como señalización neuronal, contracción muscular o coagulación sanguínea. En humanos, el 99% del Ca se encuentra en el hueso y el 1% restante en sangre y en células. El 50 % del Ca en suero se encuentra unido a proteínas, por tanto la otra mitad del Ca está en forma ionizada. El Ca es absorbido en el intestino delgado, tanto por difusión paracelular como por mecanismos de transporte activo, y el 98% del Ca filtrado es reabsorbido por el riñón (21). Aproximadamente 500 mmoles de Ca intervienen en procesos de formación y resorción ósea al día.

Los factores que controlan los niveles de Ca séricos son CTR, PTH, Klotho y calcitonina (21). El CTR favorece la absorción intestinal de Ca, reduce la excreción urinaria de Ca e incrementa la resorción ósea incrementando los niveles séricos de Ca. La PTH, incrementa los niveles de Ca séricos de forma indirecta al estimular la actividad de 1α -hidroxilasa en el riñón, incrementando así la

producción de CTR y de forma directa inhibiendo la excreción urinaria de Ca y promoviendo la resorción ósea. Finalmente, Klotho también mantiene los niveles séricos de Ca estimulando la reabsorción de Ca en las células renales (22). En contraste, la calcitonina es una hormona hipocalcemiante que estimula la excreción urinaria de Ca e inhibe la reabsorción ósea. Estos complejos mecanismos sirven para mantener los niveles de Ca extracelular en un rango muy estrecho, de 9 a 10,5 mg/dl y el Ca iónico en 1,25 mM.

En los enfermos renales, la hiperfosfatemia inhibe la actividad de la enzima 25-dihidroxitamina D3-1 α -hidroxilasa en el riñón, disminuyendo la producción de 1,25(OH)2D3 (CTR) a partir de 25(OH)D3 (calcidiol) (23). Por otra parte, el aumento de P plasmático determina un incremento de los niveles de FGF23, que es un inhibidor directo de la actividad 1 α -hidroxilasa, contribuyendo al déficit de CTR. Los bajos niveles de CTR conducen a una situación de hipocalcemia (nivel sérico de Ca total menor de 8,5 mg/dL o 2,1 mmol/L en seres humanos). La hipocalcemia junto con la hiperfosfatemia estimula la secreción de PTH originando el desarrollo del hiperparatiroidismo renal secundario.

1.1.3. Hiperparatiroidismo Secundario

El hiperparatiroidismo secundario (HPT 2º) es una complicación común de la ERC que se produce como consecuencia de los desajustes en el metabolismo mineral con alteraciones en los valores de PTH, P, Ca y CTR (24, 25).

La PTH participa en la regulación de la homeostasis mineral mediante los siguientes mecanismos:

1. Disminuye la reabsorción de P en los túbulos renales.
2. Incrementa la reabsorción de Ca en los túbulos renales.
3. Libera Ca y P de los huesos.
4. Estimula la síntesis de CTR aumentando indirectamente la absorción de Ca y de P a través del intestino (24).

En la ERC este balance se encuentra alterado, los niveles en suero de CTR y Ca disminuyen y los de P aumentan. La hiperfosfatemia estimula directamente la secreción de PTH (26) y la proliferación celular paratiroidea (27). Asimismo, el descenso de Ca extracelular induce un aumento en la secreción de PTH con la finalidad de restablecer los niveles normales de Ca (28). Además, el aumento de PTH estimula la secreción de FGF23 (29, 30).

En enfermos renales con HPT^{2º} es bastante frecuente la generación de un hiperparatiroidismo terciario. En éste, las glándulas paratiroideas crecen de manera incontrolada originando una hiperplasia nodular paratiroidea. Los nódulos no responden a sus reguladores Ca, P y CTR; y el incremento de PTH estimula la absorción intestinal de Ca y de P, produciendo hipercalcemia (31).

1.1.4. Klotho y FGF23

FGF23 y Klotho son proteínas clave para el control de la homeostasis del P y del Ca. FGF23 es una “fosfatonina” secretada por osteocitos y osteoblastos maduros. Tanto CTR (32) como la sobrecarga de P (31) se asocian con altos niveles séricos de FGF23.

El principal órgano diana de FGF23 es el riñón, donde disminuye la síntesis renal de CTR (5). Este descenso en la síntesis de CTR resulta a la larga en un descenso de la calcemia que conlleva a un mayor incremento en la secreción de PTH. En condiciones de alto P, el FGF23 inhibe la reabsorción de P en el túbulo renal, convirtiéndose así en la principal hormona “fosfatúrica”. La finalidad de estos mecanismos es mantener la fosfatemia dentro de los niveles fisiológicos normales (33). Otro órgano diana de FGF23 son las glándulas paratiroides. FGF23 regula directamente la producción de PTH inhibiéndola a través del receptor de FGF23 (FGFR) y del correceptor Klotho (34).

En cuanto a Klotho, dicha proteína se expresa principalmente en el riñón, pero también en la glándula paratiroides y en el epitelio del plexo coroideo (sistema nervioso central) (35). Klotho puede presentarse como una isoforma asociada a la membrana o bien en forma soluble, y se requiere para posibilitar la unión de FGF23 con su receptor (FGFR) fundamentalmente en el túbulo distal, aunque su efecto biológico se desarrolla fundamentalmente en el túbulo proximal (36).

Los niveles plasmáticos de FGF23 aumentan progresivamente conforme la función renal disminuye, alcanzando niveles notablemente más elevados que los observados en la población normal (37). El aumento de FGF23 constituye un mecanismo regulador frente a la retención de P, contribuyendo a mantener los niveles de P en un rango normal. Asimismo, la deficiencia en Klotho observada en la ERC, que confiere resistencia renal al FGF23, también podría contribuir a los niveles elevados de FGF23 (38).

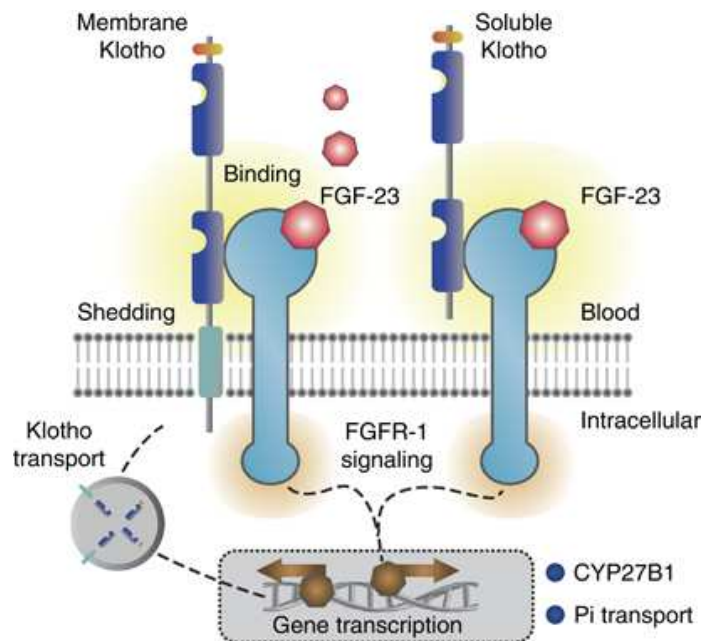


Figura 2. Complejo proteico heterotrimérico de Klotho, FGF23 y FGFR1 (39).

Ha sido observado que ratones deficientes en klotho o FGF23 desarrollan importantes calcificaciones vasculares (CV) y de tejidos blandos (pulmones, vejiga, testículos, piel, músculo esquelético y cardíaco). La desregulación de

FGF23 y klotho en estos roedores provoca un aumento en los niveles séricos de P, Ca y CTR, alterando el metabolismo mineral y favoreciendo el desarrollo de CV (40).

2. LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR EN LA ENFERMEDAD RENAL CRONICA

La ECV sigue siendo la principal causa de muerte en el mundo y es la responsable de más del 50% de la mortalidad en pacientes con ERC. De hecho, el riesgo de mortalidad en pacientes con enfermedad renal terminal es 20 ó 30 veces mayor que en la población general (41).

Aunque la enfermedad renal suele considerarse como factor de riesgo independiente de la ECV, existe una relación patente entre ambas enfermedades que crece a medida que progresa el deterioro de la función renal (42).

La ECV puede ser debida a distintos factores como la presencia de patógenos periodontales, el estrés oxidativo, la dislipemia, la diabetes, la hipertensión, el envejecimiento, factores inflamatorios o el estado urémico en enfermos renales, el cual lleva asociado algunos de los factores enumerados anteriormente. En relación a la ECV y la ERC se han publicado numerosos estudios en los que se establece una asociación entre el aumento de FGF23 y el riesgo de mortalidad por eventos cardiovasculares (43).

Una de las principales complicaciones cardiovasculares que ocurren en los últimos estadios de la ERC es la formación de CV. Se trata de una patología

multifactorial caracterizada por la deposición de fosfato cálcico en forma de hidroxiapatita en tejidos cardiovasculares, como vasos sanguíneos, el miocardio y en las válvulas cardíacas (44). La hiperfosfatemia y el elevado producto $Ca \times P$ en pacientes con insuficiencia renal están estrechamente relacionados con la calcificación de arterias coronarias, arterias periféricas y válvulas cardíacas (8-10), y están significativamente ligados a la mortalidad en pacientes en hemodiálisis (10).

En pacientes urémicos las CV se caracterizan por ser más prevalentes y extensas, progresar más rápidamente y aparecer a edades más tempranas que en la población general. Asimismo, las calcificaciones de las arterias coronarias tanto en la población general como en pacientes urémicos están fuertemente correlacionadas con la presencia de placa aterosclerótica (45, 46), la inestabilidad de dicha placa (47, 48) y con el incremento de riesgo de infarto de miocardio (49, 50). En los pacientes con ERC y hemodiálisis, el grado de calcificación arterial es un factor predictor de enfermedades cardiovasculares y mortalidad (51-53).

Durante muchos años se pensó que las CV se debían a un proceso pasivo y a una enfermedad degenerativa sin opción de tratamiento (54). En las dos últimas décadas se ha demostrado que se trata de un proceso activo fuertemente regulado y que presenta una gran similitud al proceso fisiológico de la mineralización ósea (55-57). Además, se sabe que durante el desarrollo de las CV las células de músculo liso vascular (CMLV) sufren una transformación fenotípica hacia células de estirpe osteogénica (58, 59). En este sentido, existen importantes semejanzas entre el proceso de formación de las CV y la osteogénesis, ya que los mecanismos

de osificación que ocurren en las CV son similares a los de la formación de hueso (61, 62). En cualquier caso, los mecanismos que conducen a la CV aún no están completamente definidos.

2.1. ESTRUCTURA DE LOS VASOS SANGUÍNEOS.

Los vasos sanguíneos se clasifican en arterias, venas y capilares. Las arterias y las venas poseen una estructura ordenada, compuesta por tres capas concéntricas llamadas túnica íntima, túnica media y túnica adventicia. La túnica íntima es la más interna de las capas, y se compone de una capa de células epiteliales especializadas que constituye el endotelio. Debajo de la íntima está la capa subendotelial, una fina capa de tejido conectivo que no está presente en los vasos de menor calibre. Entre ambas capas se dispone la lámina basal. Los capilares sólo presentan una túnica íntima formada por células endoteliales apoyadas en su lámina basal. La túnica media está más desarrollada en las arterias que en las venas y se compone de capas concéntricas de células musculares lisas entre las cuales se interponen cantidades variables de elastina, fibras reticulares y proteoglicanos. Entre la túnica íntima y la media de las arterias está la lámina elástica interna, una capa formada por fibras de elastina. Dicha capa confiere elasticidad al vaso para extenderse y contraerse. La lámina elástica interna está menos desarrollada en venas.

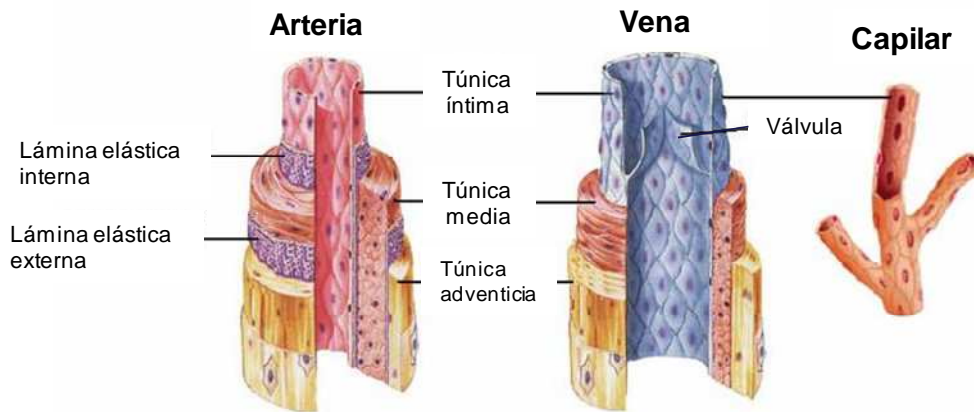


Figura 3. Ilustración de la estructura de los vasos sanguíneos. Las arterias presentan una túnica media bastante más desarrollada que las venas, mientras que en las venas la túnica adventicia es, frecuentemente, la capa más gruesa del vaso. Los capilares sólo presentan una túnica íntima formada por células endoteliales que se apoyan en su lámina basal.

La capa más externa es la túnica adventicia, la cual está compuesta por un tejido conectivo laxo constituido por fibroblastos, fibras elásticas y fibras colágenas dispuestas paralelamente al eje longitudinal del vaso sanguíneo. Es la capa más prominente de las venas y está irrigada por vasos de pequeño calibre, los *vasa vasorum*. Entre la túnica media y la adventicia de las arterias se diferencia una capa limitante formada por elastina denominada lámina elástica externa.

2.2. LA CÉLULA DE MÚSCULO LISO VASCULAR.

El citoesqueleto de las células del músculo liso (CML) se compone de filamentos de actina y de filamentos intermedios de proteína fibrosa, además de un aparato contráctil constituido por filamentos finos de actina y gruesos de

miosina. La red de filamentos de actina e intermedios está implicada en la preservación de la morfología de las CML (63). El citoesqueleto está organizado como una estructura geométrica que asegura que la tensión contráctil se distribuya uniformemente y el mantenimiento de la morfología y el fenotipo de las CML (64).

Las CMLV forman parte de los vasos sanguíneos adultos y constituyen uno de los subtipos de las CML. Otros subtipos son las CML cardíaco y las CML viscerales.

Las CMLV tienen una tasa de proliferación extremadamente baja y expresan un repertorio de proteínas contráctiles, canales iónicos, y moléculas de señalización, claramente enfocados a su contractilidad (65). Estas células tienen la capacidad de contraerse o relajarse para alterar el diámetro de la luz de los vasos sanguíneos con el fin de regular la tensión arterial (66). Además de su función contráctil, también interviene en procesos de reparación y su alteración juega un papel muy importante en el desarrollo de la enfermedad vascular.

2.2.1. Plasticidad fenotípica.

Las CMLV, a diferencia de las células de músculo estriado o de las del músculo cardíaco, retienen la capacidad de modular su fenotipo tras el desarrollo post-natal (67, 68). La plasticidad fenotípica de las CMLV maduras es una ventaja de supervivencia que poseen los organismos superiores como respuesta a cambios vasculares. Las CMLV poseen las propiedades de incrementar drásticamente las tasas de proliferación, migración y de aumentar la capacidad sintética (no

contráctil) en la reparación vascular y en la angiogénesis. Por otro lado, este cambio hacia el fenotipo sintético suele estar relacionado con el desarrollo y/o progresión de la enfermedad vascular. Existen evidencias que muestran que cambios fenotípicos de las CMLV desempeñan un papel muy importante en un gran número de enfermedades, como hipertensión, estenosis arterial, cáncer, aneurismas y diabetes (65)

Por tanto, las CMLV pueden tener fundamentalmente dos tipos de fenotipos, el contráctil y el sintético (66), aunque en respuesta a los distintos estímulos del entorno celular pueden adquirir también un fenotipo osteogénico (58). La morfología es un parámetro importante para la definición de los fenotipos de las CMLV. Las CMLV contráctiles son alargadas y fusiformes, mientras que las CMLV sintéticas son menos alargadas y poseen una morfología romboide. Además, por lo general las CMLV sintéticas exhiben mayores tasas de crecimiento y mayor actividad migratoria que las contráctiles (66). No obstante, para la diferenciación de fenotipos es más fiable el uso de marcadores específicos.

El fenotipo osteogénico comparte algunas características con el fenotipo sintético, como es la pérdida de marcadores de CMLV, por ejemplo transgelina (SM22 α), elastina, miosina de cadena pesada de músculo liso (MHC) y esmotelina. Ambos fenotipos (sintético y osteogénico) se diferencian en otros aspectos, pues el fenotipo osteogénico posee una baja proliferación celular, una mayor liberación de vesículas de matriz y mayores niveles de Cbfa1/Runx2 (58).

Los mecanismos por los cuales las CMLV adquieren un fenotipo particular son objeto prioritario de investigación en la actualidad.

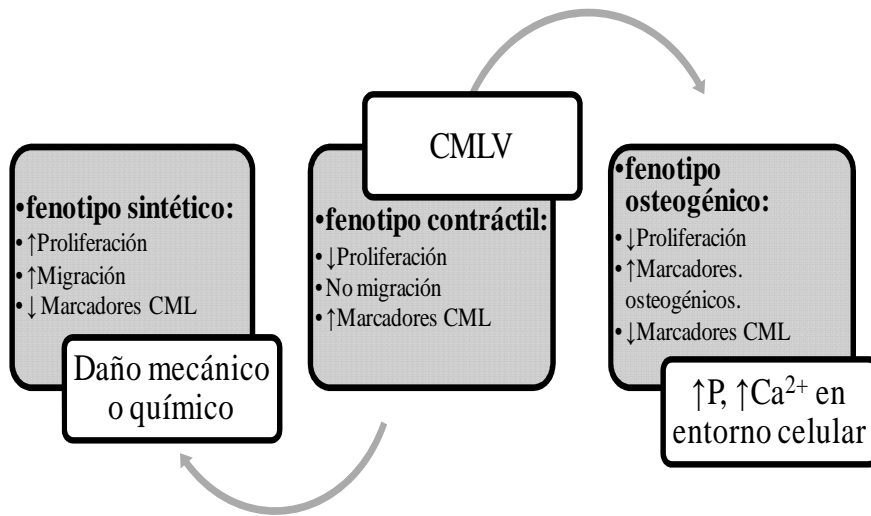


Figura 4. Plasticidad fenotípica de la CMLV. Principales diferencias entre los fenotipos contráctil, sintético y osteogénico.

2.2.2. Proteínas miogénicas.

La α -actina de músculo liso, la calponina y la SM22 α se encuentran entre los marcadores del fenotipo contráctil más relevantes, aunque también son considerados marcadores importantes la miosina de cadena pesada de músculo liso y la esmotelina. Algunas de estas proteínas están involucradas en la contracción de las CMLV, y la desaparición de proteínas asociadas al fenotipo contráctil se interpreta como un síntoma de diferenciación hacia otro fenotipo (66,69).

2.2.2.1 Alfa actina de músculo liso (α -SMA)

La α -SMA es una proteína contráctil de cadena única y cuyo peso molecular es de 42 kDa. Dicha proteína se dispone de manera helicoidal en dos filamentos alrededor de la tropomiosina, y juega un papel importante en la contractilidad de las CMLV (70, 71).

La α -SMA es el marcador más usado en la identificación de CMLV y el primero en aparecer durante la diferenciación de CML, al segundo día del desarrollo embrionario (69). Estudios realizados *in vitro* en CMLV bovinas, demuestran que la inducción de la calcificación mediante la exposición, durante 10 días, a concentraciones elevadas de β -glicerofosfato implica la disminución de la expresión de α -SMA (58). Wang y colaboradores observaron que en arterias radiales calcificadas de pacientes con ERC, especialmente en las zonas de calcificación, la expresión de α -SMA se encontraba significativamente disminuida a la misma vez que aumentada la expresión de los marcadores osteogénicos (72).

2.2.2.2 Calponina

La calponina tiene un peso molecular de 32 kDa y es una proteína clave para la funcionalidad de las CMLV. Es una proteína similar a la calmodulina que une los filamentos de actina con tropomiosina. Estudios *in vitro* acerca de la función de la calponina han revelado que esta proteína inhibe la actividad de la enzima Ca/Mg ATPasa, bloqueando el movimiento relativo de actina y miosina en ensayos de movilidad (73). Estos hallazgos indican que la calponina es un posible regulador de relajación de las CMLV.

Por otro lado, un trabajo publicado por Yoshikawa y colaboradores reveló que los roedores deficientes en calponina mostraban una aceleración de la formación ósea. En estos ratones la recuperación de las fracturas óseas fue más rápida que en los controles y también se encontró calcificación ectópica en los mutantes (74). Estos datos sugieren que la calponina podría regular negativamente la formación ósea.

2.2.2.3 SM22 α

SM22 α es una proteína con un peso molecular de 22 kDa que en CMLV contráctiles se asocia a los filamentos de actina que se agrupan en el citoesqueleto. Esta proteína es el segundo marcador que aparece durante la diferenciación de células progenitoras a CML, y ha sido detectada durante el desarrollo embrionario en músculo liso, esquelético y cardíaco, pero durante el desarrollo postnatal se expresa exclusivamente en CML viscerales y vasculares (64, 69). Otras denominaciones de esta proteína son transgelina ó WS3-10.

Esta proteína comparte secuencias de aminoácidos con otras específicas de CMLV, como la calponina. La expresión génica de SM22 α se regula negativamente cuando la CMLV asume un fenotipo diferente al contráctil o cuando los procesos de transformación celular implican una drástica reorganización del citoesqueleto (75, 76). SM22 α , así como calponina y α -actina, disminuye su expresión cuando las CMLV cambian del fenotipo contráctil al fenotipo osteogénico (59, 77).

En un estudio llevado a cabo por Zhang y colaboradores en ratones deficientes en SM22 α se observó que las CML eran histológicamente indistinguibles de CML de tejidos de roedores normales, a pesar de existir pequeños defectos en la organización de los filamentos de actina en los embriones de ratones deficientes en SM22 α (64). Estos datos parecen indicar que SM22 α no es imprescindible para el desarrollo normal y para las funciones homeostáticas basales de las CML.

Por otra parte, en un estudio donde se llevó a cabo la ablación génica de SM22 α en ratones hipercolesterolémicos deficientes en ApoE (Apolipoproteína E) se observó un incremento de la lesión aterosclerótica y un aumento en la proliferación de las CMLV (78). Estos resultados identifican un papel fundamental para SM22 α en la regulación del fenotipo de las CMLV.

2.3. TIPOS DE CALCIFICACION VASCULAR

La calcificación de los vasos sanguíneos puede presentarse en la túnica íntima, en la túnica media o pueden observarse ambas conjuntamente, como sucede en la mayoría de pacientes con ERC (79, 80).

Clásicamente, se han distinguido los tipos de calcificación arterial dependiendo de dónde se depositara el Ca. Así, la calcificación arterial se ha dividido en calcificación de la íntima (asociada a la placa de ateroma) (81) y en calcificación de la media (conocida como esclerosis de Mönckeberg), la cual está ligada a la rigidez vascular por mineralización de las fibras elásticas y la arteriosclerosis observada con la edad, diabetes y ERC (82). La primera estaría

relacionada con un aumento de la deposición de lípidos y con la infiltración de células inflamatorias, mientras que en la segunda tendría más influencia el cambio de fenotipo de las CMLV hacia células más parecidas a osteoblastos.

Sin embargo, algunos estudios sugieren que esta clasificación no sería tan clara y que ambas serían manifestaciones del proceso aterosclerótico, encontrado en los grandes vasos de pacientes con ERC (83).

2.3.1. Calcificación de la íntima.

La calcificación en la túnica íntima está relacionada con la aterosclerosis (81, 84) y, aunque generalmente las placas ateroscleróticas están constituidas principalmente por una masa central grasa (ateroma) y una capa fibrosa (85), en pacientes con ERC hay también abundante CV.

El inicio de la formación del ateroma coincide con la aparición de una lesión o disfunción endotelial, producida por factores como la hiperlipidemia, tabaquismo, hipertensión arterial, o envejecimiento. Tras esta lesión inicial sobreviene un proceso inflamatorio que produce la atracción, adhesión y migración de monocitos y linfocitos T a través del endotelio (86). A continuación, se forma la estría grasa debido al acúmulo de ésteres de colesterol que atraen a los macrófagos. Las CMLV de la túnica media migran hacia la íntima, engrosando la pared arterial. Después se forma una capa fibrosa (87) que puede romperse provocando la aparición de un trombo y un accidente cardiovascular agudo (88).

En el caso de pacientes con insuficiencia renal se forman pequeños agregados cristalinos de fosfato cálcico, los cuales se van uniendo dando lugar a

formaciones mayores y poco uniformes. En algunas ocasiones, cuando la calcificación es muy extensa, se ha llegado a observar la presencia de matriz ósea en las placas ateroscleróticas (89, 90).

2.3.2. Calcificación de la túnica media.

La calcificación de la túnica media está asociada con la pérdida de elasticidad y es llamada también **arterioesclerosis de Mönckeberg**, la cual tiene lugar sobretodo como consecuencia del envejecimiento, la diabetes y la ERC (82).

Fue descrita por primera vez en 1903 por J.G. Mönckeberg, quien la definió como un extenso acúmulo mineral en la túnica media de la pared de las arterias, y en ocasiones se extiende hasta la lámina elástica interna (91). Al contrario que la calcificación de la íntima, tiene lugar sin formación de placa de aterosclerosis (55).

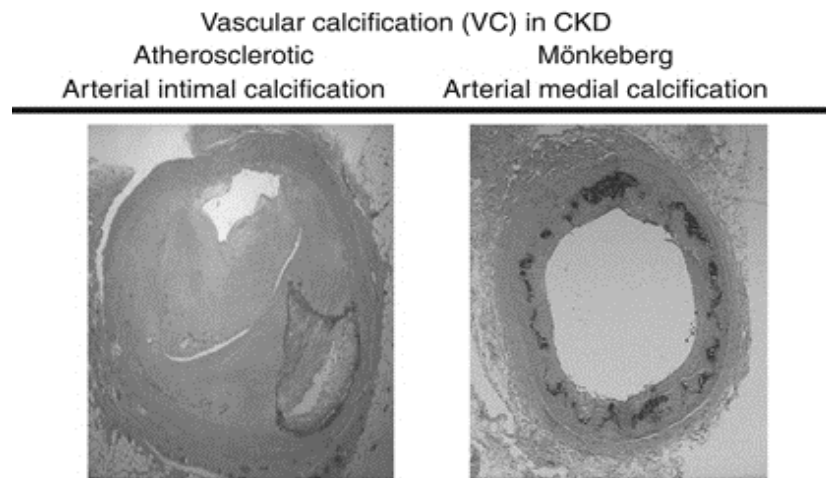


Figura 5. Calcificación vascular en la enfermedad renal crónica. Adaptado de Hruska K et al. (92)

Inicialmente, este tipo de calcificación presenta depósitos lineales de fosfato cálcico en la túnica media, próximos a la lámina elástica. Cuando la lesión avanza, los depósitos se disponen a lo largo de la media formando anillos e incluso matriz ósea si la calcificación es muy extensa (55).

Dentro de la CV de la media se incluye la denominada **arteriopatía urémica calcificante (CUA)** que afecta a arterias de pequeño calibre y que sufren entre el 1 y el 4% de los pacientes en diálisis. La CUA tiene una presentación proximal (abdomen, muslo o glúteos) o distal (debajo de la rodilla o del codo) y se caracteriza por la aparición de lesiones cutáneas dolorosas, nódulos subcutáneos, isquemia tisular, y necrosis de la piel y del tejido subcutáneo de las manos y los pies. La CUA empeora considerablemente el pronóstico de los pacientes (93, 94).

2.4. ELEMENTOS CELULARES Y MOLECULARES RESPONSABLES DE LAS CALCIFICACIONES VASCULARES.

En la actualidad, el proceso de calcificación es considerado, además de un proceso pasivo de deposición de sales (inducido por niveles elevados de Ca y P), un proceso activo, mediado por células, el cual está estrechamente regulado por diferentes mecanismos que no son excluyentes entre sí (95).

A continuación se enumeran diferentes factores que, en términos generales, conducen al proceso de calcificación y a la diferenciación osteogénica: factores externos inductores de la calcificación vascular, factores internos inductores de la diferenciación celular (transición fenotípica), pérdida de

inhibidores de calcificación, liberación de complejos de nucleación, muerte celular o apoptosis y degradación de la elastina.

2.4.1. Factores inductores de las Calcificaciones Vasculares

La mineralización es un proceso complejo conducido por factores inductores de la calcificación tanto en huesos como en la calcificación ectópica. A su vez, existen proteínas o factores de transcripción que actúan como inhibidores de este proceso de mineralización. Por tanto, cuando el equilibrio entre promotores e inhibidores se deshace a favor de los primeros, tiene lugar la mineralización de los tejidos (56). A continuación se describen los factores inductores más importantes que intervienen en el desarrollo de las CV.

2.4.1.1. Calcio y fósforo

En estudios llevados a cabo *in vitro* en CMLV, un aumento de los niveles de Ca hasta niveles de hipercalcemia (>2.6mM) produjo un aumento en la mineralización y una transición fenotípica (60). El efecto del Ca sobre el proceso de mineralización fue mediado por el cotransportador de Pi dependiente de Na, Pit-1. Si bien de forma aguda los niveles elevados de Ca no aumentaron la entrada de P, una exposición prolongada a Ca elevado indujo un aumento del ARNm de Pit-1, sugiriendo que el Ca elevado regula la sensibilidad al Pi en las CMLV. Resultados similares fueron observados por Proudfoot y colaboradores, quienes encontraron que en cultivos de CMLV una exposición a altas concentraciones de Ca (1.8 a 5mM) indujo calcificación. El aumento concomitante en los niveles intracelulares de Ca, se asoció con una fosfatasa alcalina alterada y con niveles

disminuidos de la proteína Gla de la matriz (MGP, del inglés *Matrix gla* protein). Asimismo, niveles elevados de Ca estimularon la liberación de vesículas de matriz procedentes de CML humanas que potenciaron la mineralización (96). El uso de inhibidores del flujo de Ca (diltiazem y BAPTA) bloqueó la mineralización de CMLV (97). Todos estos resultados indican que los niveles elevados de Ca en las CMLV tienen efectos promineralizantes, aumentando el producto Ca x P, y regulando diferentes mecanismos intracelulares que favorecen la mineralización de la matriz extracelular.

Históricamente, niveles elevados de Ca sérico han sido asociados con mayor riesgo de infarto de miocardio, calcificación coronaria, y un aumento de espesor de placas. Más recientemente, una serie de estudios han demostrado entre la población con ERC una asociación entre niveles altos de Ca sérico y calcificación (98-100) lo que se traduce también con mayor disfunción cardiovascular o mortalidad. Esta asociación también resulta significativa con la comparación del producto Ca x P (101). Es interesante señalar que las hipercalcemias esporádicas son fenómenos relativamente frecuentes en pacientes en diálisis dada la intervención de factores como la composición del líquido de dializado, la terapia con vitamina D o la administración de quelantes de P basados en Ca. Las subidas de Ca, aunque esporádicas, en un entorno de P elevado son altamente perjudiciales (11, 101). Esta idea está respaldada por estudios clínicos que muestran cómo el uso de quelantes de P no basados en el Ca disminuían la calcificación vascular (102-104) y la mortalidad (102, 105).

Por otro lado, diversos trabajos han comprobado que en cultivos *in vitro* de CMLV se puede inducir mineralización aumentando los niveles de fosfato en el

medio. Cuando los niveles de fosfato del cultivo se elevan hasta niveles similares a los encontrados en individuos urémicos ($> 2\text{mM}$), la matriz extracelular que rodea a las CMLV desarrolla una mineralización con características similares a la observada en las calcificaciones vasculares y en el hueso *in vivo*, incluyendo la presencia de fibras de colágeno calcificantes, vesículas de matriz e hidroxapatita (59, 106-108).

Altas concentraciones de P inducen una transición fenotípica de CMLV *in vitro*, de manera simultánea al desarrollo de la calcificación pasiva, disminuyendo la expresión de marcadores de CMLV y aumentando la de marcadores osteocondrogénicos, como osteopontina (OPN), Runx2, fosfatasa alcalina ó BMP2 (106). Estos cambios son muy similares a los que se observan en las arterias de los pacientes con ERC (107). Durante esta transición las CMLV, de fenotipo contráctil, se transforman en células de fenotipo osteogénico. Se piensa que este fenotipo osteogénico está preparado para reparar o adaptar a las CMLV a un microambiente mineralizante (107).

Villabellosta y colaboradores evaluaron *in vitro* el proceso de calcificación inducido por P analizando la deposición de Ca y Pi (DCP) y estudiando los cambios osteogénicos durante este proceso. Estos autores sugieren que inicialmente la DCP es un fenómeno pasivo, que depende de la ausencia de inhibidores de la calcificación, y que impulsa después cambios osteogénicos que inducen la aparición de un depósito biomineralizado con una nanoestructura cristalina bien organizada y muy diferente de la nanoestructura cristalina de una mineralización exclusivamente pasiva (109, 110).

En estas condiciones de alto P, las CMLV cambian su morfología y su patrón de crecimiento, formando nódulos calcificantes que se pueden observar al microscopio óptico usando la tinción de Von Kossa. La Figura 6 muestra la aparición de un nódulo calcificante inducido por P en las CMLV. Cambios similares se han observado in vivo en humanos y en modelos animales de calcificación vascular (58, 111). Estos datos confirman la importancia del P como molécula de señalización tanto en la transición fenotípica de CMLV como en la mineralización.

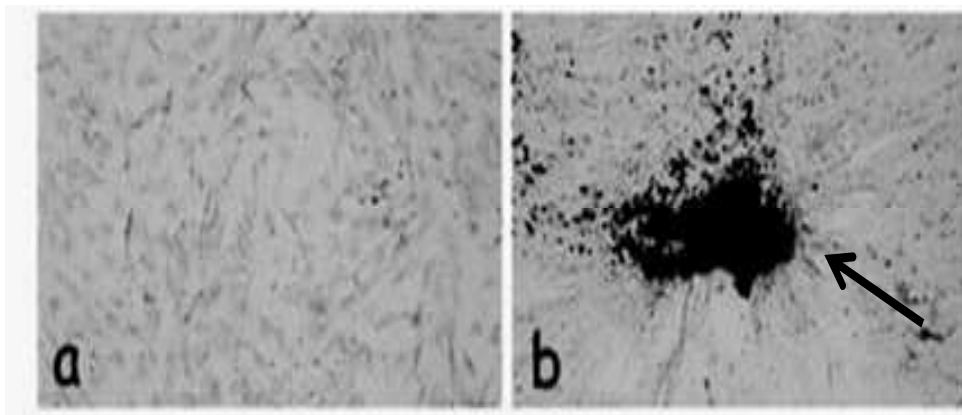


Figura 6. Tinción von kossa realizada en cultivos de CMLV. La imagen “a” corresponde a células controles, y la “b” a células cultivadas con 2mM de fosfato, durante 10 días. Las zonas de color negro indican la existencia de depósitos de fosfato cálcico. La flecha señala un nódulo calcificante (112).

Transporte de P en las células de Músculo Liso Vascular.

El Pi extracelular entra en la célula a través de los cotransportadores Pit-1 y Pit-2 dependientes de sodio, incrementando el P intracelular y la expresión de genes relacionados con la mineralización (106).

Existen tres tipos de cotransportadores de P dependientes de sodio; los de tipo I y II, predominantemente en riñón y epitelio intestinal, y los de tipo III (Pit-1 y Pit-2), que se expresan en muchos tejidos y tipos celulares, incluyendo riñón, cerebro, corazón, hígado, pulmón, hueso y vasos (113).

Jono y colaboradores demostraron en cultivos de CMLV que el transporte de P era dependiente de sodio y dependiente de la concentración de PO, sugiriendo la presencia de un cotransportador de P (Pit-1) dependiente de sodio en las CMLV, lo cual se confirmó mediante la utilización del ácido fosfonofórmico (PFA), un inhibidor específico de los cotransportadores de P dependientes de sodio. Al añadir PFA se inhibió el transporte de PO de forma dosis-dependiente y con ello la calcificación y la expresión de marcadores osteogénicos como Cbfa1/Runx2, osteocalcina, osteopontina y fosfatasa alcalina (112).

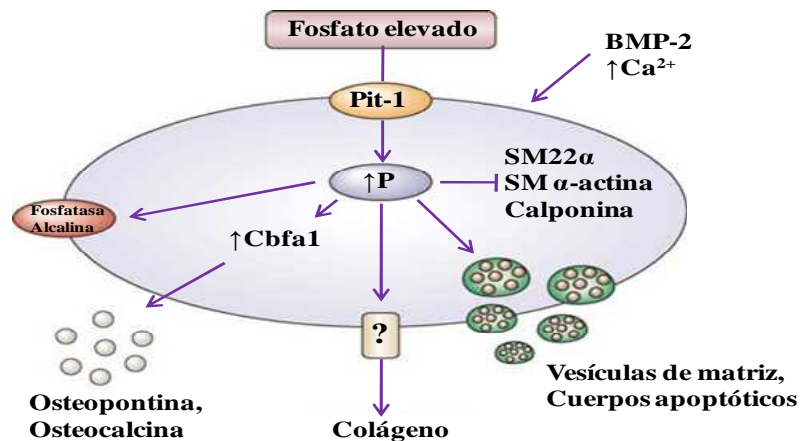


Figura 7. Efecto de las concentraciones elevadas de P en las CMLV. El fosfato entra a través del cotransportador Pit-1 hacia el interior de la célula, eleva el P intracelular, y regula la expresión de Cbfa1, a la vez que disminuye la expresión de marcadores miogénicos, facilitando de esta manera el cambio de fenotipo.

Asimismo Li y colaboradores demostraron que la inhibición del transporte de P mediante ARNsi específico del Pit-1 en CMLV bloqueaba la expresión de marcadores osteocondrogénicos (113), tal y como sucedió con PFA en los estudios anteriores de Jono y colaboradores. Otros estudios *in vivo* han demostrado que el Pit-1 interviene en el desarrollo de las CV observando un aumento en la expresión génica de Pit-1 y Cbfa1 en las aortas calcificadas de ratas urémicas respecto a las aortas de ratas sanas (114).

Un estudio realizado con osteoblastos también demostró la importancia del cotransportador Pit-1 en la mineralización de células osteocondrogénicas. En dicho estudio, los niveles de ARNm de Pit-1, pero no de Pit-2, incrementaron durante la diferenciación de los osteoblastos y la mineralización (115).

Sin embargo, Villa-Bellosta y colaboradores han mostrado en diferentes estudios que el efecto del P sobre la calcificación puede ser independiente del cotransportador Pit-1, estando por el contrario el proceso de calcificación más relacionado con la producción de cristales calcio-fosfato que con la entrada intracelular de P (116).

2.4.1.2. Calcitriol

En términos generales, el CTR es considerado el agente terapéutico más utilizado para el tratamiento del hiperparatiroidismo secundario en la ERC. Sin embargo algunos estudios sugieren que el CTR puede inducir calcificaciones por dos vías: una vía directa, a través del receptor de vitamina D (VDR) de las CMLV

(117), y una segunda vía indirecta, por provocar un aumento del producto Ca x P sérico (118, 119).

Trabajos llevados a cabo por nuestro grupo y otros autores muestran que la administración de CTR a ratas con nefrectomía 5/6 produce tanto CV como calcificaciones en tejidos blandos (120-123).

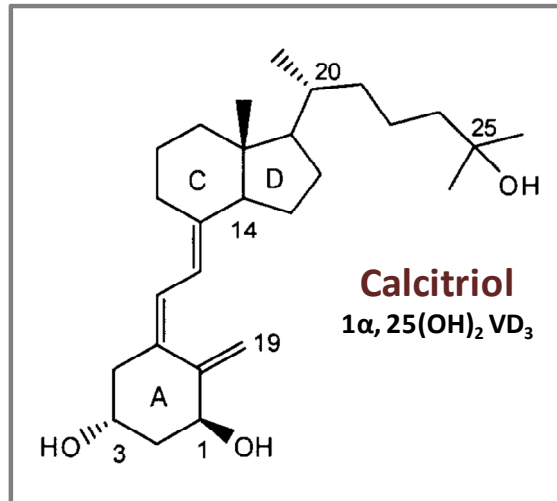


Figura 8. Estructura molecular de la molécula de Calcitriol

Las CMLV expresan receptores de vitamina D (VDR), que responden a la adición de CTR. En un estudio in vitro en CMLV bovinas, Jono y colaboradores observaron que el CTR ejercía un efecto estimulador sobre la calcificación a través de una inhibición directa de la expresión de la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP), un inhibidor endógeno de la calcificación vascular, y de la estimulación de la expresión de marcadores osteogénicos como es la fosfatasa alcalina (117)

Los efectos negativos del CTR sobre las CV descritos refuerzan la intención de buscar análogos que ejerzan un control del hiperparatiroidismo similar al CTR pero con menor efecto sobre el incremento de los niveles séricos de P y CV. En este sentido el paricalcitol (PC), aunque es 3 veces menos efectivo que el CTR en el control del hiperparatiroidismo, disminuye hasta 10 veces la absorción de Ca del intestino, disminuyendo también el producto Ca x P y las CV (120, 124).

Un estudio con ratones LDLR -/- a los cuales se les indujo ERC mediante nefrectomía y una alimentación con una dieta alta en calorías demostró que tanto el CTR como el PC, utilizados a la concentración mínima necesaria para inhibir la secreción de PTH, desempeñaron un papel protector en las CV. Datos publicados por nuestro grupo de investigación han mostrado que paricalcitol y no calcitriol disminuye la CV en ratas nefrectomizadas alimentadas con una dieta alta en P durante 14 días (124). Sin embargo, otros autores han mostrado que concentraciones altas de ambos compuestos resultaron en la inducción de calcificación aórtica, lo cual parece indicar la existencia de un comportamiento bimodal de CTR y PC dependiente de la concentración que influye en el desarrollo de las CV (125).

2.4.1.3. Suero urémico y citoquinas pro-inflamatorias

Los pacientes con ERC presentan un menor aclaramiento renal; y la diálisis sólo elimina parcialmente algunas toxinas urémicas, por lo que éstas tienden a acumularse en el suero pudiendo influir en el desarrollo de CV (24).

En un estudio donde se cultivaron CMLV provenientes de aorta bovina en presencia de suero humano normal, versus suero proveniente de pacientes en diálisis desde al menos 2 años se observó que el suero urémico promovía la calcificación de estas células induciendo la expresión de osteopontina, un marcador temprano de la diferenciación a osteoblasto. Estos resultados sugieren que, además de la hiperfosfatemia, otros factores incrementados en la uremia pueden estar implicados en la aparición de CV y la progresión de la ERC (126). Es el caso de las toxinas urémicas, como el p-cresol y el indoxil sulfato. En el contexto de la enfermedad renal crónica, el aumento de indoxil sulfato produce un aumento del estrés oxidativo y del estado inflamatorio (127) y un aumento de las calcificaciones (128). Al igual que el p-cresol induce la producción de EROs y de moléculas inflamatorias (129), y está estrechamente relacionado con la aparición de calcificaciones (130).

Las citoquinas proinflamatorias, muy abundantes en el suero del paciente urémico, también parecen tener un importante papel en el desarrollo de CV. Tintut y colaboradores observaron in vitro que la incubación de células vasculares calcificantes (CVC) con concentraciones crecientes de TNF α condujo a un incremento dosis-dependiente de la actividad de la fosfatasa alcalina y a la aparición de depósitos minerales en dichas células (131). Estos mismos autores observaron que la actividad de la fosfatasa alcalina alcanzó niveles significativamente mayores en co-cultivos llevados a cabo con CVC y monocitos respecto a cultivos de CVC sin monocitos (132). Por otro lado, en estudios realizados con células mesenquimales se ha observado que la administración de TNF α estimula la expresión de BMP-2 a través de la activación de NF κ B

dependiente de IKK α y IKK β (133). Asimismo, la estimulación *in vitro* de macrófagos con cristales de fosfato cálcico produce la liberación de TNF α , IL-1 e IL-8 (134).

2.4.2.-Genes y proteínas implicadas en la diferenciación osteogénica

La CV es un fenómeno activo que se asemeja al desarrollo de células del hueso y donde las CMLV van adquiriendo características fenotípicas de osteoblasto (62, 95, 106). Este proceso de diferenciación está sujeto a la regulación de genes osteogénicos en respuesta a señales mecánicas, morfogenéticas, metabólicas, inflamatorias y de naturaleza endocrina (62).

Entre la proteínas inductoras de diferenciación osteogénica destacan: Runx2, Msh Homeobox 2 (Msx2), Proteína morfogenética ósea 2 (BMP2), BMP-4, Distal-less homeobox 5 (Dlx5), Osterix (Sp7), etc. Otras proteínas expresadas por osteoblastos e inducidas por la actividad de estos factores de transcripción osteogénicos son: Osteocalcina (OC ó BGP), Sialoproteína Ósea (BSP), Fosfatasa Alcalina, Colageno tipo I u Osteopontina.

2.4.2.1. Runx2

Runx2 también denominado Cbfa 1, Osf2, AML3 o PEBP2 α -A, es uno de los tres miembros de la familia de factores de transcripción relacionados con el dominio Runt, y es esencial para la osteogénesis y para la condrogénesis (135). Estos factores de transcripción regulan, de manera positiva o negativa, la expresión de genes relacionados con la diferenciación celular osteogénica y con numerosas patologías, como la mineralización ectópica o la progresión y

metástasis de algunos tumores (136, 137). Dicha regulación es llevada a cabo a través de la unión de dicho factor a secuencias específicas de ADN.

El primer experimento que indicó que Runx2 podría actuar como un factor de diferenciación del linaje osteoblástico se hizo en 1997 (138). En dicho experimento se observó que la expresión de Runx2 en células no osteoblásticas, como fibroblastos primarios, activaba la transcripción de sialoproteína ósea (BSP), osteopontina y osteocalcina, una proteína cuya expresión es principalmente regulada por Runx2 en osteoblastos totalmente diferenciados (139). Roedores deficientes en Runx2 exhiben una pérdida total de osificación, tanto endocondral como intramembranosa, debida a una notable ausencia de osteoblastos (140, 141).

Por otro lado, en relación a la regulación de la expresión de Runx2, se ha descrito que está negativamente regulado por otros factores de transcripción, como Msx2 (142) y Bapx1 (143). Además, Runx2 contiene sitios de unión funcionales para sí mismo, de tal manera que una vez que el gen se ha activado por otro factor, la proteína que se produce “autoactiva” al mismo gen de una manera exponencial. De esta forma, se puede entender la “explosión” que se produce en la expresión de Runx2 durante el desarrollo postnatal, pues el intervalo de tiempo que separa la ausencia total de expresión y el nivel máximo de la misma es menor de 12 horas (144).

En los últimos años se ha relacionado la expresión de Runx2 con la diferenciación osteogénica de las CMLV. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales Runx2 regula las CV no están del todo clarificados. Tanaka et al demostraron que Runx2 reprime la expresión génica de marcadores

de CML y promueve la expresión génica de marcadores osteogénicos en aorta humana (135). Runx2 interactúa físicamente con el factor de respuesta al suero (SRF) y afecta al complejo ternario SRF/miocardina, disociando la miocardina de la cromatina, lo que evita totalmente la actividad transcripcional de ésta, por lo que se concluye que Runx2 es un factor crucial para la transición osteogénica de las CMLV.

2.4.2.2. BMP2

La proteína morfogenética de hueso 2 (BMP2) forma parte de la superfamilia del Factor de Crecimiento Tumoral β (TGF- β) y fue identificada originalmente como una proteína inductora de la formación ectópica de hueso (145). La unión de BMP2 a su receptor, un homodímero compuesto por BMPR2 de tipo I y de tipo II, resulta en la fosforilación y activación de BMPR2 tipo I y de proteínas de la familia SMAD que en el núcleo inician la transcripción de genes de respuesta. Por tanto, BMP2 es un potente inductor de la diferenciación celular osteocondrogénica a través de una señalización intracelular mediante Smad1, Smad5 y Smad8, a los que hay que añadir Smad4 como cofactor de transcripción. Por otra parte, también se ha demostrado que la supresión en roedores de Smad6, inhibidor en la cascada de señalización de BMP2, resultó en calcificación ectópica (146).

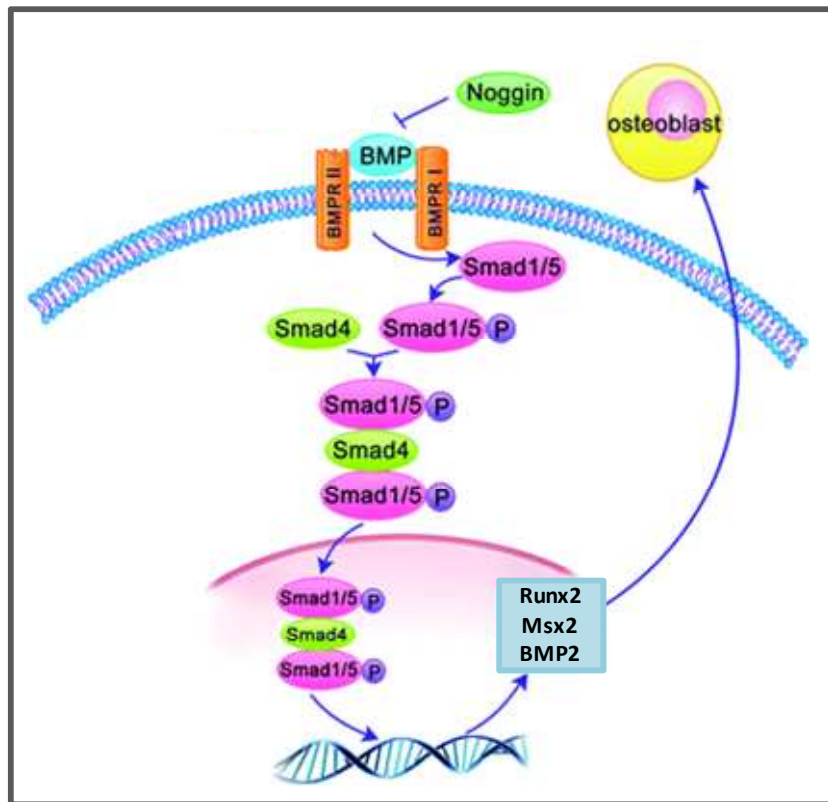


Figura 9. Vía de señalización de BMP2. Adaptado de Yang (147)

La proteína BMP2 se localiza en áreas de mineralización en las arterias y en diversos tipos celulares, como osteoblastos, condrocitos, células T, células endoteliales y CMLV (148, 149). La secreción de BMP2 por células T y células endoteliales promueven de manera paracrina la diferenciación osteogénica y la mineralización de células adyacentes (CMLV o células satélite) (150-152).

En la diferenciación de células mesenquimales hacia células osteoblásticas la proteína BMP2 induce la expresión de factores de transcripción críticos para la

mineralización como Runx2 y Msx2 (153, 154). El efecto promineralizante de Msx2 se produce mediante la regulación positiva de osterix (SP7), un regulador transcripcional global de la mineralización y de la diferenciación osteoblástica, cuya actividad es esencial para la inducción de la fosfatasa alcalina y la mineralización por la vía de Runx2 (155).

El tratamiento con BMP2 incrementa la calcificación inducida por alto P en CMLV. Sin embargo, la adición de BMP2 no promueve la calcificación en condiciones normales de P, indicando que la acción de BMP-2 como inductor de las calcificaciones vasculares depende de la presencia de P en concentraciones elevadas. Además, BMP-2 estimula la calcificación debido al aumento del cotransportador Pit-1 de manera dosis-dependiente, promoviendo la diferenciación osteogénica a través de un aumento de Runx2 y de la inhibición de SM22 (156). Por otra parte, el bloqueo de la acción de BMP2 mediante el uso *in vivo* e *in vitro* de noggin, un antagonista de esta proteína, inhibe la diferenciación osteoblástica y la mineralización de las CMLV (157), así como la deposición de Ca y la diferenciación osteogénica en células mesenquimales (158).

Diversos estudios atribuyen a los microARNs (pequeñas secuencias no codificantes de ARN que silencian la expresión génica) un papel en el proceso de calcificación; de manera que determinados microARNs (miARNs) han sido implicados en el proceso de desdiferenciación de las CML (159). En un estudio reciente Balderman et al, demuestran que en células de músculo liso de arterias coronarias humanas, la administración de BMP2 produjo una disminución de la expresión de los miARNs-30b y 30c, los cuales se unen a la región 3' UTR de

Runx2 para regular su expresión, aumentando así la expresión de Runx2 y promoviendo la calcificación (160).

Se ha demostrado que inflamación, estrés oxidativo e hiperglucemia regulan la expresión de BMP2 en tejidos vasculares (161, 162). Las células endoteliales vasculares son las principales dianas de las citoquinas proinflamatorias, como el TNF α , induciendo calcificación sobre las células vasculares calcificantes (CVC) (131). En este contexto, TNF α incrementa la expresión de BMP2 en células endoteliales (163, 164). Además, Buendía y colaboradores demostraron que el TNF α inducía la liberación de micropartículas en células endoteliales que contenían cantidades significantes de BMP2, potenciando la osteogénesis en CMLV y la calcificación (152). De esta manera, bajo condiciones inflamatorias, la proteína BMP2 liberada por las células endoteliales podría actuar sobre las CMLV adyacentes induciendo diferenciación osteocondrogénica y resultando en calcificación arterial. Además, se sabe que la elevación de los niveles séricos de TNF α y otras citoquinas en pacientes con ERC está asociada con complicaciones comunes, como estrés oxidativo, disfunción endotelial, dislipidemia y niveles séricos elevados de BMP2 (165).

2.4.2.3. Msx2

Msx2 es un miembro de la familia de genes homeobox cuya proteína actúa como un regulador transcripcional en el desarrollo del hueso. Según Shimizu y colaboradores, Msx2 es un factor osteogénico expresado por CMLV durante la calcificación vascular (166). Lee y colaboradores sugieren que el TNF- α promueve la expresión de Msx2 a través de la ruta NF κ B, y a continuación Msx2

induce la expresión de fosfatasa alcalina, factor clave en la mineralización de las CMLV (167).

Para Shao y colaboradores, Msx2 aumenta la expresión de agonistas de Wnt, suprime Dkk1, promueve la localización nuclear de β -Catenina y activa la actividad transcripcional de los factores TCF/LEF (168).

Para evaluar la señalización de BMP2 y Msx2 en la calcificación vascular, Cheng y colaboradores trabajaron con miofibroblastos aórticos primarios, los cuales expresan marcadores de CMLV y son capaces de diferenciarse a adipocitos o a osteocitos. Estas células experimentaron una diferenciación osteogénica cuando son tratadas con BMP2 debido al aumento de Msx2. Efectos similares son encontrados cuando son transfectadas con virus portadores de Msx2. Msx2 mejora la diferenciación osteogénica en sinergia con BMP2. Además, marcadores de adipocitos se suprimen de forma concomitante. Por lo tanto, los miofibroblastos aórticos se pueden desviar al linaje osteogénico frente a la diferenciación adipogénica por la señalización BMP2-Msx2, la cual contribuye a la calcificación(169).

2.4.2.4. Osteocalcina

La osteocalcina, es una hormona peptídica producida por osteoblastos (170) y que puede unirse a la hidroxiapatita. La osteocalcina se encuentra en la matriz ósea, la dentina y en tejidos osificados, por lo que se usa como marcador en el proceso de formación del hueso. Esta hormona interviene en la homeostasis de

iones de Ca y tiene una vida media muy corta, pues se metaboliza rápidamente en el hígado y el riñón.

Alrededor del 20% de la osteocalcina sintetizada no se incorpora al hueso, pasando a la circulación sanguínea. En la insuficiencia renal aguda y en aquellas patologías donde se produce un incremento en la formación de hueso se observan incrementos de osteocalcina. En estos casos las concentraciones de osteocalcina correlacionan bien con otros marcadores, como la fosfatasa alcalina (171).

Durante el tratamiento con fármacos anabólicos contra la osteoporosis, tales como la teriparatida, se han observado niveles séricos altos de osteocalcina correlacionados con el aumento de la densidad mineral ósea. En muchos estudios, la osteocalcina se utiliza como un biomarcador preliminar sobre la eficacia de un fármaco en la formación de hueso. Por ejemplo, la osteocalcina fue utilizada como trazador de osteogénesis en un estudio cuyo objetivo fue evaluar la eficacia de una glicoproteína llamada lactoferrina sobre la formación de hueso (172).

2.4.3. Pérdida de factores inhibidores de la calcificación.

En condiciones normales los niveles fisiológicos de calcio y fosfato en sangre se sitúan cerca de la saturación, lo que parece indicar que en condiciones fisiológicas existen mecanismos fisiológicos que previenen una posible calcificación ectópica (95). Por este motivo la mayoría de tejidos, incluyendo los vasos sanguíneos, contienen factores inhibidores de la calcificación. A menudo la pérdida de estos inhibidores permite el inicio y la progresión de la calcificación en tejidos no óseos (173, 174).

Entre las moléculas con efecto inhibidor de las calcificaciones extra óseas se encuentran: proteína GLA de matriz (MGP), OPN, fetuína-A o pirofosfato. La importancia de estas proteínas en la inhibición de la calcificación ectópica ha sido puesta de manifiesto con los modelos de ratones knockout (175). Por otro lado se observa que pacientes en diálisis presentan niveles reducidos de fetuína-A en suero (176) y en personas con calcificaciones se observa MGP descarboxilada en la media de arterias alrededor de las zonas calcificadas (177). A continuación, se detallan algunas de las principales proteínas inhibidoras de la calcificación vascular.

2.4.3.1. MGP

La proteína GLA de matriz (MGP) es una proteína de bajo peso molecular (12,5 kDa) que se encuentra en huesos, cartílago, riñón, válvulas cardíacas, en la adventicia y la media de las arterias, en el suero y en las vesículas de matriz, donde actúa limitando la mineralización (178, 179). Tanto MGP como osteocalcina contienen residuos glutamato que son carboxilados postraduccionalmente mediante la enzima gamma-glutamyl carboxilasa dando lugar al residuo γ -carboxiglutámico (Gla). Dicha reacción de carboxilación depende de la vitamina K y se produce también en el hueso a niveles relativamente constantes durante el desarrollo y en la vida adulta (106).

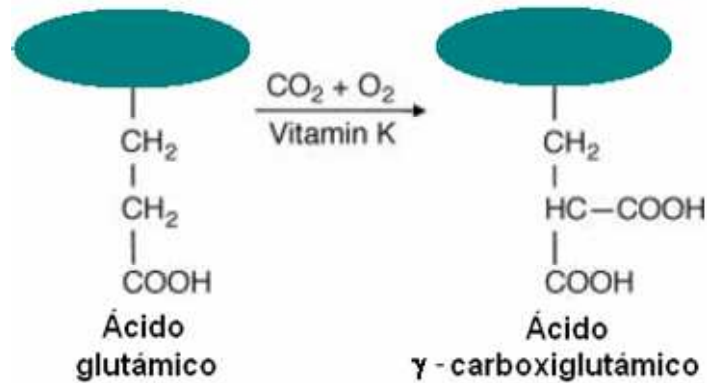


Figura 10. Esquema de la γ -carboxilación de los residuos de ácido glutámico. Este proceso tiene lugar por la acción de una carboxilasa que utiliza como cofactor a la vitamina K.

MGP participa en un mecanismo homeostático regulador destinado a controlar y limitar la mineralización. En cultivos de CMLV *in vitro* la expresión de MGP se incrementa cuando los niveles de Ca extracelular aumentan (106). Schoppet y colaboradores comprobaron en estudios llevados a cabo en roedores que la delección del gen de la MGP (MGP^{-/-}) produce una calcificación inapropiada del cartílago y, a consecuencia de la ruptura espontánea de la aorta calcificada, mueren semanas después de haber nacido. La pérdida de MGP permite que BMP2 incremente su actividad, y esto podría inducir una conversión condrocítica de la CMLV (95, 179). Estos resultados podrían indicar que la proteína MGP inhibe directamente la formación de depósitos minerales en los vasos sanguíneos. Sin embargo, estos roedores manifiestan osteopenia, fracturas, baja estatura y una calcificación inapropiada de las epífisis en los huesos largos. Por tanto, podría ser que MGP regule indirectamente la mineralización mediante efectos en la diferenciación celular, ya que esta proteína tiene la capacidad de

inhibir la diferenciación osteogénica de las células mesenquimales, mediante el secuestro de BMP2, con el que MGP forma un complejo e impidiendo la interacción de BMP2 con sus receptores (106).

Para formar el complejo BMP2/MGP es necesaria la γ -carboxilación. Por tanto, la funcionalidad de MGP depende de la γ -carboxilación a través de la vitamina K (Figura 9). La mayoría de la MGP producida en los sitios de lesiones vasculares se encuentra no- γ -carboxilada y, por lo tanto, es ineficaz para formar el complejo BMP2/MGP. Esto conlleva que MGP sea incapaz de neutralizar la actividad procalcificante de BMP2. Igualmente, el grado de γ -carboxilación de MGP influye en la mineralización extraósea. Una γ -carboxilación insuficiente, más que la cantidad de MGP en sí, aumenta el riesgo de calcificación (106). Además, MGP es transportada por fetuína-A en su forma más γ -carboxilada, sugiriendo que la γ -carboxilación es esencial para dicha unión (180). Por otro lado, otro dato interesante es que la warfarina, un fármaco comúnmente utilizado en pacientes con ERC, actúa como inhibidor de la γ -carboxilación de la MGP. Por tanto, el uso de la warfarina supondría un factor de riesgo potencial para el desarrollo de arteriopatía urémica calcificante (179).

2.4.3.2. Osteopontina

La osteopontina, conocida también como BSP-1 o BNSP, es una fosfoproteína ácida constituida en humanos por unos 314 aminoácidos, donde aproximadamente el 30-36% de éstos presentan grupos carboxilo libres (ácidos aspártico o glutámico).

La osteopontina se expresa normalmente en tejidos mineralizados, como huesos y dientes, y se ha identificado en abundancia en focos de calcificación de placas ateroscleróticas y en válvulas aórticas calcificadas (95), aunque no se encuentra en aortas normales. Estos descubrimientos apuntan a que la OPN pueda ser un regulador de la deposición mineral en CMLV (95).

La osteopontina está implicada en el control de la mineralización, actuando como un inhibidor del crecimiento de cristales de hidroxapatita. Dicha proteína interacciona fuertemente con el Ca de la hidroxapatita, marcándolo para que posteriormente sea reconocido por los osteoclastos mediante una integrina específica, permitiendo así que estas células puedan ejercer su función resortiva sobre el hueso durante el proceso de calcificación (181). Asimismo, estudios llevados a cabo con ratones deficientes en OPN mostraron que tenían de 5 a 10 veces más preosteoclastos en el bazo y en la médula ósea que ratones normales. Resulta lógico pensar que la osteopontina tenga un papel clave sobre la función de los osteoclastos (182).



Figura 11. Mecanismo de acción de la osteopontina. La OPN unida a la hidroxapatita interacciona con la $\alpha\beta_3$ -integrina de los osteoclastos y, de esta forma, permite la resorción mediante estos de la mineralización.

Estudios *in vitro* llevados a cabo con CMLV demuestran que la OPN fosforilada inhibe directamente la deposición mineral, bloqueando de esta manera el crecimiento de los cristales de hidroxapatita. Esto sugiere que la fosforilación de OPN es necesaria para desempeñar su función inhibidora de la calcificación de los vasos sanguíneos. Sin embargo, hay que destacar que *in vivo* la OPN (no fosforilada) promueve la calcificación en los huesos. (112, 183).

2.4.3.4. Fetuína-A

La fetuína-A, o Alpha-2-HS-glycoprotein, es una glicoproteína de 367 aminoácidos que es producida por el hígado. Su concentración sérica normal está comprendida entre 0,5 – 1 g/L en humanos. Esta proteína limita, en parte, la formación y expansión de los cristales de hidroxapatita debido a la formación transitoria de un complejo esférico coloidal soluble de fetuína-A, calcio y fosfato (184), cuya función es transportar y eliminar depósitos insolubles de fosfato cálcico formados en tejidos blandos (calcificaciones ectópicas) (185). Estudios *in vivo* han demostrado que ratones deficientes en fetuína-A desarrollan considerables calcificaciones en corazón, pulmón, piel y riñón, aunque no desarrollan calcificación arterial (186, 187). Otros estudios realizados con pacientes en diálisis han establecido una relación entre las CV y bajas concentraciones séricas de fetuína-A (176, 188).

2.4.3.3. Pirofosfato

El pirofosfato inorgánico es el producto de muchas reacciones fisiológicas y que por tanto se encuentra presente en la sangre y en la orina. Este producto

inorgánico puede prevenir la formación de sales cálcicas ectópicas y regular la mineralización del hueso en condiciones normales.(189, 190). Así, en estudios llevados a cabo en ratones con una mutación en el gen nucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa I (NPP1), la cual implica que estos roedores sufran una deficiencia en pirofosfato, se observa calcificación del cartílago articular, y una extensa CV (191).

Un estudio llevado a cabo por O'Neill y colaboradores mostró que la administración intraperitoneal de pirofosfato en ratas normales alimentadas con una dieta alta en fosfato y adenina reducía el contenido de Ca en aortas calcificadas respecto a ratas no tratadas con pirofosfato. En este mismo trabajo también se observó cómo el pirofosfato administrado por vía intraperitoneal provocaba una menor incidencia y menor cantidad de Ca en ratas urémicas tratadas con CTR respecto a ratas a las que no se les administró pirofosfato (192). Otros autores han demostrado que el pirofosfato inhibe la calcificación aórtica en ratas a las que se les suministraron altas dosis de CTR (193, 194). La pirofosfatasa, enzima encontrada a altas concentraciones en los focos de calcificación, destruye las moléculas de pirofosfato facilitando la calcificación (193, 195). Por tanto, en humanos se ha establecido una relación directa entre bajos niveles de pirofosfato en plasma y una extensa calcificación arterial (196).

Un estudio realizado por Lomashvili y colaboradores con explantes de aorta dañados mecánicamente, demostró que el cultivo con alto P induce un incremento de la calcificación. La presencia de pirofosfato evitó la calcificación de estas aortas (197). Por el contrario, aortas normales (sin daño mecánico)

incubadas con alto P no calcificaron, pero al añadir al medio de cultivo fosfatasa alcalina o pirofosfatasa inorgánica (enzima que degrada el pirofosfato) observaron una significativa calcificación (197). Estos resultados apuntan a que el pirofosfato se encuentra presente en la pared de los vasos sanos en condiciones normales y que desarrolla un importante papel en la regulación de la transdiferenciación de las CMLV hacia el linaje osteogénico.

2.4.4. Micropartículas y Apoptosis

Las micropartículas y los cuerpos apoptóticos desempeñan un papel importante en la calcificación. Ambos pueden actuar como sitios de iniciación para la cristalización de la hidroxiapatita y la mineralización. Dicha situación podría ser controlada mediante la fagocitosis de las micropartículas o de los cuerpos apoptóticos, eliminando así el “nido” de formación de cristales de hidroxiapatita (97). En los vasos sanguíneos sanos probablemente no se forman estos nidos de iniciación de la calcificación, al ser fagocitados de manera eficiente. Sin embargo, si el daño sobre las CMLV es alto y prolongado, la fagocitosis puede estar limitada siendo más probable la aparición de la calcificación (Figura 12). Es muy importante también resaltar que, en condiciones normales, las vesículas liberadas por las CMLV contienen inhibidores de la calcificación como MGP y fetuína-A, mientras que en condiciones patológicas, con estímulos calcificantes, las vesículas además de poseer propiedades mineralizantes disminuyen o pierden el contenido de inhibidores de la calcificación (97, 198).

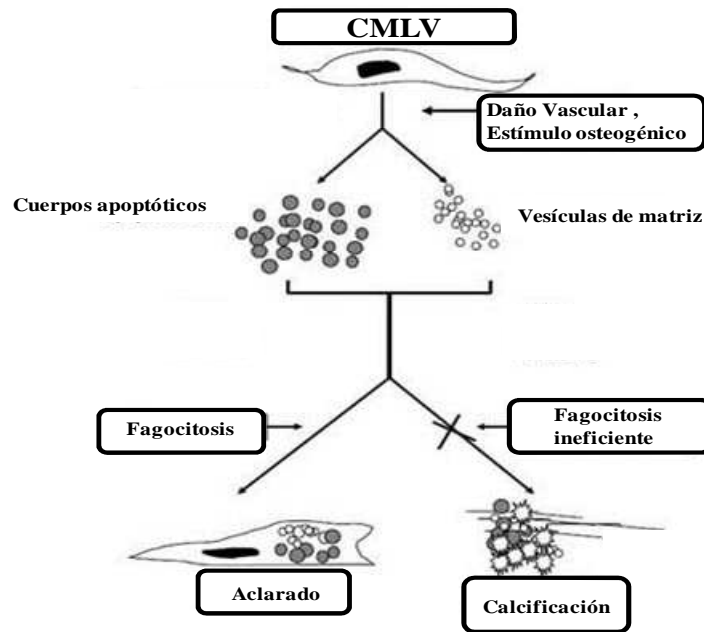


Figura 12. Mecanismo de calcificación producido por cuerpos apoptóticos y micropartículas en las CMLV. Estímulos externos como niveles altos de Ca y/o P promueven la liberación de micropartículas y cuerpos apoptóticos por parte de las CMLV que al ser fagocitados inducen el desarrollo de calcificaciones.

Las micropartículas son liberadas por las CMLV cuando éstas son dañadas por distintos estímulos, como hipertensión, aneurismas, aterosclerosis, elementos tóxicos, inflamación, etc. Estudios realizados in vitro muestran que niveles altos de Ca y de P en el medio de cultivo inducen la liberación de micropartículas por parte de las células (96, 199). Además, altas concentraciones de P propician la muerte de CMLV y, con ello, la liberación de cuerpos apoptóticos.

Sage y colaboradores demostraron que los nanocristales de fosfato cálcico, formados por la presencia de altos niveles de fosfato inorgánico, estimulan la expresión de genes que favorecen la calcificación y la diferenciación celular (200). Además, los nanocristales también inducen apoptosis en CMLV cultivadas in vitro en condiciones libres de suero (201).

Como se ha comentado previamente, los cuerpos apoptóticos juegan un importante papel en el desarrollo de las CV. En un estudio llevado a cabo con CMLV, Proudfoot y colaboradores observaron que la calcificación inducida por niveles elevados de P estaba mediada por cuerpos apoptóticos, los cuales actuaban como estructuras de nucleación (202). Son y colaboradores observaron que cuando las CMLV fueron tratadas también con estatinas la calcificación fue significativamente menor que en las CMLV incubadas sólo con fosfato alto (203). El efecto inhibitorio sobre la calcificación se atribuye a que las estatinas previenen de la apoptosis celular.

2.4.5. Degradación de la elastina.

Las laminillas elásticas que están formadas principalmente por elastina amorfa son el componente principal de la capa media de la aorta, además de las CMLV. La elastocalcinosis se caracteriza por la deposición de hidroxapatita en las laminillas elástica de arterias, lo que favorece la degradación de la elastina. Por otra parte, la elastina degradada tiene una alta afinidad por el Ca (204) y esta degradación de la elastina se produce en paralelo con la elastocalcinosis, lo que sugiere una estrecha relación entre ambos eventos (205). Por lo tanto, la calcificación de la capa media puede incluir al menos dos mecanismos: el proceso

osteogénico en CMLV, que se refiere a la transformación de CMLV en células similares a osteoblastos, y la elastocalcinosis, donde está implicada la degradación de la elastina. Sin embargo, se sabe poco acerca de la interacción entre el proceso osteogénico en CMLV y la elastocalcinosis asociado con la degradación de la elastina.

Para Hosaka y colaboradores la degradación de la elastina también acelera la calcificación inducida por P en CMLV “*in vitro*” (206). Pai y colaboradores muestran cómo el cambio de fenotipo de las CMLV y la degradación de elastina preceden a la calcificación de la media arterial en un modelo de ERC en ratones (207).

3. RUTAS MOLECULARES DE SEÑALIZACIÓN DURANTE EL PROCESO DE CALCIFICACIÓN

Actualmente el desarrollo de CV es considerado un proceso activo si bien los mecanismos moleculares que subyacen a éste no están aún del todo esclarecidos. No sabemos con certeza cuantas rutas de señalización intervienen, cómo interactúan entre ellas o si existe un elemento clave que la active o inhiba.

Resulta razonable pensar que algunos de los factores clave que disparan el inicio de la calcificación puedan estar estrechamente relacionados con la alteración de importantes rutas bioquímicas implicadas en la osteogenesis. Una de estas principales rutas es la ruta canónica Wnt/ β Catenina. Dicha ruta es clave durante el proceso de diferenciación de células madre mesenquimales de médula

ósea hacia osteoblastos (208, 209). La alteración de esta ruta ha sido asociada con el proceso de CV. Shao y colaboradores demostraron que la activación de esta ruta alteraba la expresión de BMP2 y Msx2 promoviendo con ello la calcificación arterial (210). Otros autores han observado que la activación de la ruta Wnt/ β -catenina juega un papel crucial en la diferenciación de células intersticiales de la válvula aórtica a osteoblasto y en la calcificación de dicha válvula aórtica (211).

Un trabajo de Kirton y colaboradores señala que la estimulación osteocondrogénica de pericitos mediante TGF- β 3 ocurre a través de la ruta Wnt/ β -Catenina, y la activación de esta ruta inhibe su diferenciación a adipocitos (212). Otros autores señalan que la ruta Wnt/ β -Catenina debe estar inactiva para que células madre mesenquimales se puedan diferenciar a adipocitos (213).

A pesar de los trabajos que relacionan diferenciación osteogénica con la ruta Wnt/ β -Catenina, existen pocos datos que impliquen a dicha ruta con el proceso de calcificación. En este sentido, Shao y colaboradores demostraron con ratones que la sobreexpresión de Msx2 favorece la calcificación de la aorta a través de la activación la ruta Wnt por incremento de Wnt3a y Wnt7a e inhibición de Dkk-1 (168).

Es ya por tanto suficientemente conocido que la ruta Wnt/ β -Catenina participa en diferentes procesos como la proliferación celular (214, 215), el control del ciclo celular (216) y la diferenciación de células madre hacia distintos tipos celulares (217, 218). Sin embargo, el papel de la activación de la ruta Wnt/ β -Catenina en el proceso de calcificación vascular y en la transdiferenciación fenotípica de las CMLV a células de estirpe osteogénica es aún desconocida.

La ruta Wnt/beta-catenina es compleja y si han descrito al menos tres tipos de señalización dentro de esta vía. Estas vías son: la canónica, la de polaridad celular planar y la dependiente de Ca.

Vía canónica Wnt/ β -Catenina

La ruta canónica Wnt/ β -Catenina implica la translocación nuclear de β -Catenina, mientras que las no canónicas operan de manera independiente a esta proteína. La activación de la vía canónica Wnt/ β -Catenina produce la estabilización y acumulación de β -Catenina en el citoplasma celular y posteriormente su eventual translocación al núcleo actuando como factor de transcripción y activando entre otros a genes pro-osteogénicos. Cuando la ruta Wnt/ β -catenina está inactiva, la proteína β -catenina se encuentra en el citoplasma secuestrada por un complejo proteico formado por la enzima glucógeno sintasa quinasa-3 β (GSK-3 β), Axin, APC (*Adenomatous polyposis coli*) y caseína quinasa-1 α (CK1 α). Este complejo se une a β -Catenina la cual es fosforilada en residuos serina/treonina, y de esta manera es marcada para ser degradada en el proteosoma por ubiquitinación.

Al producirse la unión del ligando perteneciente a la familia de glicoproteínas Wnt (como Wnt1, Wnt3a, Wnt8, Wnt10b, etc) con Frizzled (Fzd), receptor de 7 dominios transmembrana, se activa la ruta. En esta unión entre Fzd y el ligando Wnt participa el co-receptor Lrp 5/6 (del inglés, *Lipoprotein related protein 5/6*), dando lugar a la activación de la proteína citoplasmática Dsh (del inglés, *Dishevelled*). Esta proteína en su forma activa, desarma el complejo proteico formado por GSK-3 β , Axin, APC y CK-1 α , evitando la fosforilación de

β -Catenina por GSK-3 β e impidiendo su posterior degradación por el proteosoma. Por tanto, dicha unión Wnt/Fzd favorece la estabilización de β -Catenina en el citoplasma para después translocarse al núcleo (Figura 13), donde interacciona con el factor de células T (TCF, del inglés, *T cell factor*) y el factor potenciador linfoide (LEF1, del inglés, *Lymphoid enhancing factor-1*) estimulando la expresión de sus genes diana, como Ciclina D1 (CD1) (219, 220), clave en la proliferación celular, ó el oncogen c-Myc (220). Los co-activadores CBP (del inglés, *CREB binding protein*) y p300 se unen a β -Catenina promoviendo la activación de la maquinaria transcripcional (221, 222).

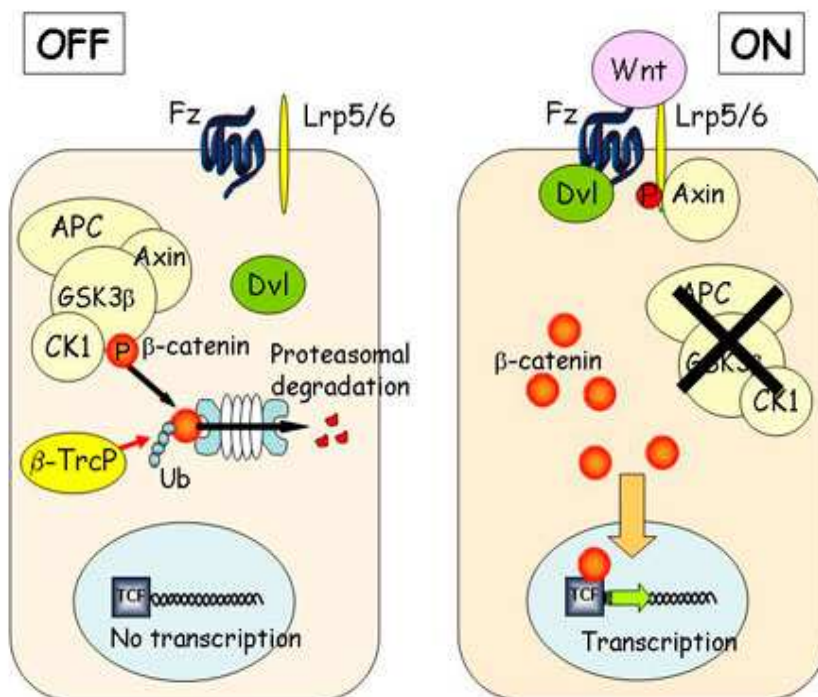


Figura 13. Esquema de la ruta Wnt/ β -Catenina

La ruta Wnt/ β -Catenina es compleja y cuenta con varios elementos que permiten su regulación o inhibición. Uno de los principales inhibidores de la ruta es Dkk1 (*Dickkopf*), que interacciona con Lrp5/6 impidiendo la unión de Fzd con Wnt. También puede bloquear la translocación nuclear de β -Catenina mediante su unión a la proteína transmembrana Kremen. Sin embargo, en ausencia de Dkk-1, Kremen es capaz de favorecer la activación de la ruta (223). Otros inhibidores son la esclerostina, WIF-1 y los pertenecientes a la familia sFRP (del inglés, *Secreted Frizzled related protein*), que compiten con Wnt por unirse a Fzd (224).

Por otro lado, β -Catenina favorece la comunicación célula a célula cuando permanece anclada a la membrana plasmática de la célula, donde interacciona con moléculas de adhesión como E-cadherina (225).

Vía de polaridad celular planar

La vía de la polaridad celular planar (PCP) es una de las vías no canónicas de Wnt, y la cual no utiliza LRP-5/6 como co-receptor.

Al igual que en la vía Wnt/ β -Catenina canónica, la vía de PCP se activa a través de la unión de ligandos de la familia Wnt (Wnt4, Wnt5a, Wnt5b o Wnt11) al receptor Fzd (Fzd3 ó Fzd6) y un co-receptor como el receptor homólogo al de neurotrofinas (NRH1), el receptor relacionado con tirosina kinasas (Ryk), la proteína tirosina kinasa 7 (PTK7) o la proteína tirosina kinasa de receptor de membrana ROR2. Tras la unión el receptor recluta Dsh que mediante sus dominios PDZ y DEP forma un complejo con Daam1 (activador de morfogénesis 1 asociado a Dishevelled). Luego Daam1 activa a Rho, una pequeña proteína G

monomérica, y ésta a su vez activa a la quinasa asociada a Rho, uno de los principales reguladores del citoesqueleto. Asimismo, Dsh también forma un complejo con Rac1. Rac1 media la unión de profilina con actina, promoviendo la reorganización del citoesqueleto y la gastrulación (226), etapa del desarrollo embrionario que tras la segmentación da lugar a la formación de las capas germinales.

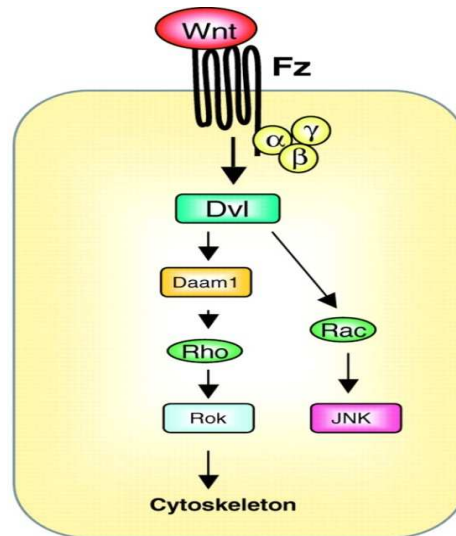


Figura 14. Esquema de la vía de polaridad celular planar (PCP)

Vía Wnt dependiente de Calcio (Ca^{+2})

Otra vía de señalización de Wnt independiente de β -Catenina es la vía Wnt/calcio. La activación de esta ruta permite regular la liberación de Ca del

retículo endoplásmico modulando los niveles de Ca intracelular que participan como segundo mensajero.

Al igual que otras vías de Wnt, la unión del ligando (Wnt5a, Wnt11) al receptor Fzd activa la ruta permitiendo la interacción con Dsh. De esta manera Dsh activa sus dominios específicos PDZ y DEP implicados en la señalización de Wnt/calcio. Sin embargo, en esta ruta se produce también la activación de una proteína G trimérica. Esta co-estimulación de Dsh y la proteína G pueden conducir a la activación de (PLC) fosfolipasa C y de la fosfodiesterasa específica de GMPc (PDE). Si se activa la PLC, el fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP2) componente de la membrana plasmática se escinde en diacilglicerol (DAG) e Inositol trifosfato (IP3). Cuando IP3 se une a su receptor en el retículo endoplásmico se produce la liberación de Ca. El aumento de las concentraciones de Ca y DAG produce la activación de Cdc42 a través de PKC. Cdc42 es un importante regulador de la adhesión celular, la migración, y el ciclo celular. El aumento de Ca también activa la calcineurina y calmodulina (CaMKII). La activación de calcineurina induce la translocación nuclear del factor de transcripción NFAT, que regula el patrón de desarrollo del eje dorso-ventral durante el desarrollo embrionario. CamKII también activa genes TAK1 y NLK quinasa, lo cual puede interferir con la señalización TCF/ β -Catenina de la vía canónica de Wnt.

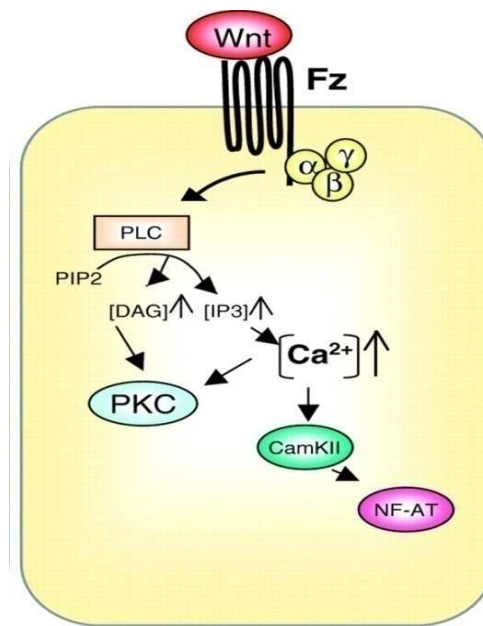


Figura 15. Esquema de la vía Wnt dependiente de Calcio

4. INFLAMACIÓN EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.

La inflamación, en términos generales, es una respuesta del organismo frente a cualquier tipo de agresión capaz de causar un daño celular o tisular. El objetivo del organismo con esta respuesta es aislar el elemento causante del daño para después eliminarlo y reparar el tejido dañado.

La inflamación es un proceso que convive con la evolución de la ERC. Además de los típicos factores de riesgo cardiovascular como diabetes,

hipertensión y obesidad, los enfermos urémicos también soportan otros factores derivados de las alteraciones circulatorias asociadas a la ERC. La acumulación de toxinas y los desajustes del metabolismo mineral propios de la disfunción renal, la contaminación bacteriana del líquido de diálisis, el tipo de membrana y los catéteres venosos en la diálisis estimulan también la producción de citoquinas proinflamatorias. Esta liberación sostenida de citoquinas proinflamatorias agrava las complicaciones del paciente urémico.

En los pacientes con ERC las toxinas urémicas ejercen efectos proinflamatorios sobre monocitos/macrófagos. Dicho proceso adquiere un carácter crónico y contribuye a la disfunción endotelial y la mortalidad cardiovascular (227-229). Las alteraciones en el metabolismo mineral, que aumentan el riesgo de CV, pueden ser un estímulo adicional en la respuesta inflamatoria local (230). A su vez, los estímulos inflamatorios pueden favorecer la mineralización de tejidos vasculares (62). La hemodiálisis y la diálisis peritoneal producen un aumento en la expresión de IL-6 en células mononucleares, elevando sus niveles en plasma (231, 232) y promoviendo la inflamación.

En pacientes con ERC en estadio 3 y 4 se presentan niveles elevados de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1, TNF- α , etcétera, lo que estimula la síntesis de proteína C reactiva (PCR) en el hígado. En general entre un 30 y 50% de los enfermos renales tienen niveles elevados de marcadores inflamatorios en sangre, como PCR, ferritina, fibrinógeno, interleuquina-6 (IL-6), IL-1 β , IL-8, factor de necrosis tumoral- α (TNF α), VCAM-1 ó ICAM-1 (233). El incremento de marcadores de inflamación, como CRP y las citoquinas IL-6, IL-

1 β y TNF se ha vinculado a un aumento de la mortalidad cardiovascular en la población general (234, 235) y particularmente en pacientes con ERC (236, 237).

No se conoce con exactitud qué factores inician el proceso inflamatorio en la ERC. En este sentido, los cambios en la composición del plasma y en la función endotelial, causados por el fallo renal, favorecen el daño vascular y juegan un importante papel en la estimulación temprana de la respuesta inflamatoria. Los niveles séricos de triglicéridos aumentan como resultado de la acumulación de lipoproteínas de densidad intermedia conformadas por lipoproteínas de baja densidad (LDL) y remanentes de quilomicrones. Además, asociada a la ERC se produce la dislipidemia que también puede contribuir al proceso inflamatorio (238). Asimismo, el descenso que se produce durante la ERC en la síntesis hepática de apolipoproteína A-I y en los niveles de lipoproteínas de alta densidad, que tienen efecto antioxidante y protegen al endotelio de los efectos inflamatorios de las citoquinas, contribuyen al aumento de la respuesta inflamatoria. Estos desequilibrios lipídicos, alteran también a la función endotelial y amplifican los efectos perniciosos de los mecanismos proinflamatorios (239).

4.1. CITOQUINAS.

Las citoquinas son proteínas mediadoras del sistema inmune que ejercen su efecto biológico a través de su unión con receptores específicos expresados en la superficie celular. Estos receptores son proteínas que constan de una región extracelular de unión a las citoquinas, una región transmembrana y una región citoplasmática, encargada de la transmisión de señales al interior celular. Las citoquinas controlan diversas funciones fisiológicas como inflamación, respuesta

inmune local y sistémica, diferenciación celular, maduración celular, reparación tisular, hematopoyesis, apoptosis y otros procesos biológicos.

Las citoquinas son producidas principalmente por macrófagos activados y linfocitos, aunque otras células como leucocitos polimorfonucleares (PMN), CMLV, endoteliales, epiteliales, del tejido conjuntivo y adiposo también producen citoquinas.

Las principales citoquinas alteradas en el entorno urémico son interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1). La interleuquina-8 (IL-8) es también un conocido biomarcador inflamatorio y de riesgo cardiovascular. IL-8, IL-6 y TNF α son marcadores inflamatorios mediadores directos en la patogénesis de la aterosclerosis relacionados con riesgo cardiovascular en pacientes renales (240, 241). En el entorno urémico, la acumulación de toxinas como el indoxil-sulfato o el p-cresol inducen un incremento de especies reactivas del oxígeno (EROs) y de la activación de NF κ B en células del túbulo proximal, lo cual conlleva a un aumento en la expresión de ICAM-1 (del inglés, *Intercellular Adhesion Molecule 1*) (242). En CMLV la expresión de esta proteína se ha visto modificada por M-CSF, promoviendo la activación de monocitos/macrófagos y la posterior apoptosis de las CMLV (243).

A continuación, vamos a describir algunas de las principales citoquinas que se encuentran alteradas en la ERC y que son biomarcadores de riesgo cardiovascular.

4.1.1 ICAM-1 (CD54)

ICAM1 es una glicoproteína transmembrana de la superfamilia de inmunoglobulinas que se une a algunas proteínas de la familia de las integrinas promoviendo la adhesión celular en las reacciones inmunes e inflamatorias. Es una molécula mediadora de la unión de células T con la célula presentadora de antígenos, así como de la interacción entre linfocitos T y B, y representa también un elemento muy importante en la adhesión de monocitos, linfocitos y neutrófilos al endotelio activado.

La expresión de ICAM-1 se produce mayormente en células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos y en células de origen hematopoyético, como macrófagos y linfocitos, y en menor proporción en CMLV. Asimismo, ICAM-1 puede ser estimulada por lipopolisacáridos y por citoquinas, como son IFN-gamma, IL-1beta y TNF-alfa. Es decir, la mayoría de estímulos inflamatorios incrementan la concentración de esta molécula.

La unión del receptor específico de linfocito T (TCR) al antígeno de la célula presentadora de antígenos es un sistema de anclaje que modifica la conducta celular. Dicha unión es altamente específica pero de baja afinidad, por lo que se debe estabilizar mediante moléculas de adhesión. Una de las interacciones más importantes encargadas de estabilizar dicha unión del linfocito T con la célula presentadora de antígeno es la unión que constituyen ICAM-1 con la molécula LFA-1, receptor de membrana localizado en linfocitos. Los linfocitos se unen a las células endoteliales a través de la interacción ICAM-1/LFA-1 (Figura 14) y a continuación las células transmigran al interior tisular. En definitiva la unión

ICAM-1/LFA-1 produce el reclutamiento y la activación de eosinófilos, neutrófilos y linfocitos a través de una cascada de señales internas celulares donde están implicadas gran número de quinasas, lo que representa un importante factor en la fisiopatología de las enfermedades vasculares.

Entre el 30 y el 50 % de pacientes con enfermedad renal crónica presentan niveles elevados de ICAM-1.

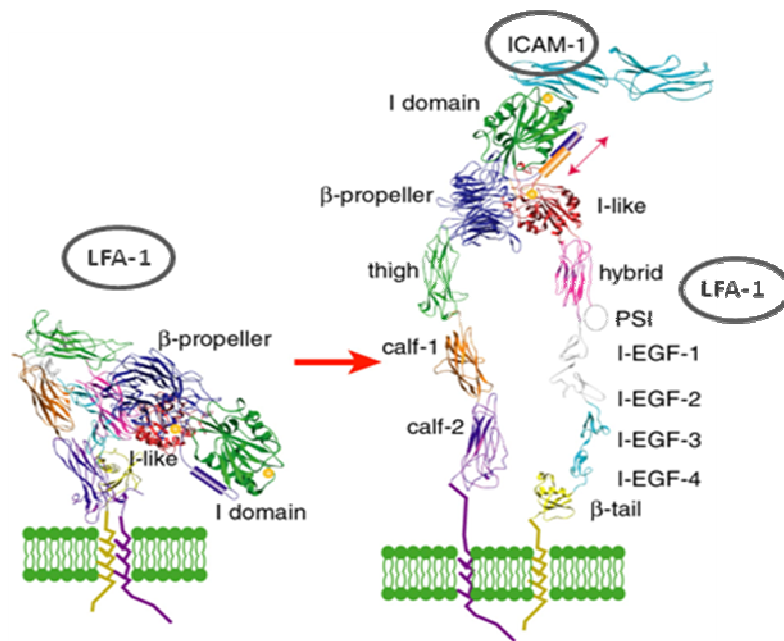


Figura 16. Cambio conformacional de LFA-1 debido a la interacción con ICAM-1

4.1.2 Interleuquina 6 (IL-6)

La IL-6 es una glicoproteína producida fundamentalmente por numerosos tipos de células inmunes, como son monocitos, células mesoteliales, fibroblastos,

adipocitos y linfocitos en respuesta a estímulos fisiológicos, tales como TNF α , IL-1 β , endotoxinas y estrés (229). Las CMLV también expresan IL-6. El receptor de la IL-6 se compone de la subunidad de unión al ligando (IL6-R o gp 80) y una glicoproteína llamada gp 130 que transduce las señales al interior de la célula. La unión de la molécula a su receptor celular produce la formación de un complejo que favorece la heterodimerización con la subunidad gp 130 (244) para iniciar una cascada de señalización que se traducirá en la activación de genes y su posterior expresión proteica para un determinado efecto biológico (245). Dicha cascada de señales pasa por la activación de AKT y ERK, y termina con la fosforilación del factor de transcripción STAT3, el cual activará la transcripción de citoquinas, genes como c-myc, anti-apoptosis, etc.

En pacientes con ERC existen niveles elevados de IL-6 sérica (246). Un menor aclaramiento renal puede ser una de las principales causas de elevación de IL-6 en pacientes con ERC; por ello los niveles de proteínas inflamatorias incrementan a medida que la lesión renal progresa. La tabla 2 recoge las principales causas del aumento de IL-6 y TNF- α en pacientes con ERC.

Niveles elevados de IL-6 se han asociado también con la progresión de aterosclerosis en pacientes con ERC (246). In vitro, la IL-6 disminuye la expresión de adiponectina, una adipoquina anti-aterogénica (247), promoviendo aún más la aterosclerosis.

4.1.3 Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α)

TNF α es una proteína transmembrana, que se dispone en homotrímeros estables, y que es sintetizada en diversos tipos celulares, mayormente en linfocitos y fundamentalmente por macrófagos (248, 249). TNF α es una citoquina proinflamatoria que interviene en enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide y la ERC. La pérdida de función renal en la uremia afecta al aclaramiento de TNF α (250) y es una de las principales causas del aumento de la actividad de TNF α (251).

Es miembro de una familia de ligandos activadores de receptores cuya unión inicia señales de proliferación celular y apoptosis(252, 253). TNF α sufre una escisión proteolítica a través de la enzima convertidora de TNF α (TACE) (254) dando lugar a su forma soluble, la cual ejerce su función biológica a través de su unión con sus receptores específicos TNF-R1 y TNF-R2. Después de la liberación de la forma soluble de TNF α por TACE, el dominio intracelular residual del precursor migra hacia el núcleo de la célula, donde media la producción de citoquinas (255). Además, la activación de TNF-R2 por parte de la forma transmembrana de TNF α es superior a la activación mediante la forma soluble de TNF α (256). Una señalización lenta y continuada de TNF α da lugar a una inflamación crónica.

Un estudio reciente ha demostrado que TNF α es capaz de inducir estrés del retículo endoplásmico en CMLV, lo cual resulta en una captación acentuada de fosfato que conlleva a una inducción de calcificación (257). Asimismo, diversos autores han mostrado que la incubación de células vasculares calcificantes con

concentraciones crecientes de TNF α conduce a un incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina y a la deposición mineral en las células de una manera dosis-dependiente, sugiriendo un papel del TNF α en el desarrollo de la CV (131, 258). Tintut y colaboradores comprobaron que la presencia de monocitos durante el cultivo de CVC aumentaba la actividad fosfatasa alcalina. Estos resultados sugieren que el aumento de calcificación en CVC inducida por monocitos se debe a la interacción intercelular y a la producción de factores solubles como el TNF α (132).

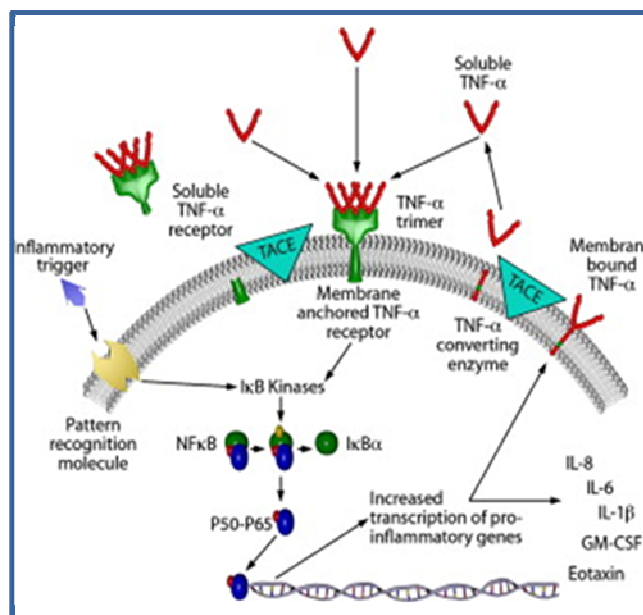


Figura 17. Biología molecular de TNF- α

En un estudio llevado a cabo por Nadra y colaboradores se evidencia una correlación entre la homeostasis iónica y los mecanismos inflamatorios. En dicho estudio se pudo comprobar que cristales básicos de fosfato cálcico provocan una respuesta inflamatoria en macrófagos humanos *in vitro*. Los macrófagos estimulados con los cristales de fosfato cálcico liberaban TNF α , IL-1 e IL-8 (134).

Tabla 2. Factores que se asocian con un incremento en los niveles de IL-6 y TNF α en pacientes con ERC.

Factores genéticos

Edad.

Disminución de la función renal y retención de solutos urémicos.

Comorbilidad.

Sobrecarga de volumen / insuficiencia cardiaca congestiva.

Infecciones persistentes.

Chlamydia pneumoniae.

Catéter (*Staphylococcus aureus*).

Periodontitis.

Estrés oxidativo.

Obesidad.

Factores relacionados con la diálisis.

Membranas bioincompatibles.

Líquido de diálisis no estéril.

4.1.4 Interleuquina-1 (IL-1)

La IL-1 ejerce una variedad de efectos incluyendo la inducción de la inflamación, el aumento de la temperatura corporal, la estimulación de la proliferación de células T y B y la inducción de proteínas de fase aguda. Aunque

monocitos y macrófagos son los principales tipos celulares que sintetizan IL-1, las células endoteliales también la producen (259).

La IL-1 presenta dos formas biológicamente activas: la IL-1 α y la IL-1 β (259), que comparten una alta homología estructural y funcional (260-262). En humanos, la IL-1 β se encuentra predominantemente en circulación y la IL-1 α es un regulador de eventos intracelulares y mediador de inflamación local (259). Burton y colaboradores comprobaron que las CMLV no secretaban IL-1 β , aunque sí describieron una isoforma no madura unida a la membrana (263). Previamente, Loppnow y Libby demostraron mediante un experimento *in vitro* que el tratamiento con antisuero anti IL-1 α inhibía la estimulación de células T helper inducida por IL-1 de superficie en CMLV, lo que identifica a esta isoforma no procesada de IL-1 como una isoforma activa que actúa de manera autocrina o paracrina (264). Es posible que IL-1 β pueda ser secretada a través de otra vía y que actúe de la misma manera. Existen dos tipos de receptores de IL-1 (IL-1R): el receptor tipo I (IL-1RI) y el receptor tipo II (IL-1RII) (259), los cuales comparten muchas características estructurales.

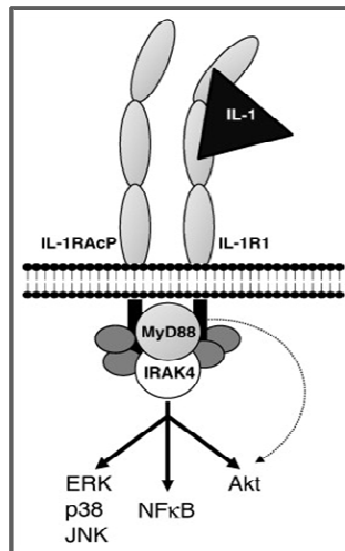


Figura 18. Señalización molecular a través del receptor de IL-1. La unión de IL-1 α o IL-1 β al receptor de IL-1 (IL-1R1) estimula el reclutamiento de la proteína accesoria del receptor de IL-1 (IL-1RAcP) (265).

El efecto proaterogénico de la IL-1 se atribuye a su capacidad de participar en acontecimientos como la inflamación en la pared del vaso, la quimiotaxis de leucocitos y la expresión de factores que estimulan la proliferación de células de músculo liso (266, 267). Asimismo, IL-1 o TNF α producen un aumento en la expresión de metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) durante la aterogénesis (268, 269) lo que promueve la inestabilidad de la placa ateromatosa con el consecuente riesgo de trombosis (266). Adicionalmente, su capacidad para modular la adhesión celular y la infiltración de monocitos en el espacio subendotelial le confiere también un efecto proaterogénico (270, 271).

4.1.5 Interleuquina-8 (IL-8)

La IL-8 es una citoquina liberada ante un estímulo inflamatorio, y actúa como mediadora de la respuesta del sistema inmune innata capaz de amplificar dicha respuesta inflamatoria a nivel local y de estimular la angiogénesis.

La IL-8 es un factor quimiotáctico que atrae a neutrófilos, basófilos y células T, aunque no a monocitos, y que es secretado por macrófagos, células epiteliales, células endoteliales, y también por CMLV (272, 273). Muchos receptores de membrana de estas células son capaces de unirse a IL-8. Los receptores más estudiados son CXCR1 y CXCR2, receptores acoplados a proteína G. De entre estos 2 receptores es el CXCR1 el más expresado y de mayor afinidad por IL-8.

Pacientes en hemodiálisis presentan altos niveles de IL-8, así como de IL6 y TNF α , al compararlos con individuos normales (251). Además, dicha citoquina aumenta aún más sus niveles séricos en pacientes con enfermedad renal terminal, lo cual la convierte en un fuerte predictor de mortalidad cardiovascular en pacientes con enfermedad renal terminal (274).

4.2. EL ESTADO OXIDATIVO EN LA ENFERMEDAD RENAL

En el mantenimiento del equilibrio redox juegan un papel muy importante los elementos antioxidantes. Los elementos antioxidantes endógenos más importantes son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y el glutatión reducido (GSH) (275). Otras moléculas que ayudan a mantener el equilibrio redox del organismo son la bilirrubina (276, 277), el ácido úrico (278), el

ácido lipoico (279), la melatonina (280,281), la transferrina y la ferroxidasa (o ceruloplasmina) (282). Las vitaminas A, C y E y algunos metales, como el selenio, son importantes antioxidantes exógenos. El selenio es cofactor de la glutatión peroxidasa, la cual para evitar la peroxidación lipídica usa peróxido de hidrógeno en la oxidación del glutatión reducido (283, 284).

La ERC y su tratamiento mediante hemodiálisis (HD) son estados netamente pro-oxidantes, donde aumenta la producción de elementos oxidantes y disminuyen las sustancias antioxidantes de bajo peso molecular (285, 286). En un estudio realizado para evaluar el nivel de estrés oxidativo (EO) en pacientes con ERC en HD se observó una mayor fracción de ácido dehidroascórbico, radical libre de la vitamina C, al compararlos con individuos normales (287). Asimismo, el nivel en plasma de vitamina C, un anti oxidante natural, fue significativamente menor en pacientes dializados (288). Además, la HD no logró corregir totalmente la toxicidad urémica y por el contrario el propio procedimiento conlleva efectos negativos. Diversos estudios sugieren que la HD agravaría el EO debido a la activación de células inflamatorias causada por el uso de membranas bioincompatibles (289, 290), por pérdidas netas de antioxidantes solubles en agua y por una generación excesiva de radicales libres.

La acumulación de sustancias de naturaleza prooxidante en sangre y en tejidos puede provocar la activación de leucocitos polimorfonucleares, neutrófilos y macrófagos capaces de generar grandes cantidades de EROs. Por otro lado, se ha demostrado un incremento de los lipoperóxidos en plasma y membranas de células sanguíneas de los pacientes que se someten a HD (291).

Por otro lado, Agharazii y colaboradores mostraron como una dieta alta en P, alta en Ca y suplementada con vitamina D induce calcificación en ratas con ERC, la cual está mediada por el aumento de EROs y de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF α . Además, tanto el estado de inflamación como el oxidativo contribuyen a la diferenciación osteogénica de las CMLV (292).

En pacientes con ERC, el aumento de la producción de EROs y de toxinas urémicas de naturaleza oxidante favorece el desplazamiento del equilibrio redox hacia un estado de EO. A su vez, el EO inducido en pacientes con ERC favorece el desarrollo de múltiples complicaciones, especialmente las de origen cardiovascular, fundamentalmente la dislipemia, la resistencia a insulina y el aumento de la presión arterial (hipertensión) (293, 294).

4.3. INFLAMACIÓN COMO FACTOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR.

Los pacientes con ERC tienen una mayor incidencia de eventos cardiovasculares y de mortalidad por enfermedad renal. Factores como hipertensión, dislipidemia y diabetes promueven la ECV. Se ha postulado que en pacientes con ERC y hemodiálisis otros factores como el estrés oxidativo (295, 296), la hiperhomocisteinemia (297, 298) o la inflamación (299) también promueven la ECV. El paciente urémico convive con altos niveles de inflamación y estrés oxidativo desde los estadios iniciales de la enfermedad. A continuación serán comentadas las principales causas que subyacen al incremento de la inflamación.

4.4. PRINCIPALES CAUSAS DE INFLAMACIÓN EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

El riñón es uno de los principales moduladores de la función endocrina y una importante diana para numerosas hormonas. Por ello, el desequilibrio hormonal que se produce en el estado urémico puede verse agravado por un estado de inflamación persistente. Muchos estudios asocian el estado proinflamatorio de la ERC con el aumento de riesgo cardiovascular, existiendo una estrecha relación entre el incremento del grosor íntima-media, el número de placas y el diámetro interior de la arteria carótida con respecto a la elevación de marcadores inflamatorios (300).

Existen muchos factores (Figura 18) que han sido relacionados con un aumento en la inflamación sistémica en pacientes con ERC. En primer lugar, infecciones concurrentes en los enfermos de diálisis pueden ser una de las principales causas de elevación de marcadores de inflamación como la PCR (301). La técnica de diálisis proporciona factores que contribuyen a la inflamación, como puede ser la interacción de los monocitos circulantes con las membranas no biocompatibles usadas en la diálisis (302), el contacto de la sangre con soluciones de diálisis no estériles (303), el uso de agua no ultrapura(304, 305), el exceso de transporte convectivo, así como la frecuencia y duración de esta técnica (306, 307).

Además microorganismos como *Chlamydia pneumoniae* se han asociado con el estatus inflamatorio y la progresión de aterosclerosis en enfermos renales (308, 309). Igualmente, episodios de infección dental como la periodontitis, también se han asociado con la elevación de los marcadores de inflamación

sistémica de los pacientes en hemodiálisis (310, 311). La sobrehidratación en la ERC es otro causante del estado pro-inflamatorio por facilitar la translocación bacteriana en pacientes con edema intestinal severo (312).

Hay que destacar también que el acúmulo tanto de citoquinas (229), como de productos avanzados de glicosilación (AGEs) (313) y otras moléculas pro-oxidantes (295) propician un ambiente pro-inflamatorio progresivo al descenso en el filtrado glomerular. Asimismo, en pacientes en diálisis ha sido demostrada una significativa asociación entre una función renal residual, inflamación sistémica, obesidad y una hipertrofia del ventrículo izquierdo (314). En estos pacientes en diálisis tanto el depósito de grasa troncular (315), como el abdominal (316), se ha asociado con incremento de la inflamación sistémica, debido en parte a la capacidad de los adipocitos (y de los macrófagos que se infiltran la grasa), de secretar a la circulación sistémica IL-6 ó TNF- α (317, 318). Por otro lado, la pérdida de función renal tiene un fuerte impacto sobre el aclaramiento de las adipoquinas aumentando los niveles de éstas en la ERC. La mayoría de las adipoquinas pueden tener efectos pro-inflamatorios, como la leptina (319) o la visfatina (320, 321). En el caso de la adiponectina se le han descrito propiedades anti-inflamatorias y sensibilizantes a la insulina (319)(322) aunque también se ha asociado el aumento de esta adipoquina con la enfermedad cardiovascular y mayor mortalidad (323).

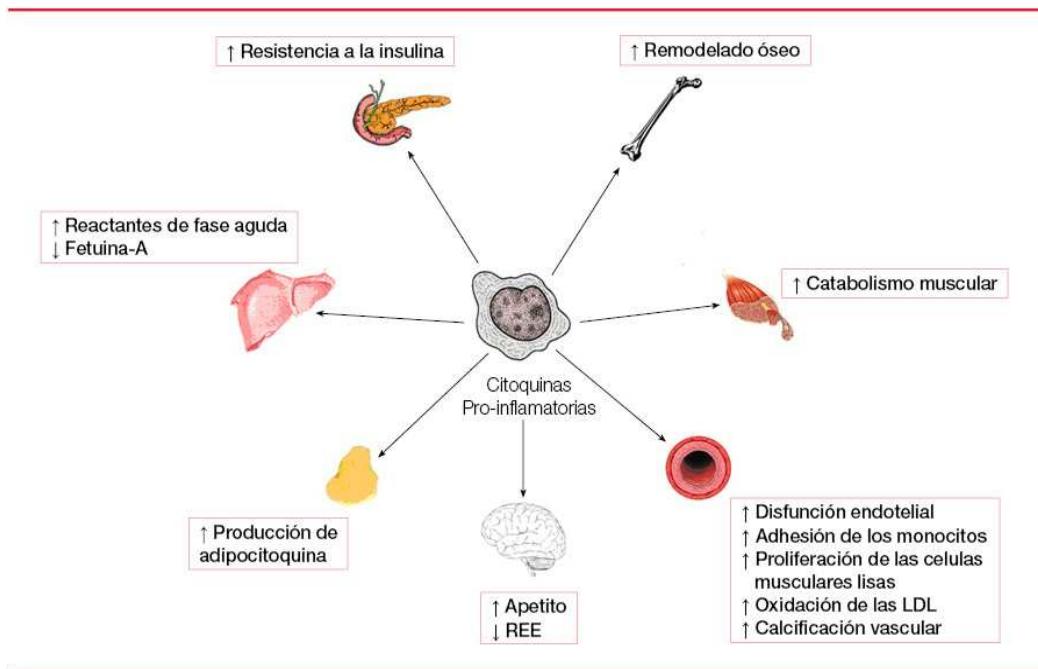


Figura 19. Consecuencias de la inflamación en la ERC (324).

El fosfato también es un factor importante en la inducción de inflamación. Además de malnutrición, la uremia induce una sobrecarga de fosfato, la cual favorece aún más la inflamación sistémica y un aumento en la expresión de marcadores osteogénicos y de TNF α (325). Asimismo, en estudios llevados a cabo en CMLV cultivadas *in vitro* con P elevado se observa un aumento en la generación de EROs y en la activación de p65 (326).

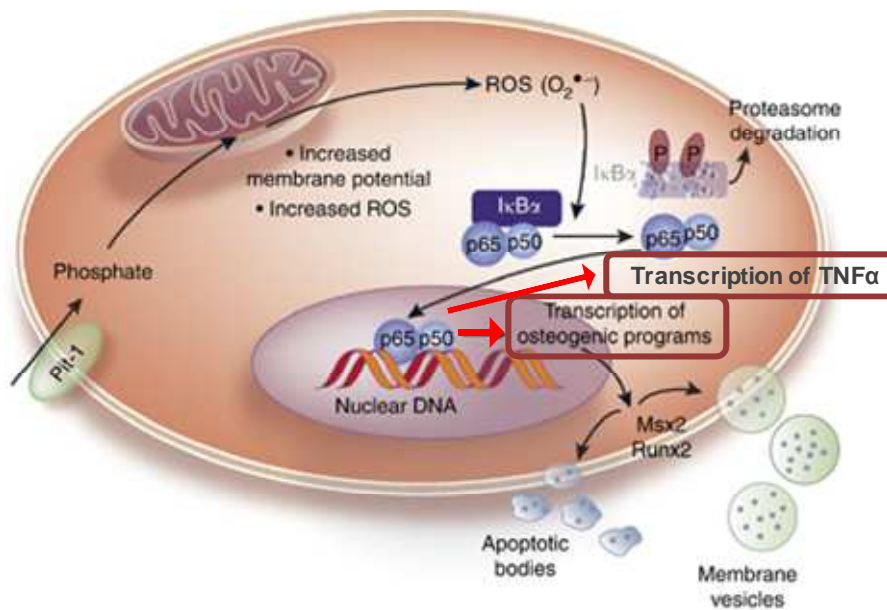


Figura 20. La generación de especies reactivas de oxígeno y la activación de NFκβ inducida por fosfato promueven la expresión de marcadores osteogénicos. Adaptado de Al-Aly 2011 (327).

5. VITAMINA D

La ERC induce una pérdida progresiva de la capacidad del riñón de convertir el calcifediol (25(OH)D3) en CTR, así como de mantener los niveles circulantes de calcifediol para la síntesis no renal de CTR. Tanto la deficiencia de CTR como la del 25(OH)D3 son factores predictores del riesgo de mortalidad en la población en general (328), pero también de deterioro renal (329) y de deterioro cardiovascular (330, 331). Además, dicha deficiencia facilita a su vez el desarrollo de HPT², hipertensión e inflamación sistémica.

Más allá de la prevención de alteraciones del metabolismo mineral y óseo, y de frenar la progresión del HPT^{2º}, la vitamina D tiene un gran potencial terapéutico para el tratamiento y la prevención de diferentes patologías, como la osteoporosis (332), diabetes (333), daño renal (334), tumores (335), algunas enfermedades autoinmunes (336), hipertensión (337) y otras enfermedades cardiovasculares (338).

5.1. ESTRUCTURA, BIOSÍNTESIS Y MECANISMO DE ACCIÓN DE LA VITAMINA D.

La Vitamina D es una hormona esteroide fundamental en la homeostasis mineral y en el mantenimiento de la estructura correcta del hueso. Además, se le han atribuido funciones relacionadas con la regulación del crecimiento, maduración y diferenciación celular (339), la secreción hormonal (340) y la respuesta inmune (341).

La vitamina D engloba una familia de compuestos derivados del colesterol y está estructuralmente relacionada con las hormonas esteroides. Hay dos formas predominantes de vitamina D: el ergocalciferol (vitamina D₂), sintetizado en plantas y hongos e ingerido por la dieta, y el colecalciferol (vitamina D₃), que puede ser adquirido de tejidos animales por la dieta o sintetizado en la piel por conversión fotolítica del 7-dehidrocolesterol (342) gracias a la exposición a rayos solares. Ambas moléculas de Vitamina D necesitan ser activadas a su forma hormonal, a través de dos hidroxilaciones sucesivas (334).

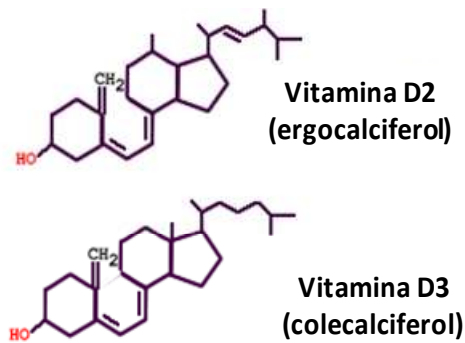


Figura 21. Estructura molecular de la vitamina D.

Ergocalciferol y colecalciferol, dada su naturaleza liposoluble, son transportadas por la sangre asociadas fundamentalmente a la proteína de unión a la vitamina D (DBP, del inglés, *Vitamin D-Binding-Protein*), aunque también pueden ser transportadas por albúmina o lipoproteínas, para después hidroxilarse en el hígado por la 25-hidroxilasa convirtiéndose en 25-hidroxicolecalciferol (25(OH)D3) o calcidiol. El calcidiol es el metabolito más abundante, tiene una vida media larga y se mide en plasma para estimar el estado de vitamina D del individuo. A continuación, es hidroxilado en el riñón por la 1α -hidroxilasa convirtiéndose en 1,25 dihidroxivitamina D, (1,25(OH) $_2$ D3) o CTR.

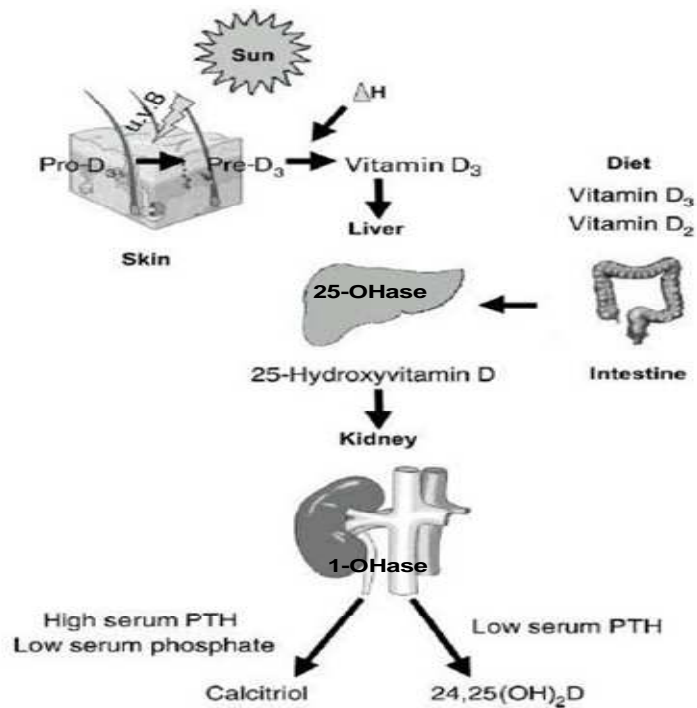


Figura 22. Principales vías metabólicas de la vitamina D. Adaptado de Zittermann (343). En la piel el 7-dehidrocolesterol se convierte en pre-vitamina D por radiación UV-B y este después en vitamina D₃. Después la vitamina D se hidroxila en el hígado para posteriormente volver a hidroxilarse en el riñón produciendo CTR y 24,25(OH)₂D₃.

El CTR es responsable de los efectos de la vitamina D en el metabolismo calcio-fósforo, el mantenimiento de la estructura ósea y la regulación de las glándulas paratiroides (342, 344).

Si bien la 1 α -hidroxilasa se encuentra predominantemente en riñón, en los últimos años se ha descrito la presencia de dicha enzima en otros tipos celulares

como macrófagos, osteoblastos, células paratiroideas, CMLV, células endoteliales y tejidos como el páncreas, glándula mamaria, próstata y colon (345). La producción local de CTR juega un importante papel en una amplia variedad de acciones no-clásicas de la vitamina D (344).

La vitamina D se degrada por acción de la 24-hidroxilasa, responsable de la hidroxilación del la 25(OH)D₃ y del 1, 25(OH)₂D₃ (CTR) para dar lugar a 24,25(OH)₂D₃ y 1,24,25(OH)₃D₃ respectivamente. La 24-hidroxilasa tiene mayor afinidad por el CTR que por la 25(OH)D₃ por lo que se considera un mecanismo de eliminación del exceso de CTR con el fin de evitar toxicidad (346). Dicha proteína se encuentra en numerosos tejidos, aunque se expresa fundamentalmente en el túbulo renal

La vitamina D ejerce su acción biológica a través de la unión a su receptor específico (VDR). El VDR es un receptor nuclear que pertenece a la familia de los receptores esteroideos-tiroideos. En términos generales, los receptores nucleares son reguladores de la transcripción de otros genes.

El VDR se expresa en la mayoría de las células del organismo (347). En las últimas cuatro décadas se han publicado numerosos estudios donde se revela que el sistema endocrino de la Vitamina D es funcional en al menos 38 tejidos del cuerpo, lo que explica el efecto pleiotrópico que se le atribuye a la Vitamina D. En estos tejidos diana, el VDR funciona tanto como factor de transcripción controlando un 3% del genoma humano, como a nivel de las caveolas de la membrana plasmática actuando como un modulador de las vías de traducción de señales (348).

Este receptor contiene varias regiones bien caracterizadas que pueden funcionar de forma autónoma (Figura 20). La región N-terminal de VDR es una región altamente conservada en la familia de receptores nucleares esteroideos; en dicha región se localizan los motivos de unión al ADN y que contiene 2 dedos de zinc (aminoácidos 24-44 y 60-84). Los dedos de zinc estabilizan la unión del VDR a regiones específicas de ADN denominadas “elementos de respuesta a la vitamina D” (VDREs) y que se encuentran en los genes diana de la Vitamina D. Los dedos de Zn interactúan por medio de contactos con los grupos fosfato del esqueleto del ADN (primer dedo) y que permiten que el VDR actúe como un heterodímero uniéndose al receptor del ácido retinoico (RXR) (segundo dedo).

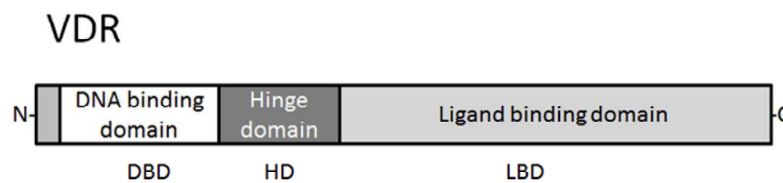


Figura 23. Dominios funcionales del receptor de la Vitamina D (349)

En la región C-terminal del receptor está el dominio de unión al ligando (LBD) con capacidad para unirse a la vitamina D u otras moléculas con una estructura capaz de mimetizar la vitamina D. Este receptor tiene también capacidad para unirse a la 25(OH)D₃ y a la 24,25(OH)₂D₃, pero con una afinidad 100 veces menor.

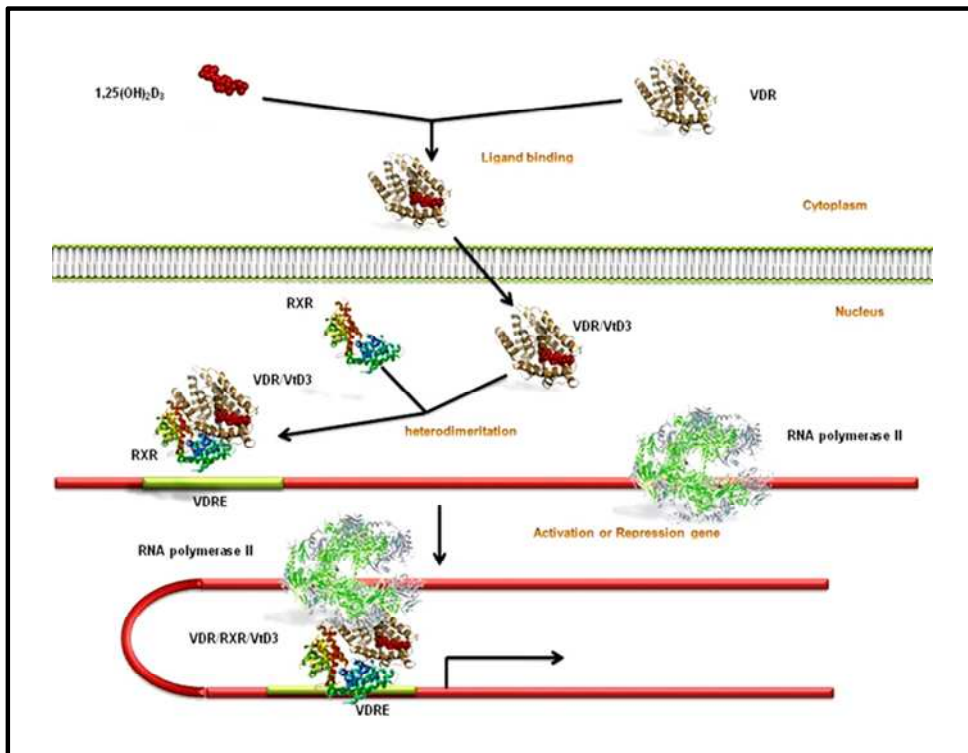


Figura 24. Acción de la Vitamina D a través de su receptor. Adaptado de Di Rosa M. y colaboradores (350).

Una vez que el CTR se ha unido a su receptor se produce la translocación del complejo calcitriol-VDR al núcleo, donde forma un heterodímero con el receptor X-de ácido retinoico (RXR) (342, 351). El complejo calcitriol-VDR-RXR se une a elementos de respuesta a vitamina D (VDREs) presentes en la región promotora de genes específicos en los tejidos diana (342). Además, el calcitriol regula la expresión de su propio receptor (VDR) estimulando su síntesis y aumentando su vida media.

5.2. VITAMINA D EN ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.

El descenso progresivo en la producción de CTR es uno de los factores desencadenantes del hiperparatiroidismo renal secundario; dicho descenso es debido, en parte, a la disminución de la masa renal funcionante que limita la disponibilidad de la enzima 1α -hidroxilasa para producirla (334).

Las células del túbulo proximal obtienen el 25(OH)D₃ unido a la DBP por una endocitosis mediada por la megalina (352). Una vez dentro de la célula, la 25(OH)D₃ puede ser metabolizada por la 1α -hidroxilasa en la mitocondria para su conversión a CTR o bien retornar a la circulación para ayudar a mantener los niveles en sangre de 25(OH)D₃ permitiendo la producción no renal de CTR. Pacientes deficientes en megalina sufren una disminución del filtrado glomerular y de la disponibilidad de vitamina D para sintetizar CTR en el túbulo proximal (353). Por otro lado, la subida de los niveles de FGF23 en respuesta al acúmulo de P inhibe la enzima 1α -hidroxilasa e induce la degradación de 25(OH)D₃, lo que agravará la deficiencia funcional del riñón aumentando los requerimientos de vitamina D para corregir la producción renal y extrarrenal de CTR (354).

De esta manera, la disminución de CTR en la ERC agrava la progresión de la enfermedad y el HPT^{2°}. Además, el descenso de la producción de CTR se ha asociado con un aumento en la morbilidad cardiovascular en enfermos renales (355) y con un incremento de inflamación renal (356). Así, el CTR es administrado en enfermos renales como herramienta terapéutica para restaurar valores normales de Ca en suero (normocalcemia) e inhibir la secreción de PTH. Sin embargo, se ha demostrado que su administración favorece el desarrollo de

calcificaciones (357, 358). Alternativamente se han desarrollado análogos de la vitamina D que presentan menos efectos deletéreos.

5.3. LA VITAMINA D Y EL SISTEMA INMUNE.

Desde su descubrimiento en 1919, y durante muchos años, el estudio de la vitamina D se centró en el control de la homeostasis del Ca y del metabolismo óseo, y en su relación con enfermedades como el raquitismo y la osteomalacia. Además de las funciones clásicas sobre el metabolismo mineral y óseo, se le han atribuido otras muchas acciones sobre la proliferación, diferenciación, apoptosis, autofagia, inmunomodulación, etcétera (347). El efecto inmunomodulador de la vitamina D se descubrió hace décadas al aportar un gran beneficio a pacientes con tuberculosis expuestos a radiación solar. Antes de la era de los antibióticos, tomar el sol y la administración de aceite de hígado de bacalao, era la única terapia eficaz contra la tuberculosis cutánea. La Vitamina D era también un tratamiento complementario al tratamiento con antibióticos de la tuberculosis pulmonar (359).

La detección del receptor de la vitamina D en células del sistema inmune ha permitido describir importantes acciones de la vitamina D sobre el sistema inmune, como son sus efectos sobre la proliferación y la diferenciación celular (360, 361).

5.3.1. Metabolismo de la vitamina D en el sistema inmune.

Como se ha descrito anteriormente, existen dos tipos de pre-vitamina D: la Vitamina D₂ (ergocalciferol), sintetizada por plantas y hongos, y la Vitamina D₃ (colecalciferol), que se adquiere a través de la ingesta de tejidos animales o se

produce por conversión fotocatalítica en la piel del 7-dehidrocolesterol. Para activarse deben experimentar una hidroxilación por la 25-hidroxilasa y otra por la 1α -hidroxilasa, en el hígado y en el riñón respectivamente, convirtiéndose finalmente en CTR. La 1α -hidroxilasa puede estar presente en otros tipos celulares como osteoblastos, células paratiroideas, CMLV, células endoteliales y tejidos como el páncreas, glándula mamaria, próstata y colon (345). Asimismo, Bouillon y colaboradores exponen que la producción local de CTR juega un importante papel en una amplia variedad de acciones no-clásicas de la vitamina D (344).

Si bien la 1α -hidroxilasa se encuentra predominantemente en el riñón, también se ha descrito la presencia de dicha enzima en otras células del sistema inmune (362, 363). Los macrófagos y las células dendríticas expresan las dos enzimas necesarias para convertir la vitamina D₃ en calcitriol (77, 364 365). En dichas células la 1α -hidroxilasa está regulada principalmente por mediadores inflamatorios como el interferón gamma ($IFN\gamma$) y lipopolisacáridos (LPS) (365). Las células B pueden convertir 25(OH)D₃ en 24,25(OH)₂D₃ (366), aunque no expresan 1α -hidroxilasa.

Por otro lado, el receptor de la vitamina D (VDR) se presenta en la mayoría de células del sistema inmune (361), sobretodo macrófagos (361) y células dendríticas (367), lo que sugiere el importante papel de la vitamina D en la modulación de la respuesta inflamatoria (368). Linfocitos T y B expresan también VDR (361). Células T “*Natural Killer*” (NKT) y linfocitos T CD8 α expresan VDR durante el proceso de selección para proteger al organismo de la

autoinmunidad (369). Además, el CTR es capaz de inducir VDR en monocitos, y en menor grado en macrófagos maduros (370).

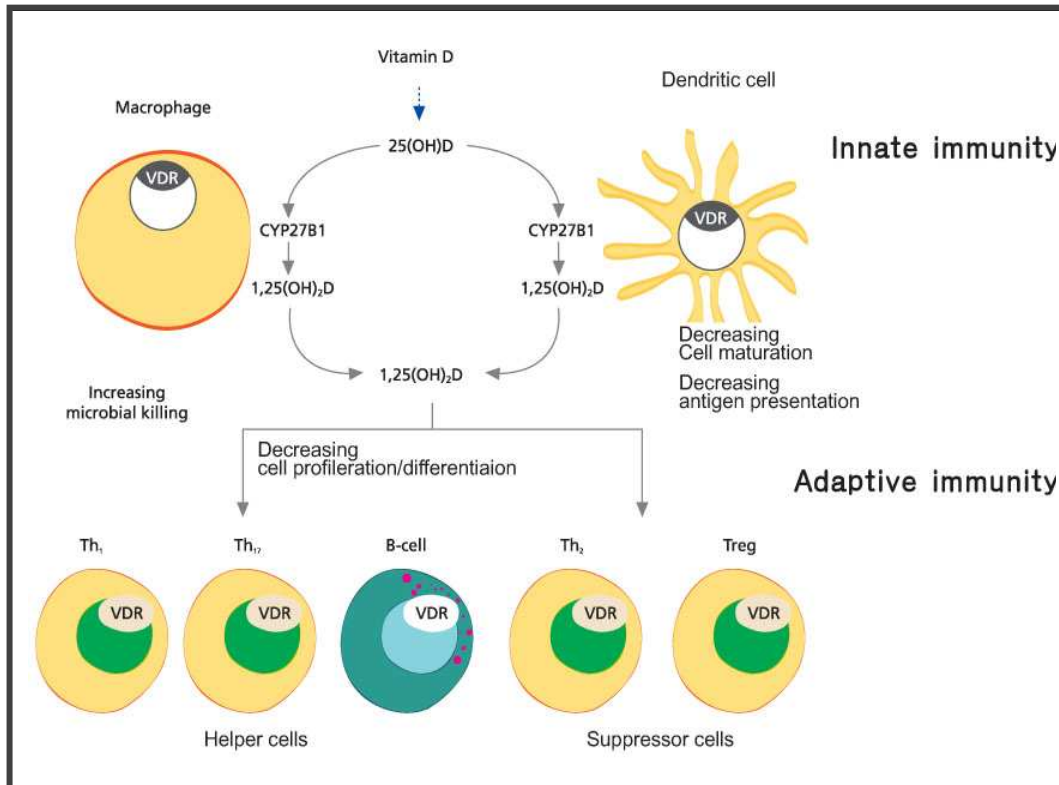


Figura 25. La vitamina D en la inmunidad innata y adaptativa (371)

5.3.2. Efecto inmunomodulador de la vitamina D.

En estudios llevados a cabo con macrófagos activados por LPS, se ha descrito que el CTR actúa como regulador de I κ B (inhibidor de NF κ B) aumentando su expresión y su estabilidad al inducir su fosforilación. El aumento en I κ B produce un descenso de la translocación nuclear de NF κ B, y

consecuentemente de su actividad. Por tanto, estos datos indican que el calcitriol tiene una acción anti-inflamatoria en macrófagos (372). Los macrófagos son grandes productores de citoquinas, fundamentalmente TNF α (373). La transcripción de TNF α se activa en gran medida por NF κ B, importante regulador de la respuesta inmune, la inflamación y el EO (374).

El CTR también suprime la expresión de toll like receptor 2 (TLR2) y 4 (TLR4) en monocitos humanos (375). La familia de receptores TLR desempeña un papel fundamental en el reconocimiento de patógenos, en la activación de la inmunidad innata y median en la producción de citoquinas necesarias para el desarrollo de la inmunidad. La incubación de monocitos aislados con CTR atenúa la expresión de citoquinas proinflamatorias, tales como IL-1, IL-6 y TNF α (376).

Estudios clínicos y epidemiológicos acerca del efecto de la vitamina D sobre la modulación de la respuesta inflamatoria son todavía escasos, y estudios observacionales han generado resultados contradictorios. Algunos estudios indican que la deficiencia de vitamina D se asocia con mayores niveles séricos de biomarcadores inflamatorios, como la IL-6, TNF α y PCR en personas sanas (377-380) y en sujetos obesos (381), mientras que otros estudios no pudieron confirmar estos resultados (382-385). En algunas enfermedades asociadas con la inflamación, como la insuficiencia cardíaca crónica, la ERC y la osteoporosis, suplementos de vitamina D parecen atenuar los niveles séricos de TNF α e incrementar los niveles de IL-10 (citoquina anti-inflamatoria) (386-388).

El CTR se ha usado en ratones para prevenir lupus eritomatoso sistémico, artritis inducida por colágeno, enfermedad inflamatoria intestinal y

encefalomielitis autoinmune experimental, una esclerosis múltiple cuya progresión está impulsada por células T activadas (360, 389, 390).

El tratamiento con CTR o en combinación con antiinflamatorios esteroideos supuso hasta el 50% de éxito en casos moderados de psoriasis, un trastorno inflamatorio crónico de la piel que se caracteriza por una disfunción de los queratinocitos y una infiltración en la epidermis de células inmunitarias (391, 392). Los queratinocitos expresan VDR, y los efectos positivos de la vitamina D en la psoriasis se han atribuido a sus propiedades inmunomoduladoras. Tras el tratamiento tópico de lesiones psoriásicas se encontró una reducción de IL-8 (citoquina pro-inflamatoria) y un aumento de IL-10 (citoquina anti-inflamatoria) (393). El tratamiento con CTR también aumentó la expresión del receptor de IL-10 en células epidérmicas humanas (394).

Las propiedades inmunomoduladoras de la vitamina D son mediadas por VDR (395, 396), presente en la mayoría de tipos de células del sistema inmune, como macrófagos, células dendríticas y linfocitos T CD4+ y CD8+ (361, 367, 397). En estas células los activadores del VDR inhiben la expresión de ciertas citoquinas, como IL-2 en células T, IL-12 en mielomonocitos e IL-2, TNF α , IFN γ y GM-CSF en polimorfonucleares (398-400). El hecho de que se encontrara expresión de VDR en distintos tipos celulares contribuye también a que se hayan llevado a cabo numerosos estudios acerca de las distintas acciones de la vitamina D más allá del metabolismo mineral.

El CTR inhibe la proliferación y la secreción de citoquinas en linfocitos (401), así como la diferenciación y maduración de células dendríticas (402). En

general, el CTR parece inhibir principalmente a los linfocitos Th1 (intervienen en la inmunidad celular), mientras que favorecen la diferenciación de los Th2 (intervienen en la inmunidad humoral) (403).

5.3. ANÁLOGOS DE LA VITAMINA D.

El déficit de vitamina D es una de las principales características del HPT^{2º}, por lo que en los pacientes urémicos se hace necesaria la administración de vitamina D a fin de restaurar la normocalcemia y la secreción de hormona paratiroidea. Sin embargo, la forma activa de la vitamina D tiene una limitación terapéutica importante ya que promueve la absorción de Ca y P en el intestino, aumentando, por tanto, los niveles séricos de dichos iones, y por consiguiente, el riesgo de calcificación cardiovascular en pacientes con ERC. Esto ha llevado al desarrollo de análogos de la vitamina D capaces de reducir los niveles de PTH, sin provocar hipercalcemia e hiperfosfatemia (404, 124). En este sentido, diversos estudios realizados en pacientes en hemodiálisis tratados con análogos de la vitamina D han mostrado un incremento significativo en la supervivencia y un descenso de la CV (405-407).

Las moléculas usualmente empleadas en pacientes urémicos como análogos de la Vitamina D son el falecalcitriol, el maxacalcitol, el doxercalciferol y el paricalcitol.

El **falecalcitriol** es un análogo sintético de la vitamina D con mayor actividad que el CTR debido a la sustitución de los átomos de hidrógeno de los carbonos 26 y 27 por flúor, lo que le confiere un metabolismo más lento. Un

estudio realizado en pacientes urémicos en hemodiálisis mostró su efectividad en cuanto a la inhibición de la secreción de PTH, aunque también produjo un incremento en los niveles séricos de Ca (408).

El **maxacalcitol** o **22-oxacalcitriol**, otro análogo sintético de la vitamina D, tiene una gran eficacia como supresor de la secreción de PTH, como se pudo comprobar en un estudio multicéntrico a doble ciego controlado con placebo. Sin embargo, en dicho estudio se detectó una alta incidencia de episodios de hipercalcemia en pacientes tratados con dosis elevadas de dicha molécula (409). En otro estudio multicéntrico doble ciego randomizado, que incluyó pacientes con HPT2^o, y controlado por placebo se evaluó el impacto del **doxercalciferol** sobre el metabolismo mineral. Pacientes tratados con este análogo experimentaron un importante descenso en los niveles de PTH y ningún incremento en los niveles séricos de Ca (410). Posteriormente, en un estudio realizado con ratas urémicas donde se comparó el efecto del doxercalciferol y del paricalcitol sobre la CV, pese a tener un control similar del HPT2^o, hubo una mayor calcificación aórtica e incremento de la velocidad de pulso en los animales tratados con doxercalciferol (411).

Paricalcitol (19-nor-1,25(OH)2D3), es un análogo de la vitamina D de tercera generación. Tiene una estructura similar a la del CTR, aunque carece de un grupo metileno en la posición C19, y tiene un grupo metilo y doble enlace en la cadena lateral (Figura 25).

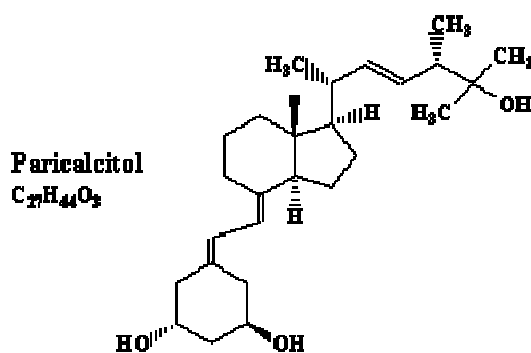


Figura 26. Estructura molecular del Paricalcitol

El Paricalcitol (PC) es un activador del VDR efectivo en la supresión de la secreción de PTH. Actúa aumentando la expresión del VDR (412) y del receptor sensible al Ca en las glándulas paratiroides, aunque no aumenta su actividad en el intestino (413); además de producir una menor resorción del hueso (414, 415). Por tanto, PC reduce la concentración de PTH mediante la disminución de su síntesis y su secreción, e inhibiendo la proliferación de la glándula paratiroides, con un efecto calcemiante mucho menor que el CTR y por tanto, con menor riesgo cardiovascular. En este sentido, un estudio doble ciego randomizado demostró un efecto supresor más rápido y sostenido sobre la PTH, con un menor número de episodios de hipercalcemia y elevación del producto CaxP que en el caso del CTR (416, 417). Asimismo, Teng y colaboradores demostraron una mayor tasa de supervivencia en pacientes tratados con paricalcitol respecto a aquéllos tratados con CTR (418).

Slatopolsky y colaboradores demostraron, tanto en cultivo de células paratiroides bovinas como en ratas urémicas con HPT^{2°}, la efectividad del PC para disminuir la secreción de la PTH. Además, este mismo estudio encontró una

disminución significativa en la expresión del VDR en el intestino, lo que explica el menor efecto sobre el Ca y P en contraste con el CTR (419). En un estudio realizado con pacientes en diálisis se observó que el paricalcitol es aproximadamente 10 veces menos activo que el calcitriol a la hora de absorber Ca en el intestino (420).

Nuestro grupo de investigación en un estudio *in vivo*, con un modelo experimental de nefrectomía y una dieta con contenido elevado en P (1,2%), ha analizado comparativamente los efectos de la administración de CTR, PC y del calcimimético (CM) AMG 641 sobre el HPTH^{2°} y el desarrollo de CV. Los datos obtenidos, tras 28 días de tratamiento, demostraron que las ratas tratadas con PC presentaron niveles de PTH más bajos y una menor deposición tanto de Ca como de P a nivel aórtico en comparación con las tratadas con CTR. Además, este efecto se vio potenciado por el tratamiento simultáneo con CM, que evitó el desarrollo de CV y de tejidos blandos respecto a CTR más CM (124). Asimismo, el análisis de la curva de Kaplan-Meier reflejó una menor mortalidad en las ratas tratadas con CM solo o administrado junto con PC (124). Actualmente el PC es considerado como una herramienta terapéutica apropiada para el tratamiento del HPT^{2°} y otras alteraciones propias de la ERC (421, 422).

Hipótesis y Objetivos

Los pacientes con ERC desarrollan frecuentemente CV a nivel de la túnica media que contribuyen a la alta tasa de morbilidad y mortalidad cardiovascular observada en estos pacientes. Algunas alteraciones del metabolismo mineral asociadas a la ERC, y particularmente la acumulación de fosfato, parecen jugar un papel principal en la generación de las CV.

En las últimas décadas, las estrategias terapéuticas para tratar el HPT^{2º} en la ERC incluía el uso de altas dosis de CTR que podría contribuir sensiblemente al desarrollo de las CV mediante una elevación de los niveles de calcio y fosfato. Alternativamente, en la actualidad se vienen usando análogos de la vitamina D menos calcémicos como el paricalcitol, que ha resultado ser efectivo en el tratamiento del HPT^{2º} sin inducir CV. No obstante, los mecanismos celulares que median el efecto diferencial del calcitriol y del paricalcitol sobre las CV aún no están elucidados. En este estudio se parte de la hipótesis de que el tratamiento con calcitriol o paricalcitol modulará de forma diferente la calcificación, la transformación osteogénica y las vías de señalización intracelular de las CMLV inducidas por niveles elevados de fosfato.

Por otro lado, dos de los principales factores asociados al progreso y a la severidad de la ERC son la inflamación crónica y el estrés oxidativo, los cuales se han relacionado también de manera causal con la CV. Sin embargo, el efecto directo y específico del fosfato como agente pro-inflamatorio y pro-oxidante en CMLV aún no está claro. En este estudio se parte de la hipótesis de que el fosfato elevado es capaz de inducir una respuesta pro-inflamatoria y pro-oxidante que podría ser modulada de forma diferencial por el calcitriol y el paricalcitol.

Así, **el Objetivo General** de este trabajo es:

Evaluar in vitro, en células de músculo liso vascular, el efecto del fosfato, del calcitriol y del paricalcitol sobre los procesos de calcificación, transdiferenciación osteogénica, inflamación y estrés oxidativo.

Para la consecución de este objetivo general, se proponen los siguientes **objetivos específicos**:

1. Evaluar in vitro, en células de músculo liso vascular, el efecto diferencial del calcitriol y del paricalcitol sobre el proceso de calcificación inducido por niveles elevados de fosfato así como los mecanismos intracelulares implicados.

1.1. Estudiar el efecto directo del calcitriol y del paricalcitol sobre el desarrollo de la calcificación (contenido de Ca) inducida por niveles elevados de fosfato en las CMLV.

1.2. Evaluar el efecto de ambas moléculas sobre la expresión génica de marcadores de diferenciación osteogénica (Runx2, BMP2, Msx2 y Osteocalcina) durante la calcificación.

1.3. Determinar la implicación de la ruta canónica Wnt/ β -Catenina en la transdiferenciación osteogénica de las CMLV durante el proceso de calcificación. Modulación por calcitriol y paricalcitol.

2. Evaluar in vitro si el fosfato elevado es capaz de inducir un estado de inflamación y estrés oxidativo en CMLV. Además, en caso de ser así, determinar si este efecto puede ser modulado por el calcitriol o el paricalcitol.

2.1. Evaluar el efecto de niveles elevados de fosfato sobre la expresión génica y la secreción de citoquinas inflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α e ICAM) en células del músculo liso vascular. Modulación diferencial por calcitriol y paricalcitol.

2.2. Determinar el efecto del fosfato sobre la activación de la ruta de señalización de NF κ B/p65. Efecto diferencial del calcitriol y del paricalcitol.

2.3. Estudiar el efecto directo de niveles elevados de fosfato sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en CMLV. Regulación por calcitriol y paricalcitol.

MATERIAL Y METODOS

1. CULTIVO DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR.

Las Células de Músculo Liso Vascular (CMLV) provenientes de aorta humana se obtuvieron de un cultivo primario celular (Clonetics- Lonza Walkersville, Inc., EE.UU.). Las CMLV se estudiaron entre el quinto y el octavo pase. El medio utilizado para la expansión y crecimiento de las CMLV fue SmBm (Smooth muscle Basal medium), suplementado con SmGM-2 SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factors (Clonetics- Lonza Walkersville, Inc., EE.UU.), que contiene: hEGF (Factor de crecimiento epidermal recombinante, humano), insulina, hFGF-B (Factor de crecimiento de fibroblastos β , humano), gentamicina y anfotericina-B. Además fue suplementado con Suero Fetal Bovino (FBS) al 15%. Las células en crecimiento fueron cultivadas en frascos de 75 cm² (Becton Dickinson Labware, NJ, EE.UU).

Al alcanzar el 80-90 % de confluencia, las células fueron subcultivadas de la siguiente manera: se retiró el medio de cultivo y las células adheridas al frasco fueron lavadas 2 veces con suero fisiológico. Posteriormente, las células se levantaron añadiendo al frasco una solución de Tripsina/EDTA (Sigma Aldrich Inc, MO, EE.UU) con incubación de 5 minutos a 37°C. Transcurrido este período de incubación, se añadió medio de cultivo (15% FBS), para inhibir la acción de la tripsina. A continuación, la suspensión celular fue centrifugada a 300 g, durante 10 minutos y a 20°C. El pellet fue resuspendido en medio de cultivo, y se extrajo una alícuota para contar las células. Una vez contadas y lavadas las células se cultivaron en placas de 6 pocillos (Ref. 140675, Nunc, Denmark) a una densidad de 80000-100000 células por pocillo. El medio de cultivo usado para el

crecimiento de las CMLV fue Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Ref. D5671, Sigma Aldrich Inc, MO, EE.UU) suplementado con FBS al 15 % (BioWhittaker), piruvato sódico (1 mmol/L), glutamina (4.5 g/L), penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 mg/mL) y HEPES (20 mmol/L). Las células cultivadas se dejaron crecer en un incubador de células en condiciones de un 5 % de CO₂ y un 90 % de humedad para su mantenimiento.

1.1. RECuento Y DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR.

Para contar las células, a una alícuota de suspensión celular se le añadió el mismo volumen de Trypan Blue (Sigma Aldrich Inc, MO, EE.UU.) y de esta mezcla se cargaron 10 microlitros en la cámara de Neubauer (Figura 1). A continuación, se contaron las células vivas en cada cuadrante de 1 mm², en el microscopio óptico.

El Tripan Blue es una molécula coloreada de gran peso molecular que sólo es capaz de entrar en las células que tienen la membrana alterada. Por tanto una célula viva en perfecto estado se observará incolora mientras que una célula muerta o muy alterada incorporará el colorante a su citoplasma y se observará azul. De este modo se puede determinar la viabilidad celular.

$$\text{(Células incoloras / células totales) x 100 = \% viabilidad celular}$$

La cámara de Neubauer es una cámara de conteo adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una

depresión en el centro. Tiene grabadas en su parte central, dos cuadrículas microscópicas con cuatro áreas de 4x4 cuadrados.

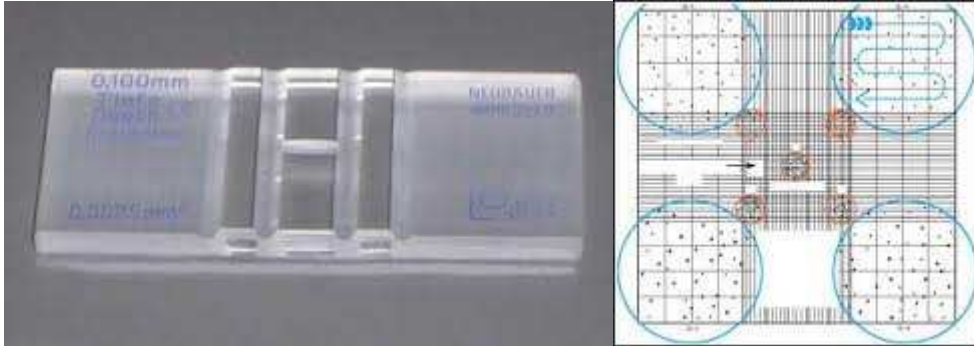


Figura 1. Cámara de Neubauer.

El volumen de cada zona es $1 \times 1 \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ ml}$. Si contamos las células que hay en cada área, se puede calcular la concentración de la suspensión celular según la siguiente fórmula:

Media de contajes de las cuatro zonas $\times 2 \times 10^4 = \text{núm. células/mL}$

2. DISEÑOS Y TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES

Cuando las células en cultivo alcanzaron el 80-90 % de confluencia, se iniciaron los tratamientos de estudio, fabricados con medio de cultivo DMEM. Principalmente se estudiaron 4 grupos experimentales: un grupo control que tenía una concentración de fosfato de 0,9 mM, un grupo fosfato (PO) preparado con

sales de fosfato de sodio a una concentración final de 3,3 mM y 2 grupos adicionales de fosfato a los que se le añadió bien calcitriol (10^{-8} M; PO+CTR) o su análogo paricalcitol (3×10^{-8} M; PO+PC), que se usaron para evaluar el efecto de ambas moléculas sobre los procesos de calcificación, diferenciación osteogénica, estrés oxidativo e inflamación. Para preparar el medio con alto contenido en P se utilizaron Fosfato Monobásico y Fosfato Dibásico en proporción 2:1 (Sodium Phosphate, Sigma Aldrich Inc, MO, EE.UU.).

Para determinar los niveles de *calcificación (contenido de Ca)* y la *diferenciación osteogénica* se llevaron a cabo los siguientes grupos experimentales: Control, PO, PO+CTR y PO+PC. Los tratamientos fueron llevados a cabo durante 9 días. Durante este tiempo los medios de cultivo fueron reemplazados cada 2 ó 3 días. El contenido de Ca se determinó mediante colorimetría y la diferenciación osteogénica se valoró mediante la expresión génica de marcadores osteogénicos.

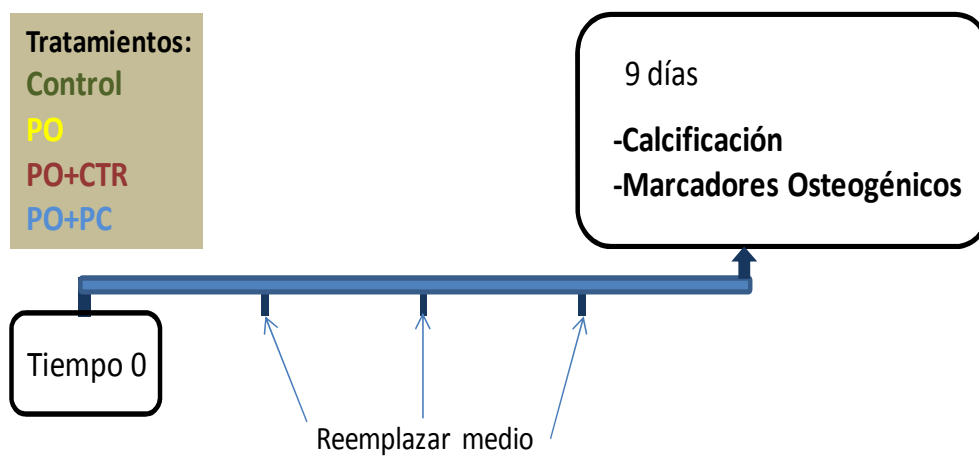


Figura 2

Se realizaron cultivos de 24 horas para valorar la influencia de los grupos experimentales sobre la activación de las *rutas canónicas Wnt/ β -Catenina* mediante western blot y microscopía confocal, así como por expresión de genes diana de la ruta.

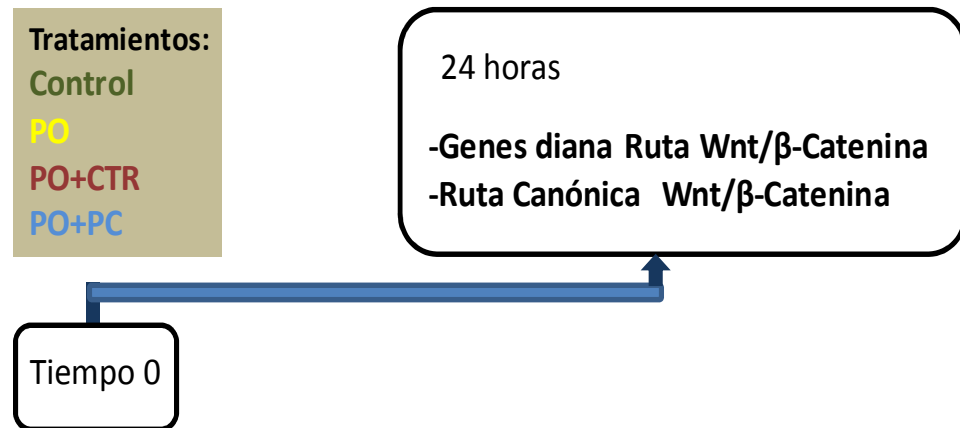


Figura 3

Se llevaron a cabo cultivos de 24 horas con los grupos experimentales indicados anteriormente para evaluar la activación de la *vía de señalización de NF κ B canónica* mediante western blot y microscopía confocal. Asimismo, se realizaron cultivos de 9 días para cuantificar la expresión génica de *marcadores inflamatorios* y los niveles de *citoquinas secretadas y de ICAM-1* en la superficie celular mediante Bio-Plex y citometría de flujo respectivamente.

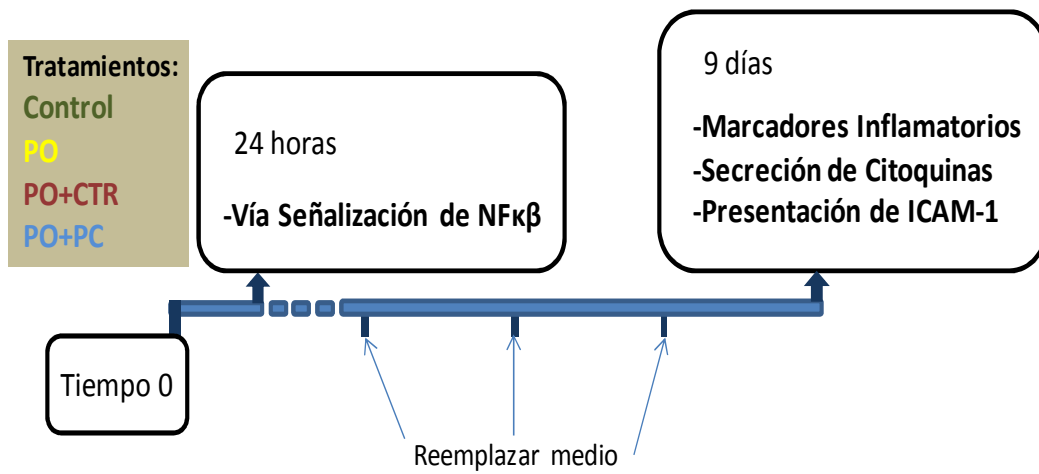


Figura 4

Se realizaron cultivos de 24 horas para evaluar la influencia de los grupos experimentales sobre la *generación de EROs*.

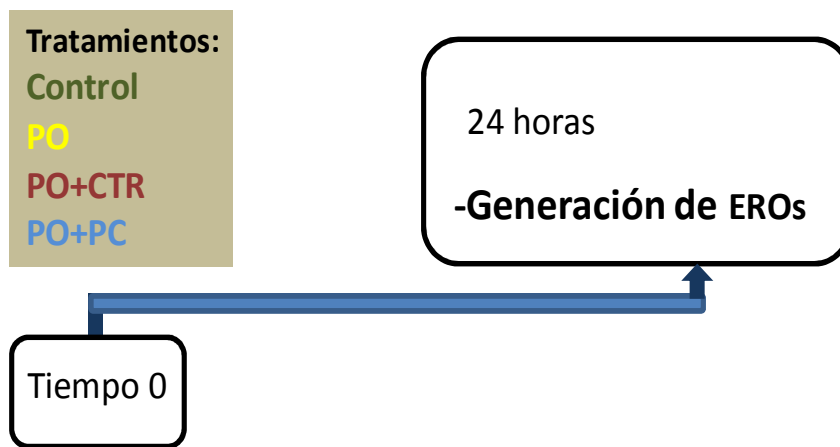


Figura 5

Para evaluar el efecto de la inhibición de la ruta Wnt/ β -Catenina en el proceso de calcificación y en la expresión de genes diana de dicha ruta, se utilizó el inhibidor Dickkopf-related protein 1 (Dkk1; ref 5439-DK-010; R&D Systems; 100 ng/ml). Los grupos estudiados fueron: C, PO, PO+CTR, PO+PC, PO+Dkk-1, PO+CTR+Dkk-1 y PO+PC+Dkk-1. Los tratamientos tuvieron una duración de 24 horas. Tras el tiempo de cultivo se midió la activación de *la ruta Wnt/ β -Catenina* mediante microscopía confocal y la *expresión génica de genes diana* de la ruta.

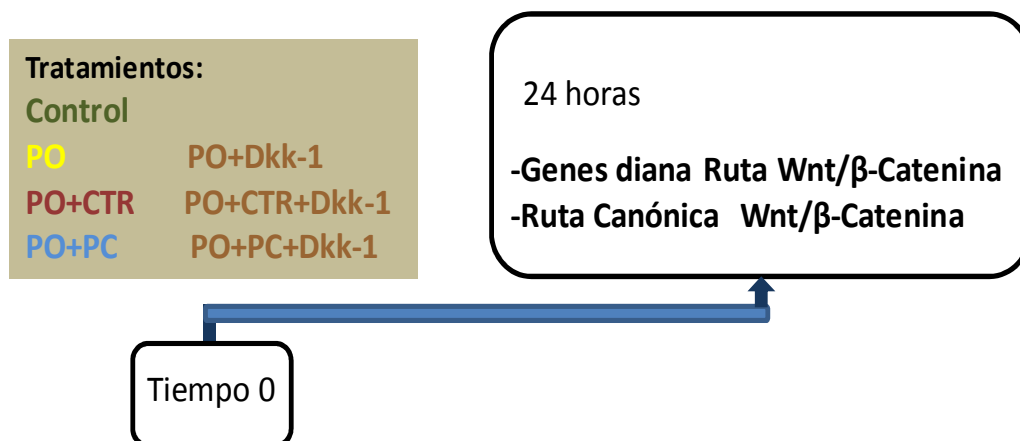


Figura 6

Para valorar el efecto dosis-respuesta del CTR sobre la inflamación, se usaron adicionalmente dosis de 10^{-10} M y 10^{-12} M de CTR. Los grupos experimentales estudiados fueron: C, PO, PO+CTR⁻⁸, PO+CTR⁻¹⁰ y PO+CTR⁻¹². Se llevaron a cabo experimentos de 24 horas y experimentos de 9 días de duración. Tras 24 horas se analizaron la *generación de EROs* y la activación de la

vía de señalización canónica de NFκβ (p65) mediante western blot. Después de 9 días de tratamiento se determinaron la *expresión génica de marcadores de inflamación*, la *presencia de ICAM-1 en la superficie celular* y la *secreción de citoquinas inflamatorias* al medio de cultivo.

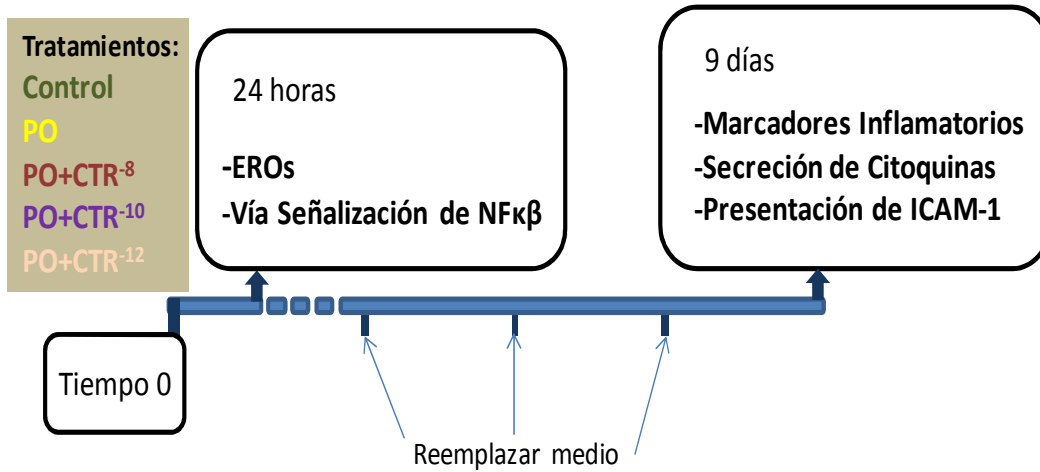


Figura 7

3. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE CALCIFICACION

Para determinar el efecto del fosfato, del calcitriol y del paricalcitol sobre los niveles de calcificación se siguió el diseño experimental descrito en el apartado 2 (Figura 2). Transcurrido el periodo experimental, se retiró el medio de cultivo de cada uno de los pocillos y se lavaron dos veces con PBS (Sigma Aldrich Inc, MO, EE.UU). A continuación, las células se incubaron con HCl 0,6 N (Merck, Darmstadt, Alemania) a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ para descalcificarlas. Después de 24h se recogió la solución de HCl y se procedió a la lisis de las células con NaOH 0,1 M (Panreac Química, SA, Barcelona, España) y SDS 0,1% (Sigma Aldrich Inc, MO, EE.UU) para la cuantificación de proteína (Figura 8).

El contenido de Ca en el extracto ácido obtenido se determinó colorimétricamente utilizando como colorante la fenolsulfoneftaleina (QuantiChrom™ Calcium Assay Kit, DICA-500, BioAssay Systems, USA), que forma con el Ca un complejo muy estable de color azul. El contenido del complejo formado y, por tanto, del Ca de la muestra fue determinado por Espectrofotometría (Biotek Power Wave XS, EE.UU.) a una longitud de onda de 612 nm con lámpara de luz Visible.

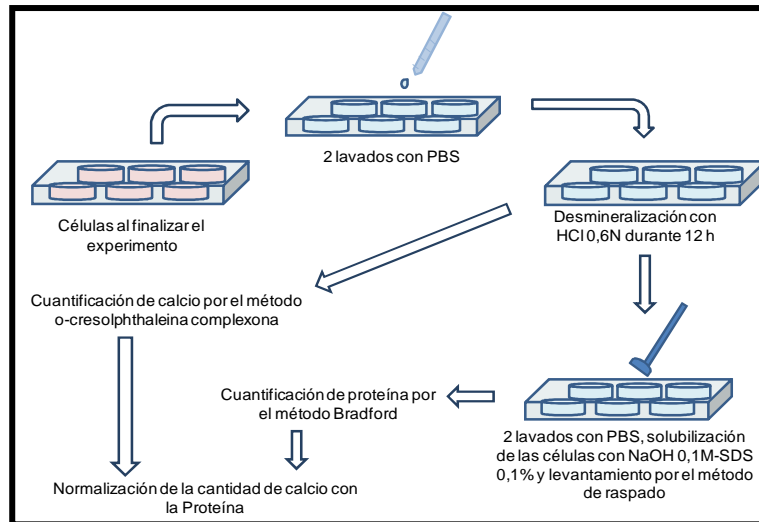


Figura 8. Procesamiento de los cultivos de CMLV transcurrido el tiempo del experimento, para su desmineralización y cuantificación de Ca.

El contenido de proteína en la suspensión de células obtenida fue cuantificado por el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Munich, Alemania), descrito a continuación. El contenido de calcio se normalizó con los datos de proteína obtenidos, de manera que el contenido de calcio de las células se expresa como μg de Ca/mg de proteína.

3.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO BRADFORD.

La determinación de la concentración de proteínas de las muestras se llevó a cabo mediante el método de Bradford (Bradford MM, 1976). Método que se basa en el

colorante Azul Coomassie que, en presencia de proteínas en medio ácido, pasa de una coloración anaranjada a una tonalidad azulada. Este cambio de coloración se cuantifica midiendo su absorbancia a 595 nm de longitud de onda. Los valores obtenidos se comparan con una curva estándar.

Para esta técnica se utilizó el colorante de Bio-Rad (Munich, Alemania) siguiendo el siguiente protocolo:

1. Elaboración de la recta patrón: preparación de 8 diluciones de un estándar de proteína (BSA, Sigma) que cubre las concentraciones de 0,5 a 25 μg .
2. Dilución de las muestras: 50 μl de NaOH 1 N + 1 μl del extracto citoplásmico o nuclear + 749 μl de agua destilada.
3. Adición de 200 μl del reactivo Bradford a cada tubo y mezcla (vórtex).
4. Incubación a temperatura ambiente durante 15 min.
5. Medida de la absorbancia a 595 nm en un lector de placas (Biotek Power Wave XS, EE.UU.).
6. Cuantificación de la concentración de proteína de cada muestra: se calculó la ecuación de la recta patrón obtenida mediante una recta de regresión a partir de los valores de absorbancia de las diluciones del estándar. Dicha ecuación se usó para aplicar los datos de absorbancia de las muestras y calcular las concentraciones de estas.

4. DETERMINACION DE LA EXPRESION GENICA DE MARCADORES OSTEOGENICOS POR RT-PCR.

La expresión génica de los marcadores osteogénicos seleccionados se llevó a cabo mediante la técnica de RT-PCR, descrita a continuación. Para la obtención de las muestras utilizadas en la determinación de la expresión génica se siguió el diseño experimental descrito en el apartado 2 de material y métodos (Figura 2).

Los primers utilizados para determinar la expresión génica de los marcadores seleccionados fueron los siguientes:

GEN	PRIMER DIRECTO O SENTIDO	PRIMER REVERSO O ANTISENTIDO
<i>GAPDH</i>	5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3'	5'-TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT-3'
<i>BMP2</i>	5'-AGGAGGCAAAGAAAAGGAACGGAC-3'	5'-GGAAGCAGCAACGCTAGAAGACAG-3'
<i>Msx2</i>	5'-AAATTCAGAAGATGGAGCGCGTG-3'	5'-CTGGGATGTGGTAAAGGGCGTGCG-3'
<i>Runx2</i>	5'-CCGGAGTGGACGAGGCAAGAGTT-3'	5'-AGCTTCTGTCTGTGCCTTCTGGG-3'
<i>Osteocalcina</i>	5'-GCAGAGTCCAGCAAAGGTGCAGCC-3'	5'-GCCTCCTGAAAGCCGATGTGGTCA-3'

4.1. RT-PCR

4.1.1. Recogida de muestras de cultivo de Células de Músculo Liso Vascular.

Finalizado el experimento se procedió a retirar el medio de cultivo de cada uno de los pocillos y después a lavarlos 2 veces con PBS. A continuación se añadió a cada pocillo 1 ml de TRIZOL (Sigma Aldrich Inc, MO, EE.UU) para levantar las células por el método de raspado. Seguidamente, las células fueron resuspendidas con una pipeta y la suspensión celular colocada en un vial eppendorf de 1,5 ml. Las muestras se sometieron a una agitación con vortex durante 10-15 segundos y posteriormente se congelaron a -80°C hasta su utilización.

4.1.2. Extracción de ARN

La extracción del ARN se llevó a cabo siguiendo el método de Chomczynski y Sacchi (423). En primer lugar, los homogenados celulares se dejaron reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir así la disociación completa de proteínas. Tras este tiempo se agregaron 200 µl de cloroformo por muestra, se agitaron vigorosamente con vortex y fueron incubados durante 5-6 minutos. Después centrifugamos las muestras a 13000 g durante 15 minutos a 4°C, y a continuación se recogió la fase superior acuosa de cada una de las muestras, en la cual permanece el ARN. Para precipitar el ARN se usó 0,5 ml isopropanol por mililitro de trizol usado en cada muestra. Después se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos y más tarde se centrifugaron a 13000 g durante 10 minutos a 4°C. Tras centrifugar la muestra se retiró el sobrenadante y se añadió 1 ml de etanol al 75% para lavar los pellets de

ARN por centrifugación a 13000 g durante 5 minutos y a 4°C. Por último, se retiraron los sobrenadante y se resuspendieron las muestras de ARN en 50-60 µl de agua libre de RNAsa y se calentaron a 60°C durante 10 minutos y en agitación.

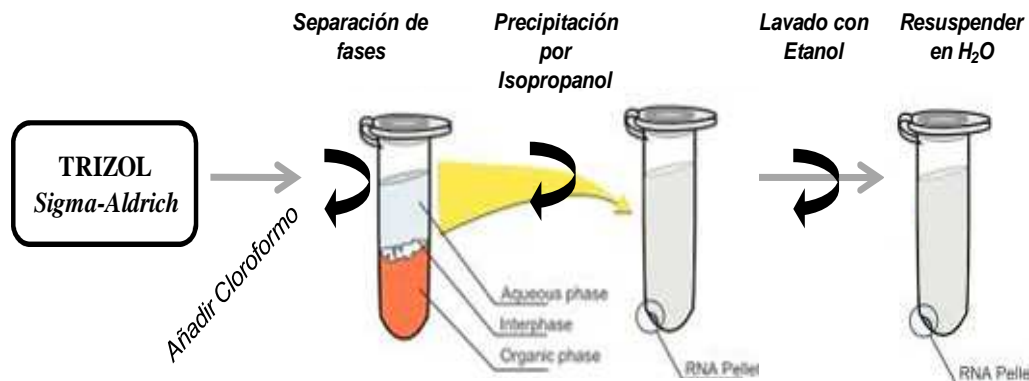


Figura 9. Esquema del protocolo de extracción de ARN total por el método de Chomczynski y Sacchi.

4.1.3. Cuantificación de ARN.

El ARN de las muestras fue cuantificado mediante la medida de absorbancia a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer; NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.).

El cálculo de la concentración de ARN es determinada por el instrumento mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Medida de absorbancia a 260 nm} \times 40 / 1000 = [] \text{ ARN en } \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

4.1.4 Tratamiento con ADNasa

La posible contaminación del ARN total extraído con Trizol con ADN genómico fue eliminado mediante un tratamiento con ADNasas, enzimas que digieren fragmentos de ADN. Para ello se utilizó un kit comercial de Sigma-Aldrich (Referencia AMPD1, St. Louis, Missouri, USA).

El protocolo empleado fue el siguiente: Para tratar 1 µg de ARN la mezcla de reacción contiene 1 µl de tampón de reacción 10X, 1 µl de ADNasa y agua libre de ARNasas y ADNasas hasta completar un volumen final de 10 µl. Esta mezcla de reacción se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añadió a la reacción 1 µl de solución de parada y se dejó incubar durante 10 minutos a 70° C en un termobloque.

4.1.5. RT-PCR a tiempo real

La RT-PCR (del inglés *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*), es una técnica utilizada para determinar la expresión de genes de interés. Dicha técnica permite la amplificación específica de una pequeña cantidad de moléculas de ARNm, primero mediante una retro transcripción (RT) del ARN, produciendo ADNc, y posteriormente amplificando dicho ADNc en sucesivos ciclos de PCR. De esta manera, la RT-PCR es una técnica muy sensible, que requiere poco ARN.

Para realizar la RT-PCR en tiempo real utilizamos el sistema *Lightcycler@480* de Roche (Roche Molecular Biochemicals; Indianápolis, IN, EE.UU), que posibilita la cuantificación de ARN como se ha comentado

anteriormente mediante la síntesis “de novo” de ADN a partir de ARN, y la identificación de productos por su temperatura de fusión en el mismo tubo de reacción. Esta técnica está basada en la monitorización de la PCR usando técnicas de fluorescencia (Sybr-Green I).

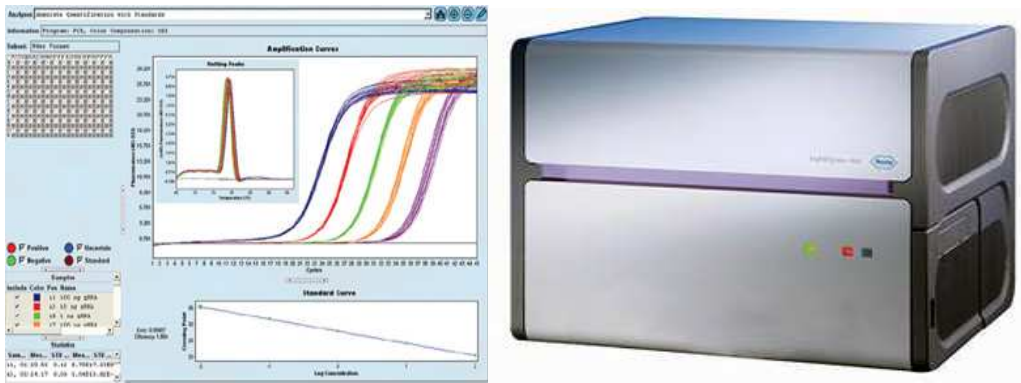


Figura 10. *Lightcycler*

En el sistema *Lightcycler@480* utilizamos el *SYBR Green I*, un fluorocromo que se une preferentemente a ADN de doble cadena. La unión de este reactivo al ADN de doble cadena recién sintetizado induce la emisión de una fluorescencia proporcional a la concentración de ADN sintetizado. De esta forma, el producto que se está formando en cada ronda de amplificación puede ser visualizado de forma continua y monitorizada. La señal aparece a partir de un número determinado de ciclos, dependiendo de la concentración de partida de las muestras y de la eficiencia de los primers.

La temperatura de fusión (T_m , o temperatura de melting) de un fragmento específico corresponde aproximadamente a la mínima temperatura a la cual el producto sintetizado por PCR se separa en dos hebras de ADN de cadena simple, y dicha temperatura va a depender de la longitud del fragmento y su contenido en G+C (guanina+citosina), de manera que es normal obtener distintas curvas para cada producto amplificado, por lo que cuando se utiliza el *SYBR Green I* se puede confirmar la amplificación de la diana específica a través de este análisis. Así, unos fragmentos pueden distinguirse de otros a partir de sus distintas T_m . La derivada de la curva de fusión nos revela un pico máximo correspondiente a la T_m del producto. El área bajo la curva de este pico es proporcional a la cantidad de producto.

Las diferencias entre las distintas muestras en el número de copias de los genes de estudio se determinaron a través del ciclo umbral (C_t), que representa el ciclo de la PCR al cual la fluorescencia supera un valor umbral, experimentando un cambio significativo. El valor de C_t establecido corresponde siempre a un valor encuadrado en la fase exponencial de la curva de fluorescencia, y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde.

Para analizar cambios relativos en la cantidad de transcritos de los distintos genes se elige como referencia un transcrito cuya expresión no se vea modificada a pesar de los distintos tratamientos a los que se someten las muestras, normalmente un gen constitutivo (*housekeeping*). Al comparar los valores de C_t del gen de referencia con los del gen problema en los distintos tratamientos experimentales, se pueden determinar cambios relativos en la expresión del gen

problema. En nuestro estudio, la expresión génica relativa de cada uno de los genes de estudio se determinó mediante RT-PCR cuantitativa relativa utilizando el gen de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa GAPDH como gen control constitutivo (*housekeeping*).

Las secuencias de los *primers* (cebadores) usados en este estudio se diseñaron con los programas OligoExplorer1.2 y Oligo (sistema operativo MS-DOS). Para su diseño se tuvieron en cuenta distintos parámetros entre los que se pueden destacar los siguientes:

- contenido de G+C (50-60%)
- temperatura de hibridación (57-63° C)
- tamaño del cebador (18-24 pb)
- tamaño del producto (100-300 pb)
- localizados en exones diferentes

La RT-PCR se llevó a cabo en un solo paso usando el kit *QuantiTect SYBR Green™ RT-PCR* (Ref 204243, Qiagen, Hilden, Alemania). Para un volumen final de 20 µl se utilizaron 30 ng de ARN total. La mezcla de reacción contenía 0,5 µM de cada *primer*, 10 µl de *SYBR Green PCR* master mix y 0.2 µl de RT (retrotranscriptasa). Para la síntesis del ADNc se hizo primero una incubación a

45°C durante 10 min y después se desnaturaliza a 95°C durante 2 min para separar ambas moléculas (ADNc y ARN). La amplificación se llevó a cabo durante 50 ciclos, y en cada ciclo se llevaba a cabo un primer paso de desnaturalización a 95°C durante 5 segundos, un anillamiento (annealing) de 10 segundos a 60°C y un paso de extensión a 72°C durante 5 segundos. La detección de la fluorescencia del producto se realizó al final de cada ciclo de extensión a 72°C. Para confirmar la especificidad de la amplificación, se analizaron las curvas de *melting* o de fusión de los productos de la PCR desde 65°C a 90° C. En las PCRs se incluyeron controles negativos, que contenían agua en lugar de ARN, para confirmar que no había contaminación en la mezcla de PCR.

4.1.6. Eficiencia de las reacciones.

Como se ha descrito anteriormente, la cuantificación relativa se utiliza para obtener la magnitud de los cambios fisiológicos en los niveles de expresión de un gen en estudio, en comparación con uno o más genes de referencia.

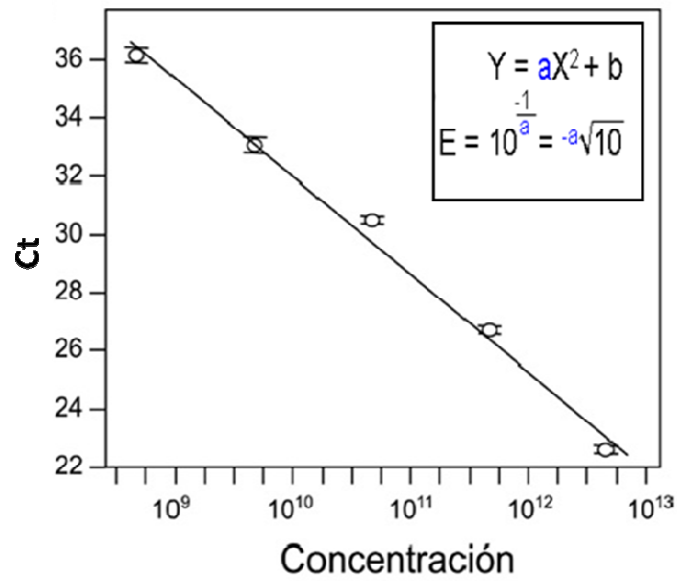


Figura 11. Recta eficiencia primers

Las eficiencias de los primers se calculan a partir de las pendientes de la curva estándar (**a**) obtenida de las reacciones de PCR en tiempo real producto de las diluciones seriadas del ARN de una muestra conocida con los primers considerados y de los valores de Ct obtenidos. Las pendientes de las rectas de regresión lineal para determinar la eficiencia de los distintos cebadores utilizados en esta tesis doctoral tienen un valor más o menos de -3,3.

A continuación se describe el modelo para la cuantificación relativa en este trabajo, en el cual las diferentes eficiencias de los primers tanto para los genes en estudio como para los genes de referencia fueron tomadas en cuenta:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CP}_{\text{target}}(\text{control-muestra})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}}(\text{control-muestra})}}$$

En esta ecuación E_{target} representa la eficiencia de la PCR en tiempo real del gen objeto de estudio; E_{ref} representa la eficiencia de la PCR en tiempo real del gen de referencia; $\Delta\text{CP}_{\text{target}}$ es la desviación en Ct del control menos la muestra del gen en estudio; y $\Delta\text{CP}_{\text{ref}}$ es la desviación en Ct del control menos la muestra del gen de referencia.

Es importante mencionar que la eficiencia de la PCR en tiempo real es la capacidad de la reacción de duplicar el número de copias de las cadenas de ADN o ADNc en cada ciclo.

4.1.7. Verificación del producto amplificado

La verificación del producto amplificado se realizó mediante electroforesis en gel de Agarosa al 2%, con Bromuro de Etidio (BrEt) a una concentración de 10 mg/ml, en tampón de Tris acetato EDTA (TAE) 1X. Se utilizó un marcador de peso molecular para valorar el tamaño de cada amplicón. Las muestras y el marcador de peso molecular correspondiente se dejaron migrar durante 45-60 minutos, a un potencial eléctrico de 90-110 v. El resultado se visualizó y

fotografió en un documentador de geles tipo ChemiDoc XRS de Bio-Rad y con el software Image LabTM 5.1.

5. ESTUDIO DE LA RUTA CANÓNICA WNT/B-CATENINA

Para analizar la implicación de la ruta canónica Wnt/ β -Catenina en el proceso de calcificación y en la diferenciación osteogénica de las CMLV se llevaron a cabo estudios de localización intracelular de β -Catenina mediante microscopía confocal, estudios de expresión proteica de β -Catenina mediante western blot y estudios de análisis de expresión de genes diana de esta ruta por RT-PCR. El diseño experimental que se llevó a cabo fue el que se ha descrito en el apartado 2 (Figura 3).

5.1. MICROSCOPIA CONFOCAL

Esta técnica está basada en técnicas de inmunodetección que emplean la capacidad de reconocimiento de los anticuerpos a sus antígenos. Primero usamos un anticuerpo primario para detectar la proteína de interés, y después un anticuerpo secundario que reconoce al complejo antígeno-anticuerpo primario.

Para llevar a cabo los experimentos de microscopía confocal las CMLV fueron sembradas a una densidad de 80000-100000 células por pocillo en placas especialmente diseñadas para poder llevar a cabo el protocolo de inmunofluorescencia y poder visualizar el resultado por microscopía confocal (Nunc, Rochester, NY, USA). Transcurrido el tiempo del experimento se retiraron los medios de cultivo y las células se lavaron con PBS (3 veces), durante 5

minutos y a temperatura ambiente cada vez. Tras los lavados, las células se fijaron y permeabilizaron con metanol (MERCK, Madrid, España). Primero en metanol al 50% en agua a 4° C durante 2 minutos, luego con metanol al 100% a -20° C durante 20 minutos, y una vez más con metanol al 50% en agua a 4° C durante 2 minutos. Después las células se lavaron con abundante volumen de PBS (3 veces) para retirar cualquier resto de metanol. A continuación las células ya fijadas y permeabilizadas se incubaron a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo primario que reconoce a la proteína de estudio. El anticuerpo se preparó antes en PBS con 1% BSA para evitar uniones inespecíficas.

Después de incubar con el anticuerpo primario las células se lavaron de nuevo con PBS (3 veces). A continuación, se marcaron con un anticuerpo secundario anti-mouse (*AlexaFluor488*) que se dejó incubar con las muestras en oscuridad y durante un tiempo de 2 h a temperatura ambiente. Esta dilución también se realizó en PBS con BSA al 1%. Al terminar, y manteniendo las condiciones de oscuridad, se incubaron las muestras con DAPI (Invitrogen, California, USA) a temperatura ambiente durante 5 minutos para que los núcleos fueran teñidos. Después, las CMLV se lavaron con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente para finalmente montarlas en portas aplicándoles medio de montaje Aqua-Poly/Mount (Polysciences, Inc; Ref 18606). Las muestras fueron guardadas en frío y en oscuridad hasta ser observadas en el microscopio confocal LSM 5 Exciter Carl Zeiss (Munich, Alemania). Las imágenes fueron analizadas con el software libre ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) utilizando el plugin Colocalization finder y teniendo en cuenta el valor de M1 en el Coeficiente de Mander, el cual representa el

porcentaje de píxeles de color verde (correspondiente al marcaje del anticuerpo primario) que colocalizan con píxeles de color azul (DAPI).

Los anticuerpos usados para la inmunodetección de β -Catenina para microscopía confocal son los que se detallan a continuación:

-Anti- β -Catenina (Dilución 1:150, Ref. 610153, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Anticuerpo primario de ratón.

-Anti-mouse AlexaFluor488 (Dilución 1:500, Ref. F0232, DakoCytomation Glostrup, Dinamarca). Anticuerpo secundario.

5.2. WESTERN BLOT.

La identificación y cuantificación de la proteína de interés se realizó mediante Western Blot (WB). Esta técnica está basada en técnicas de inmunodetección que emplean la capacidad de reconocimiento de los anticuerpos a sus antígenos. Llevamos a cabo una inmunodetección indirecta usando un anticuerpo primario, para localizar la proteína de interés, y un anticuerpo secundario que reconoce al primario y localiza los complejos antígeno-anticuerpo. Este anticuerpo secundario se puede marcar de formas muy diversas con el fin de producir una señal.

En primer lugar, la cuantificación de proteína se determinó mediante el **método Bradford** (ver apartado 3.1). Para el WB se utilizaron 10 μ g de extractos nucleares de cada muestra que fueron cargados en geles de poliacrilamida. Tras

correr por electroforesis, las muestras fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa para posteriormente detectar las proteínas de interés mediante anticuerpos específicos.

5.2.1. Electroforesis.

La electroforesis de las proteínas se llevó a cabo en geles de SDS-poliacrilamida al 10% (electroforesis PAGE, del inglés *polyacrilamide gel electrophoresis*) utilizando los geles NuPAGE® Novex® Bis Tris Mini Gels (Invitrogen, CA, EE.UU.).

5.2.2. Preparación de las muestras.

Se mezclaron 10 µg de muestra de proteína con buffer de carga (Invitrogen, CA, EE.UU.), y se incubaron a 70°C durante 10 min para desnaturalizar las proteínas. Después, las muestras se cargaron en el gel de poliácridamida y se cubrieron con *running buffer MES-SDS* (Invitrogen, CA, EE.UU.) al que se le añadió un agente antioxidante (Invitrogen, CA, EE.UU.). La electroforesis se llevó a cabo a 200 V y 90 mA durante aproximadamente, 1h.

5.2.3 Transferencia de proteínas.

La transferencia de proteínas consiste en la inmovilización de las proteínas sobre membranas sintéticas para su detección posterior. Después de separar las proteínas mediante electroforesis se llevó a cabo una transferencia a una membrana de nitrocelulosa del mismo tamaño que el gel de 0,45 µm de poro. Dicha transferencia es posible al aplicar un campo eléctrico perpendicular al gel. Como preparación a la transferencia, los geles se colocaron entre dos trozos de

papel *Whatman (Extra Thick Blot Paper*, Bio-Rad, Munich, Alemania) y sobre la membrana de nitrocelulosa (*Invitrogen*, CA, EE.UU.), previamente incubados en tampón de transferencia (Tris base 50 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.02% y 20% de metanol; Sigma) y después se colocaron en un sistema de transferencia semi-seco (Bio-Rad, Munich, Alemania) 1 hora, a amperaje constante de 230 mA y con un voltaje no superior a 25 V. Después, la tinción con rojo *Ponceau S* al 0,1 % (Sigma) con un 5% de ácido acético durante 5 minutos y a temperatura ambiente nos permitió verificar si la transferencia fue correcta. Seguidamente, mediante lavados con TTBS (Tris 20 mM; Tween 20 al 0.2% (v/v); NaCl 150 mM; a pH=7.5; Sigma) se eliminó el colorante para proceder a continuación con el bloqueo de las membranas.

5.2.4. Bloqueo de la membrana.

Este paso de bloqueo de la membrana es importante para evitar las uniones no específicas de los anticuerpos, eliminando el posible ruido de fondo o los falsos positivos que pudieran aparecer. De esta manera, las membranas fueron bloqueadas durante 2 h a temperatura ambiente con leche al 5% (Bio-Rad, Munich, Alemania) disuelta en TTBS y a un pH de 7,6. Durante estas 2 horas de incubación se mantuvo una agitación suave y constante.

5.2.5. Inmunodetección con anticuerpo primario y secundario.

Tras el bloqueo, la membrana se lavó tres veces con TTBS durante 15 min y después se incubó con el anticuerpo primario específico contra las proteínas de interés y contra **la proteína de expresión constitutiva (TFIIB)** diluido en TTBS.

Dicha incubación duró toda la noche y se llevó a cabo en agitación suave a una temperatura de 4°C.

Después de incubar con el anticuerpo primario, la membrana se lavó tres veces con TTBS durante 15 min. A continuación, para reconocer y detectar el anticuerpo primario, se incubaron las membranas durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación suave con anticuerpos secundarios marcados enzimáticamente. En concreto, se utilizó anti-IgG conjugado con peroxidasa de rábano (HRP; Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1:5000. Tras la incubación la membrana se lavó cinco veces con TTBS de 10 min cada uno.

Los anticuerpos usados para Western Blot en la inmunodetección de β -Catenina son los que se detallan a continuación:

-Policlonal de conejo anti β -Catenina humana 1:1000 (ref. 9562, Cell Signaling, Boston, MA, USA). Anticuerpo primario.

- Policlonal de conejo anti TFIIB humano 1:1000 (ref. 4562, Cell Signaling, Boston, MA, USA). Anticuerpo primario.

-Anti-IgG de conjugado con peroxidasa de rábano 1:5000 (HRP; Santa Cruz Biotechnology). Anticuerpo secundario.

5.2.6. Revelado.

Se utilizaron anticuerpos marcados con peroxidasa de rábano para hacer visible las proteínas reconocidas por los anticuerpos. Dicha enzima cataliza la

oxidación del reactivo luminol en presencia de peróxido de hidrógeno produciendo así una reacción quimioluminiscente susceptible de ser cuantificada.

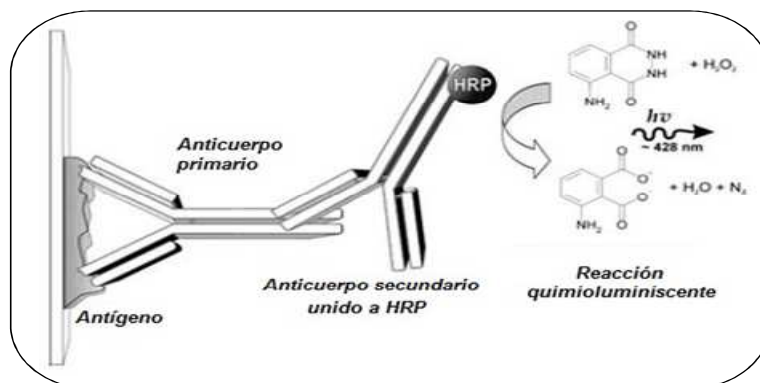


Figura 12. Representación esquematizada de la inmunodetección indirecta de un antígeno y revelado mediante peroxidasa de rábano.

La proteína inmunomarcada se detectó posteriormente mediante el uso del reactivo *ECL plus* (Amersham Bioscience, NJ, EE.UU.) con el cual se incubaron las membranas durante 5 min a temperatura ambiente. Para la visualización de las bandas de casi el total de todos los Western Blot llevados a cabo en este se usó el instrumento LAS4000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suecia).

Los niveles de las proteínas analizadas se cuantificaron usando el programa de análisis de imágenes ImageJ versión 1.44 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Los resultados se expresaron en términos de densidad óptica (DO) relativa y se calcularon mediante la intensidad de la banda correspondiente a la proteína de interés frente a la intensidad de la banda correspondiente a TFIIB y relativizada a la muestra control.

5.3. RT-PCR

La determinación de la expresión de los genes diana de la ruta Wnt/ β -Catenina seleccionados se llevó a cabo mediante la técnica de RT-PCR (ver apartado 4.1).

Los primers utilizados para determinar la expresión de los genes diana seleccionados fueron los siguientes:

GEN	PRIMER DIRECTO O SENTIDO	PRIMER REVERSO O ANTISENTIDO
<i>GAPDH</i>	5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3'	5'-TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT-3'
<i>CyclinD1</i>	5'-CCGAGGAGCTGCTGCAAATGGA-3'	5'-ATGGAGGGCGGATTGAAAATGAAC-3'
<i>VCAN</i>	5'-ATACGTGCAAGAAAGGAACAGTCG-3'	5'-GTCCTTTGGTATGCAGATGGGTTC-3'
<i>AXIN2</i>	5'-TCGCAGGCTAGCTGAGGTGTCGA-3'	5'-CAGTTTCTTTGGCTCTTTGTGATC-3'

6. VALORACION DE LOS CAMBIOS EN EL ESTADO INFLAMATORIO INDUCIDOS POR LOS TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES

Para valorar los cambios en el estado de inflamación inducido por los tratamientos experimentales se hicieron estudios de localización intracelular de NF κ B mediante microscopia confocal, de expresión proteica de NF κ B (p65) por western blot, de expresión génica de marcadores de inflamación mediante RT-

PCR y se determinó la expresión proteica de marcadores de inflamación por Bio-Plex y citometría de flujo. El diseño experimental que se llevó a cabo se ha descrito en el apartado 2 de material y métodos (Figura 4).

6.1. Microscopía Confocal.

La localización intracelular de NF κ B por microscopía confocal se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo previamente descrito (ver apartado 5.1).

Los anticuerpos usados para la localización de NF κ B fueron los siguientes:

-Anti-p65/NF κ B (Dilución 1:250, Referencia sc-8008, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Anticuerpo primario de ratón.

-Anti-mouse AlexaFluor488 (Dilución 1:500, Ref. A-21204, InvitrogenTM). Anticuerpo

6.2. WESTERN BLOT

La cuantificación de NF κ B en la fracción proteica nuclear mediante western blot se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo previamente descrito (ver apartado 5.2).

Los anticuerpos usados fueron los siguientes:

- Policlonal de conejo anti NF κ B p65 (C-20) humano 1:500 (ref. sc-372, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Anticuerpo primario.

- *Policlonal de conejo anti TFIIB humano 1:1000 (ref. 4562, Cell Signaling, Boston, MA, USA)*. Anticuerpo primario.

-*Anti-IgG de conjugado con peroxidasa de rábano 1:5000 (HRP; Santa Cruz Biotechnology)*. Anticuerpo secundario.

6.3 RT-PCR

La determinación de la expresión génica de los marcadores inflamatorios seleccionados se llevó a cabo mediante la técnica de RT-PCR (ver apartado 4.1).

Los primers utilizados para determinar la expresión de los marcadores seleccionados fueron los siguientes:

GEN	PRIMER DIRECTO O SENTIDO	PRIMER REVERSO O ANTISENTIDO
<i>GAPDH</i>	5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3'	5'-TCCTTGAGGCCATGTGGGCCAT-3'
<i>ICAM-1</i>	5'-GGGGAACCAGAGCCAGGAGACACT-3'	5'-TGGGCCTCACACTTCACTGTCACC-3'
<i>Interleuquina-1β</i>	5'-CAGGATATGGAGCAACAAGTGGTG-3'	5'-GGGTAATTTTTGGGATCTACACTC-3'
<i>Interleuquina-6</i>	5'-GCCCCACACAGACAGCCACTCACC-3'	5'-TGCCTCTTTGCTGCTTTCACACAT-3'
<i>Interleuquina-8</i>	5'-GGTGCAGAGGGTTGTGGAGAAGTT-3'	5'-CATGAAGTGTGAAGTAGATTTGC-3'
<i>TNF-alpha</i>	5'-CTTGTCCTCAGCCTCTTCTCCTCC-3'	5'-AAGATGATCTGACTGCCTGGGCCAG-3'

6.5 DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS INFLAMATORIAS POR BIO-PLEX

Una vez transcurrido el tiempo de experimentación, los sobrenadantes de los medio de cultivo fueron recogidos para determinar la secreción de citoquinas inflamatorias inducida por cada uno de los tratamientos de estudio. La concentración de citoquinas se midió mediante el kit Bio-Plex Pro Human Cytokine 4-Plex (Ref. M50000000CC, Exp Hu Cyto Grp1 4-PLEX, 1x96, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) de acuerdo a las instrucciones de uso del producto.

El principio del ensayo de Bio-Plex es similar al ELISA: la unión covalente de los anticuerpos de captura con microesferas magnéticas permiten que sean inmovilizados después de ser incubados con las muestras que contienen los marcadores de interés. A continuación se agregan los anticuerpos biotinilados para crear un complejo sándwich (ver figura 6). El sándwich es detectado finalmente por la adición de ficoeritrina-streptavidina (SA-PE) conjugada. La ficoeritrina sirve como reportero fluorescente.

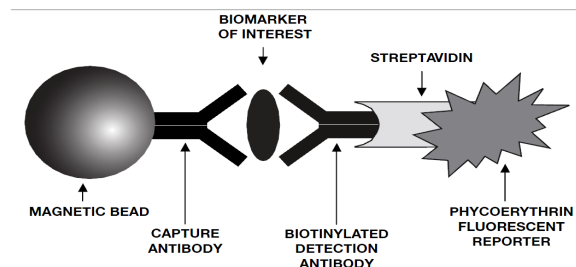


Figura 13. Principio del ensayo de Bio-plex: complejo sándwich de anticuerpos bio-marcados con microesferas.

Los resultados fueron analizados mediante un Bio-Plex® 200 system.

Las citoquinas de interés medidas por medio de este kit fueron: *Interleuquina-1 beta (IL-1b)*, *Interleuquina 6 (IL-6)*, *Interleuquina 8 (IL-8)* y el *Factor de Necrosis Tumoral alpha (TNFa)*.

6.5. Citometría de flujo

La determinación de los niveles de ICAM-1 se llevó a cabo empleando un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA), con el que se realizó una citometría convencional para la detección de células marcadas con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Protocolo de marcaje: Los tratamientos de los cultivos de CMLV fueron retirados y posteriormente las células fueron lavadas dos veces con suero fisiológico para retirar las trazas de suero y medio DMEM. Más tarde se añadieron 300 µl de tripsina a cada pocillo con una incubación de 5 minutos a 37°C y un 5% de CO₂. Después de este tiempo se añadió a cada pocillo 1 ml de medio de cultivo para inhibir el efecto de la tripsina. Seguidamente, las células se pipetearon varias veces y se recogieron para ser centrifugadas a 300 g durante 10 minutos a 4°C. A continuación, para lavar las células, se resuspendieron en suero fisiológico y se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos, este paso se repitió una vez más. Después de centrifugarlas se resuspendieron en 200-300 µl y se incubaron en hielo durante 30 minutos con un anticuerpo anti-CD54 (ICAM-1) humano marcado con FITC (Ref. MHCD5401-4, Invitrogen, USA). Posteriormente, las células se lavaron con suero fisiológico para retirar el exceso

de anticuerpo y se centrifugaron de nuevo a 300 g durante 10 minutos a 4° C. Descartamos el sobrenadante, y el precipitado se resuspendió en 200-300 µl de suero fisiológico.

Adquisición y análisis: Se adquirieron 10⁴ células y el análisis se realizó con el programa CellQuest (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) excluyendo el ruido de fondo o background celular. El porcentaje de células positivas se calculó tras eliminar la fluorescencia emitida por la muestra marcada con el isotipo control.

7. PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROs).

La producción de EROs se determinó por fluorescencia en CMLV sembradas en placas blancas de 96 pocillos con fondo transparente (ref. 655087, Greiner Bio-One). Las CMLV diluidas en medio normal DMEM fueron sembradas 48 horas antes a una densidad aproximada de 25.000 células/cm² y se incubaron durante 48 horas antes del comienzo del experimento. El diseño experimental que se llevó a cabo fue el descrito en el apartado 2 (Figura 5). Una vez finalizado el experimento, se procedió al protocolo de determinación de especies reactivas de oxígeno como se detalla a continuación.

7.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA LA DETERMINACIÓN DE EROS

Una vez finalizado el periodo de experimentación, se procedió a retirar los medios de cultivo y a lavar 2 veces con 200 μ l de DMEM sin FBS, sin glutamina y sin piruvato sódico. Después de retirar el segundo lavado se añadió la sonda diluida en DMEM sin FBS, sin glutamina y sin piruvato sódico destinada a medir especies reactivas de oxígeno y fue incubada durante 30 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo se retiraron las sondas y las células fueron lavadas con 200 μ l de solución salina. A continuación, las células se lavaron con 200 μ l de medio Hanks Balanced Salt Solution (HBSS). Finalmente se retiró el último lavado con HBSS para añadir 100 μ l de medio HBSS con un 2 % de FBS. En este último paso permanecieron las células hasta el momento de medir la fluorescencia.

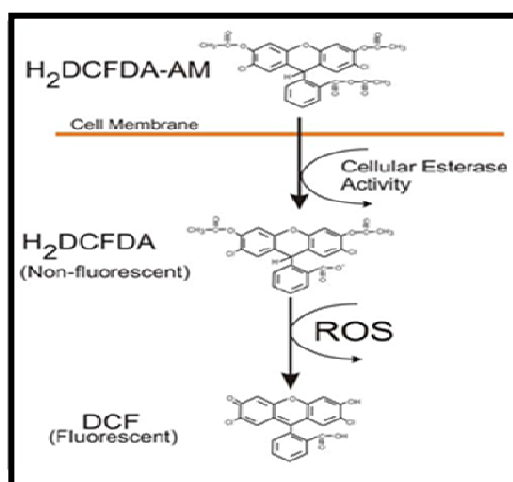


Figura 14. Representación esquematizada de la reactividad de la sonda H₂DCFDA con especies reactivas de oxígeno.

La sonda utilizada para la medición de especies reactivas de oxígeno fue el diacetato de 2', 7'-dihidro-dicloro-fluoresceína (H2DCFDA, D-399, Lifetechnologies) a una concentración de 10 μ M. Esta sonda se torna fluorescente en presencia de distintas especies reactivas de oxígeno (anión peroxinitrito y radicales hidroxilos y peroxilos).

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El estudio estadístico de los datos obtenidos en este trabajo se realizó con el programa informático SPSS versión 15.0. (Microsoft Corporation, EE.UU).

Los datos fueron expresados como la media y el error estándar de la media. Para la comparación entre medias de tres o más grupo se usó un test de varianza (ANOVA) y si mostraba diferencias estadísticamente significativas, posteriormente se aplicaba un test post-hoc Duncan para determinar diferencias entre grupos. Para comparar medias entre dos grupos diferentes, se utilizó la prueba t de Student. Se consideraron significativos aquellos valores de $P < 0,05$.

9. REDACCIÓN Y PRESENTACIÓN GRÁFICA.

La redacción de este trabajo ha sido elaborada con el software Microsoft Office Word versión 2007 (Microsoft Corporation, USA). La elaboración de las gráficas se ha llevado a cabo con el software Graph Pad Prism 6. Todo mediante el sistema operativo Microsoft Windows XP Vista® business (Microsoft Corporation, USA).

RESULTADOS

1. EFECTO DIFERENCIAL DEL CALCITRIOL Y DEL PARICALCITOL SOBRE LA CALCIFICACIÓN INDUCIDA POR NIVELES ELEVADOS DE FOSFATO EN CELULAS DE MUSCULO LISO VASCULAR (CMLV).

Células del músculo liso vascular (CMLV) fueron cultivadas en un medio con fosfato alto (3,3 mM, PO). Tras 9 días de cultivo se indujo calcificación (deposición de Ca) respecto a células control (0,9 mM de fosfato) ($2.87 \pm 0,27$ vs $0.33 \pm 0,04$; $P < 0.05$).

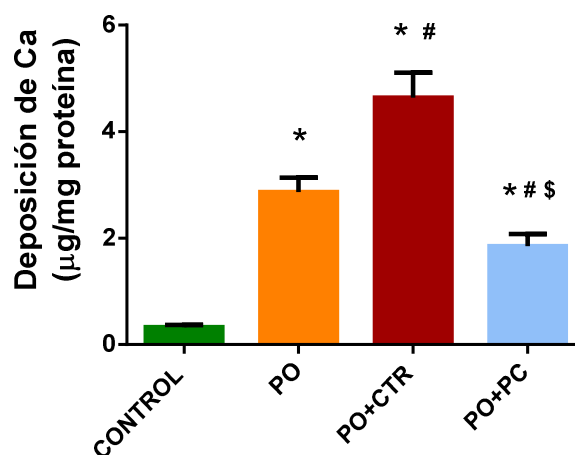


Figura 1. Efecto del calcitriol y del paricalcitol sobre la calcificación inducida por niveles elevados de fosfato en CMLV. CMLV fueron cultivadas durante 9 días con una concentración alta de fosfato (3,3 mM, PO) solo o suplementado con calcitriol (10^{-8} M, PO+CTR) o paricalcitol (3×10^{-8} M, PO+PC). Células incubadas con DMEM (0,9 mM de fosfato) fueron usadas como control. El calcio se determinó mediante espectrofotometría utilizando como colorante la fenolsulfoneftaleina. Los datos son representados como la media y el error estándar de la media (SEM) ($n=6$ /grupo, 5 experimentos, * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs PO; \$ $P < 0,05$ vs PO+CTR).

La adición de calcitriol (10^{-8} M, CTR) a un medio con PO (PO+CTR) produjo un aumento adicional de la calcificación respecto al tratamiento con fosfato solo ($4,64 \pm 0,47$ vs $2,87 \pm 0,27$; $P < 0.05$). Por el contrario, en células

cultivadas con PO y suplementadas con paricalcitol ($3 \times 10^{-8} \text{M}$, PO+PC) la calcificación fue significativamente más baja que en las células cultivadas únicamente con PO ($1,85 \pm 0,23$ vs $2,87 \pm 0,27$, $P < 0,05$), aunque significativamente mayor que en las células control (Figura 1) ($1,85 \pm 0,23$ vs $0,33 \pm 0,04$, $P < 0,05$).

2. EFECTO DEL CALCITRIOL Y DEL PARICALCITOL SOBRE LA EXPRESION DE MARCADORES DE DIFERENCIACION OSTEOGÉNICA DURANTE LA CALCIFICACION.

Uno de los objetivos de este estudio fue evaluar la influencia que ejercen el CTR y el PC sobre la diferenciación osteogénica experimentada por las CMLV cuando son cultivadas “*in vitro*” en un medio con PO. Para ello, se cuantificó la expresión génica de varios marcadores osteogénicos (BMP2, Runx2, Msx2 y Osteocalcina) mediante RT-PCR a tiempo real.

Como puede apreciarse en la Figura 2, la expresión génica de BMP2, Runx2 y Msx2 fue significativamente más alta en células tratadas con PO que en células control, aunque no se apreció diferencia significativa en la expresión de Osteocalcina (OC).

Al añadir CTR se produjo un aumento adicional y significativo en la expresión de BMP2, Runx2 y Msx2 respecto al observado con PO e indujo un aumento significativo en la expresión de osteocalcina. Por el contrario, la adición de PC no produjo un aumento en la expresión de Runx2, Msx2 y OC más allá del

producido por niveles elevados de fosfato y redujo la expresión de BMP2 a niveles similares a los del grupo control.

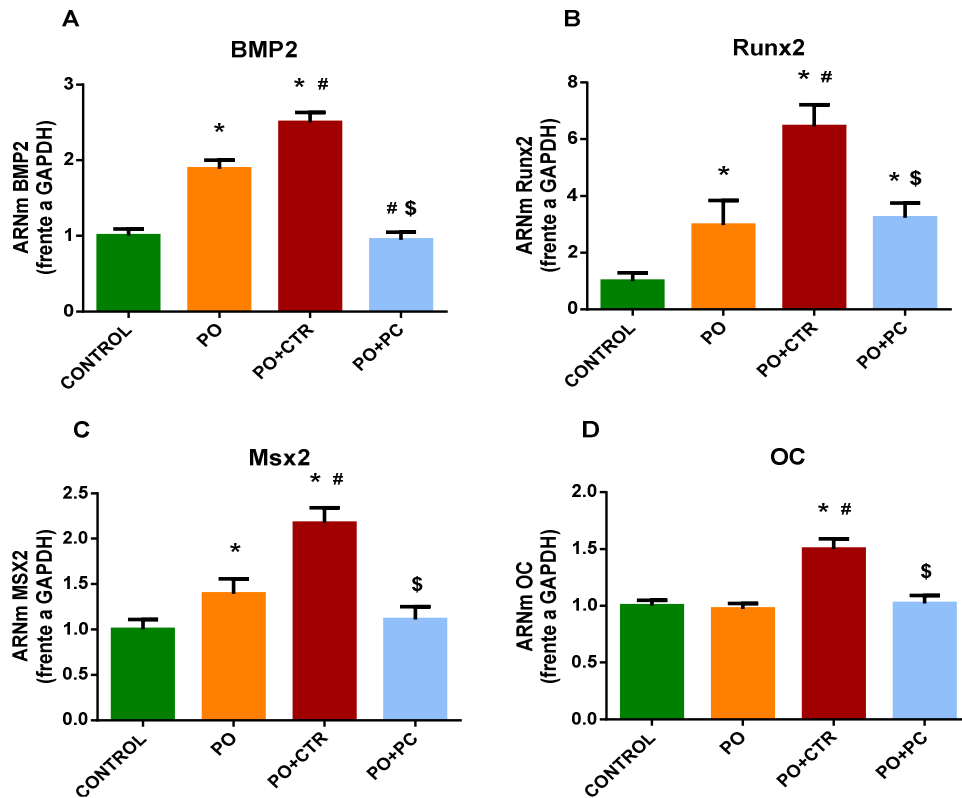


Figura 2. Efecto del calcitriol y del paricalcitol sobre la expresión génica de marcadores de fenotipo osteoblástico durante la calcificación de CMLV inducida por PO. CMLV fueron cultivadas durante 9 días con una concentración alta de fosfato (3,3 mM, PO) solo o suplementado con CTR (10^{-8} M, PO+CTR) o PC (3×10^{-8} M, PO+PC). Células incubadas con DMEM (0,9 mM fosfato) fueron usadas como control. Los niveles de ARNm fueron determinados mediante RT-PCR cuantitativa relativa. La expresión de los genes diana fue normalizada frente a la expresión de GAPDH. **A:** Expresión génica de BMP2. **B:** Expresión génica de Runx2. **C:** Expresión génica de Msx2. **D:** Expresión génica de Osteocalcina/BGLAP. Los datos son representados como la media y el error estándar de la media (SEM) ($n=6$ /grupo, 3 experimentos, * $P<0,05$ vs control; # $P<0,05$ vs PO; \$ $P<0,05$ vs PO+CTR).

3. IMPLICACIÓN DE LA RUTA CANÓNICA WNT/BETA-CATENINA EN LA TRANSDIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE LAS CMLV DURANTE EL PROCESO DE CALCIFICACIÓN. EFECTO DIFERENCIAL DEL CALCITRIOL Y PARICALCITOL.

Diversos estudios describen la participación de la ruta Wnt/ β -Catenina en la regulación osteogénica durante el desarrollo de la calcificación vascular (424)(3)(425).

La activación de la ruta Wnt/ β -Catenina lleva implícita la translocación al núcleo del factor de transcripción β -Catenina. El objetivo de este estudio fue evaluar la implicación de la ruta canónica Wnt/ β -Catenina en el proceso de calcificación inducida por PO en CMLV cultivadas “*in vitro*”, así como determinar efecto del CTR y del PC sobre la activación de dicha ruta.

3.1. Niveles de β -Catenina nuclear

Como puede apreciarse en el Western blot de la Figura 3, las CMLV tratadas con PO poseen una cantidad de β -Catenina nuclear significativamente mayor que las células control ($135\% \pm 6,10$ vs $98\% \pm 5,63$; $P < 0,05$). Asimismo, cuando las células fueron tratadas con PO+CTR el nivel de β -Catenina nuclear aumentó de manera significativa respecto a las células tratadas únicamente con PO ($168\% \pm 8,92$ vs $135\% \pm 6,10$; $P < 0,05$). Sin embargo, la adición de PC al medio con PO produjo una reducción significativa en los niveles de β -Catenina en el núcleo de la célula respecto al grupo PO ($P < 0,05$), alcanzando niveles similares a los observados en las células control ($95,31\% \pm 6,57$ vs $98,14 \pm 5,63$).

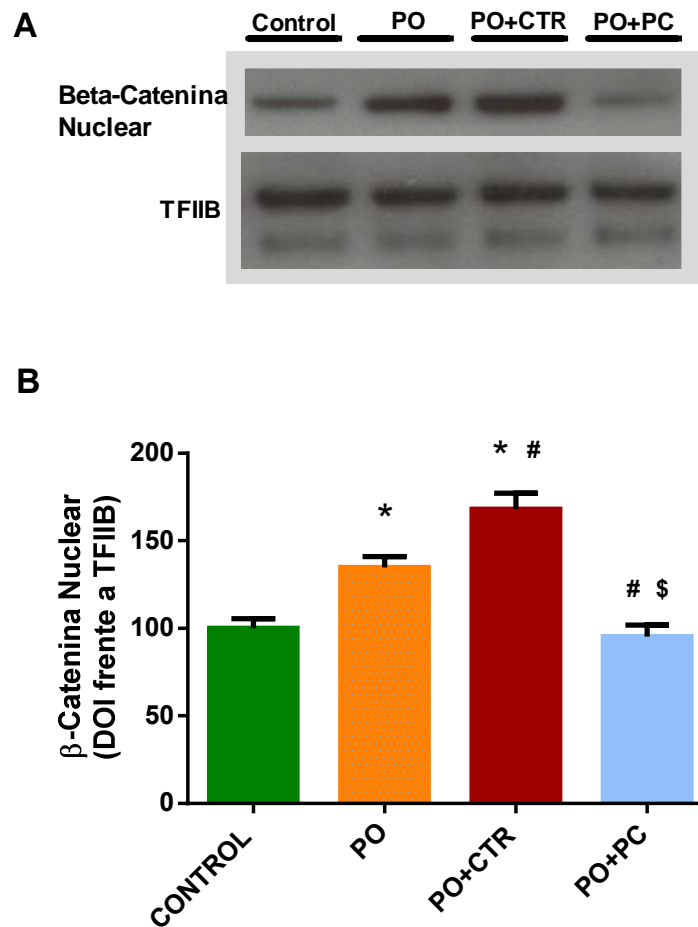


Figura 3. Efecto del calcitriol y del paricalcitol sobre la ruta canónica Wnt/ β -Catenina durante la calcificación de CMLV. CMLV fueron incubadas durante 24 horas en un medio sólo con fosfato (3,3 mM; PO), suplementado con CTR (10^{-8} M; PO+CTR) o suplementado con PC (3×10^{-8} M; PO+PC). Células incubadas en DMEM (0,9 mM fosfato) fueron usadas como control. **A:** Los Niveles de β -Catenina fueron evaluados mediante western blot de extractos nucleares. La imagen es representativa de 3 experimentos independientes. **B:** Cuantificación de la densidad óptica integrada (DOI) normalizada con TFIIB. Los datos son representados como la media y el error estándar de la media (SEM) de 3 experimentos independientes (n=3/grupo, 3 experimentos independientes, * $P < 0,05$ vs control; # $P < 0,05$ vs PO; \$ $P < 0,05$ vs PO+CTR).

La localización intracelular de β -Catenina fue determinada mediante Microscopía Confocal de fluorescencia (Figura 4)

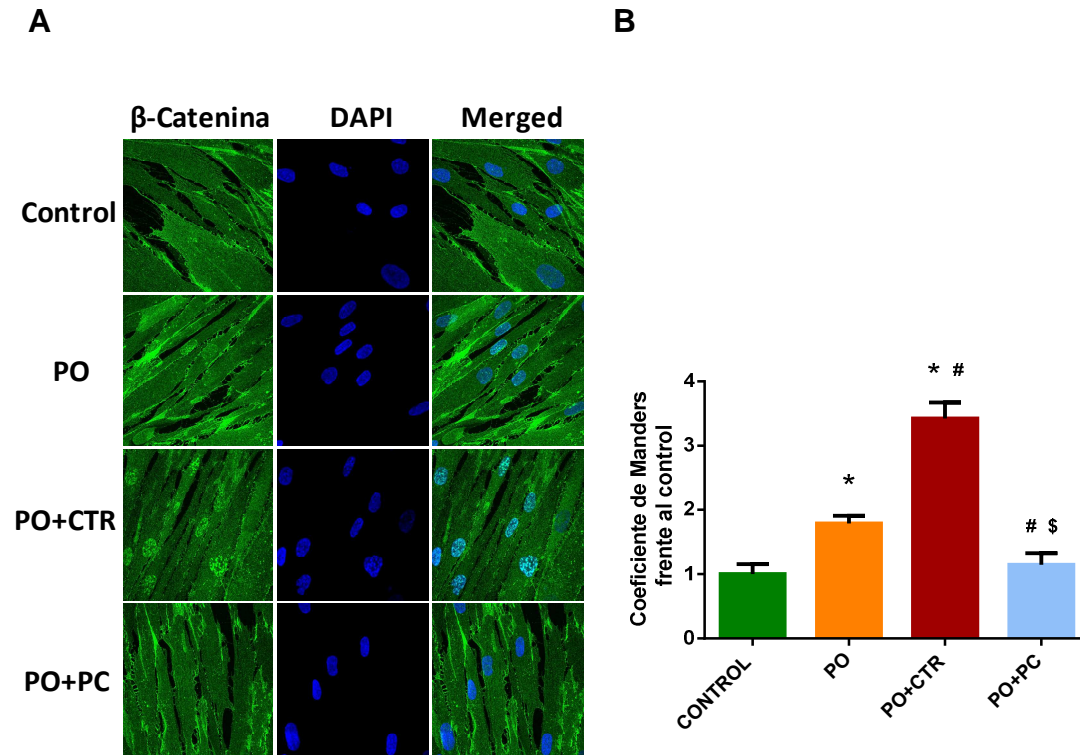


Figura 4. Efecto del fosfato, del calcitriol y del paricalcitol sobre la localización intracelular de β -Catenina. CMLV fueron incubadas durante 24 horas en un medio con fosfato solo (3,3 mM; PO) o suplementado con CTR (10^{-8} M; PO+CTR) o PC (3×10^{-8} M; PO+PC). Células incubadas con fosfato 0,9 mM fueron usadas como control. **A)** Detección mediante microscopía confocal de fluorescencia. Imágenes representativas de tres experimentos independientes. **B)** Cuantificación mediante el coeficiente de Manders (M1 plugin Verde vs DAPI) del marcaje por fluorescencia de β -Catenina nuclear (3 experimentos, * $P < 0,05$ vs Control; # $P < 0,05$ vs PO; \$ $P < 0,05$ vs PO+CTR).

Las células control mostraron inmunofluorescencia sólo en el citoplasma mientras que las células incubadas sólo con PO o con PO+CTR mostraron una localización marcada de β -Catenina en el núcleo. Sin embargo, en las células incubadas con PO+PC la expresión y localización de β -Catenina estuvo principalmente limitada al citoplasma.

3.2. Efecto del fosfato, calcitriol y paricalcitol sobre la expresión de genes diana de la Ruta Wnt/ β -Catenina.

Después de comprobar cómo los tratamientos de estudio modulaban la translocación nuclear de β -Catenina, se procedió a determinar la expresión génica de algunos genes diana de la ruta canónica Wnt/ β -Catenina. Para ello seleccionamos los siguientes genes diana de la ruta Wnt/ β -Catenina: Versican (VCAN), Ciclina D1 y Axina 2.

Como puede apreciarse en la Figura 5, la expresión génica de los genes diana analizados fue significativamente más alta en CMLV tratadas con PO y en las células tratadas con PO+CTR que en las células del grupo control. Por otro lado, en las células tratadas con PO+PC la expresión de los genes analizados fue menor respecto al grupo tratado con PO, siendo significativa la diferencia en el caso de la Ciclina D1. Asimismo, no existen diferencias significativas en la expresión de Axina 2 entre el grupo de células control y las células tratadas con PO+PC.

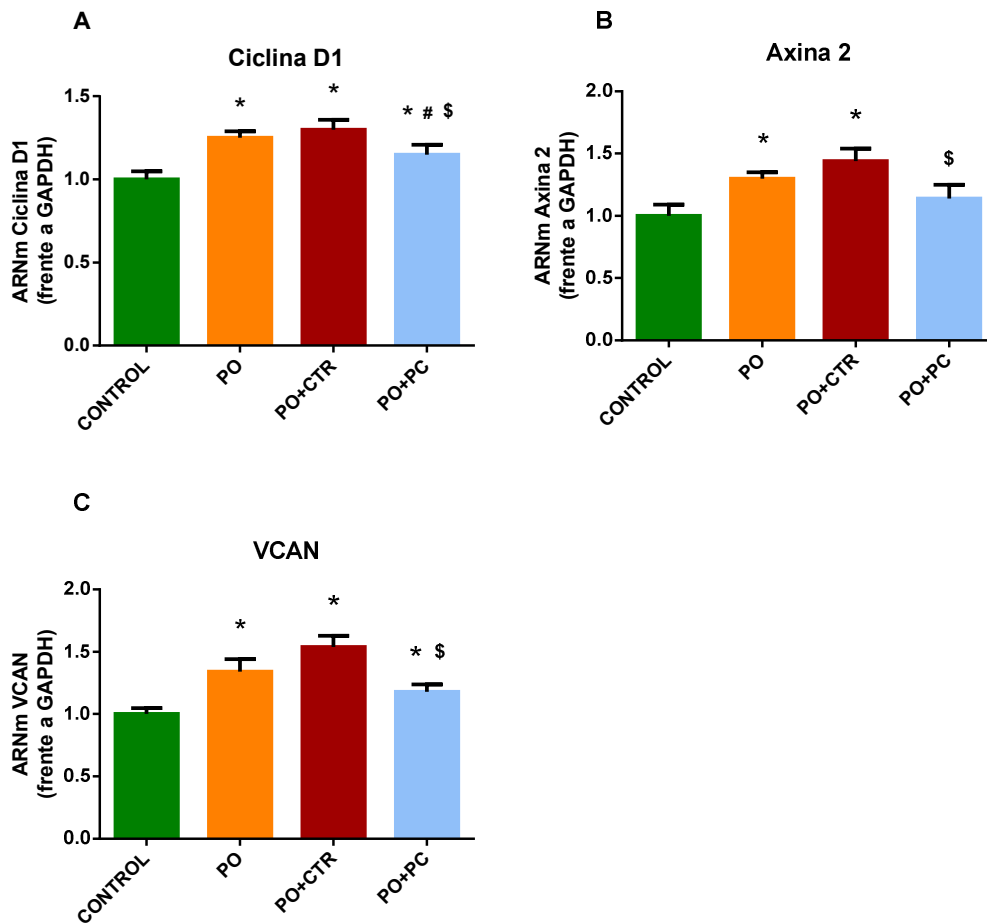


Figura 5. Efecto del fosfato, del calcitriol y del paricalcitol sobre la expresión de genes diana de la ruta canónica Wnt/ β -Catenina (Ciclina D1, Axina2 y VCAN/versican). CMLV fueron incubadas durante 24 horas con fosfato (3,3 mM, PO) solo o suplementado con calcitriol (10^{-8} M, PO+CTR), o paricalcitol (3×10^{-8} M, PO+PC). Células incubadas con DMEM (0,9 mM de fosfato) fueron usadas como control. La expresión de los genes diana fue normalizada con la expresión de GAPDH. Los datos son representados como la media y el error estándar de la media (SEM) de 3 experimentos independientes (n=6/grupo, 3 experimentos, *P<0,05 vs Control; # P<0,05 vs PO; \$ P<0,05 vs PO+CTR).

3.3. Efecto de la inhibición de la ruta Wnt/ β -Catenina sobre los procesos de transdiferenciación y la calcificación en CMLV.

Para continuar valorando el papel que desempeña la activación de la ruta canónica Wnt/ β -Catenina sobre la calcificación y sobre la transdiferenciación de las CMLV hacia células de linaje osteogénico se añadió Dkk-1 (Dickkopf-related protein 1), un inhibidor específico de la ruta canónica Wnt/ β -Catenina.

3.3.1. Efecto de la inhibición de la ruta Wnt/ β -Catenina con Dkk-1 sobre la translocación nuclear de β -Catenina.

Como indican las figuras 6 y 7, cuando las CMLV son tratadas durante 24 horas con Dkk-1 (100 ng/ml; PO+Dkk-1 y PO+CTR+Dkk1) se produce un descenso significativo en la translocación nuclear de β -Catenina respecto a los mismos tratamientos sin Dkk-1. Es decir, la incubación con Dkk-1 inhibe la translocación nuclear de β -Catenina inducida por niveles elevados de fosfato y potenciada por el CTR. Sin embargo, no hay diferencias significativas en la translocación nuclear de β -Catenina entre las células tratadas con PO+PC y las células tratadas con PO+PC+Dkk-1.

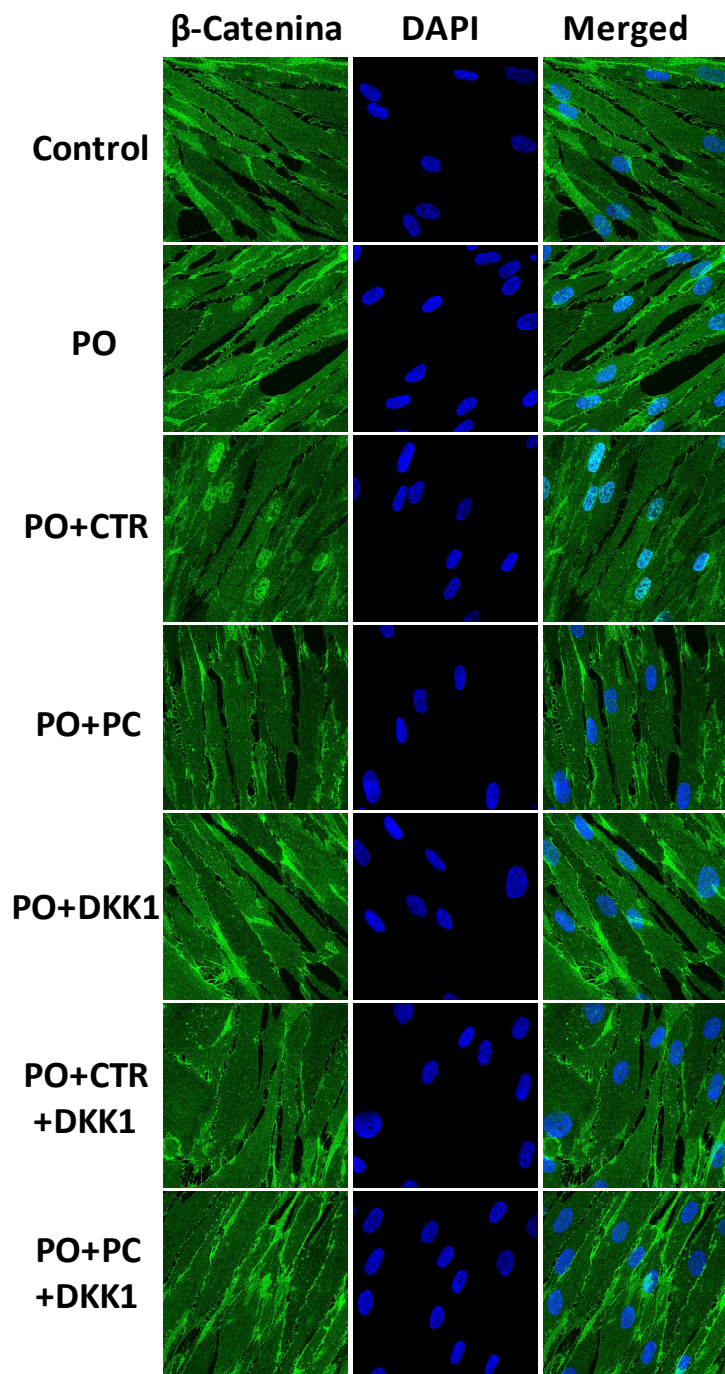


Figura 6. Efecto del Dkk-1, inhibidor de la ruta canónica Wnt/ β -Catenina, sobre la translocación de β -catenina al núcleo de la célula. CMLV fueron incubadas durante 24 horas en un medio con fosfato (3,3 mM; PO) solo o suplementado con calcitriol (10^{-8} M, PO+CTR), paricalcitol (3×10^{-8} , PO+PC), Dkk-1 (100 ng/ml, PO+DKK-1), calcitriol y Dkk-1 (PO+CTR+DKK-1) o paricalcitol y Dkk-1 (PO+PC+DKK-1). Células incubadas en DMEM (0,9 mM de fosfato) fueron usadas como control. La localización intracelular de β -Catenina fue visualizada mediante inmunofluorescencia con microscopía confocal. Para cada tratamiento el marcaje de β -Catenina (verde) es mostrado en la columna de la izquierda; en la columna central aparece la tinción de los núcleos mediante marcaje fluorescente con DAPI (azul); en la columna de la derecha se representa la composición de ambas imágenes (merged). Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes.

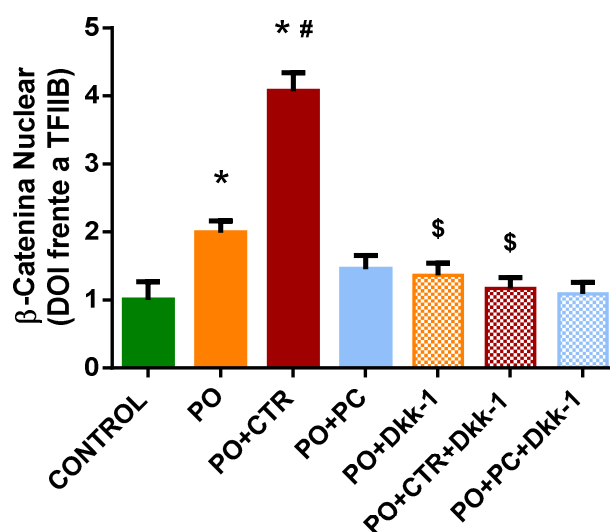


Figura 7. Cuantificación mediante el coeficiente de Manders (M1 plugin Verde vs DAPI) del marcaje por fluorescencia de β -Catenina nuclear. Los datos son representados como la media y el error estándar de la media (SEM) de 3 experimentos independientes, * $P < 0,05$ vs Control; # $P < 0,05$ vs PO; \$ $P < 0,05$ vs el mismo tratamiento sin Dkk-1).

3.3.2 Efecto de la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina mediante Dkk-1 sobre la expresión de genes diana de dicha ruta.

Como puede apreciarse en la Figura 8, la adición de Dkk-1 a las células tratadas con PO y con PO+CTR (PO+ Dkk-1 y PO+CTR+ Dkk-1) redujo de manera drástica la expresión de los genes diana analizados (Ciclina D1, VCAN y Axina2) respecto a los tratamientos sin Dkk-1, llegando a alcanzar niveles similares a los del grupo control. En el grupo PO+PC la adición de Dkk-1 no indujo un descenso adicional en la expresión génica de VCAN y Axina 2, aunque sí en la de Ciclina D1.

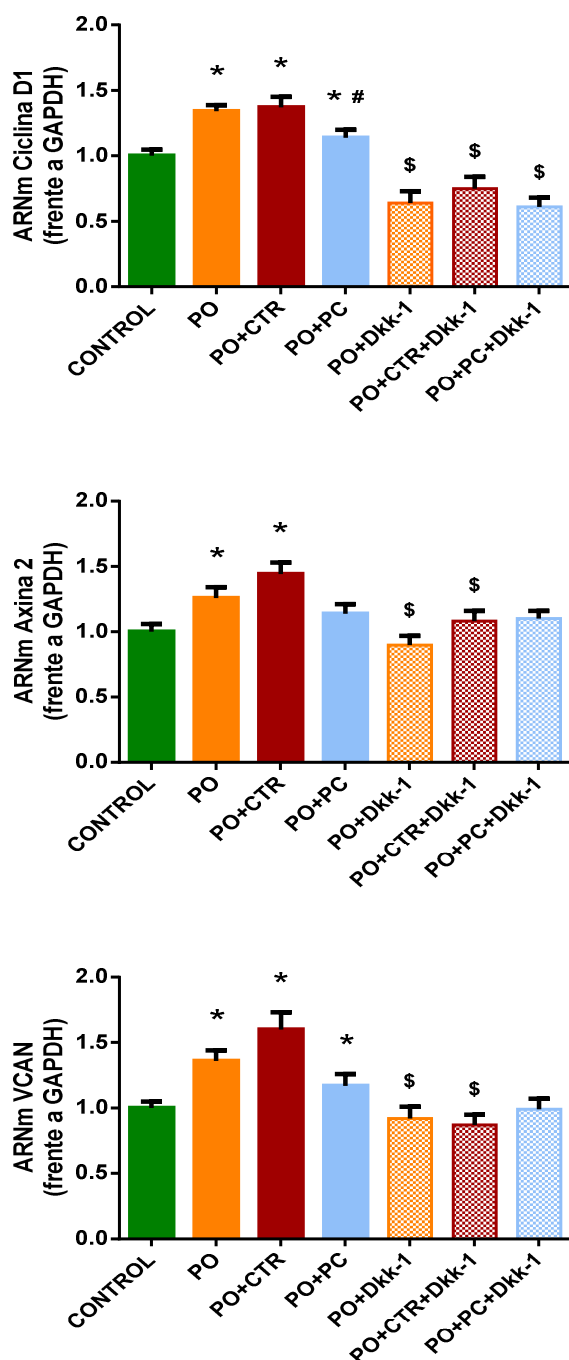


Figura 8. Efecto de la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina por Dkk 1, sobre la expresión de genes diana del factor de transcripción β -Catenina (Ciclina D1, Axina2 y VCAN/versican). CMLV fueron incubadas durante 24 horas a una concentración de 3,3 mM de fosfato solo o suplementado con calcitriol (10^{-8} M; PO+CTR), paricalcitol (3×10^{-8} M; PO+PC), Dkk-1 (100 ng/ml; PO+Dkk1), calcitriol y Dkk-1 (PO+CTR+Dkk1) o paricalcitol y Dkk-1 (PO+PC+Dkk1). Células incubadas en DMEM (0,9 mM de fosfato) fueron usadas como control. La expresión de los genes diana fue normalizada con la expresión de GAPDH. Los datos son representados como la media y el error estándar de la media (SEM) de 3 experimentos independientes (n=6/grupo, 3 experimentos independientes, * P<0,05 vs Control; # P<0,05 vs PO; \$<0,05 vs el mismo tratamiento sin Dkk-1).

3.3.3. Efecto de la inhibición de la vía Wnt/ β -Catenina mediante Dkk-1 sobre la calcificación en CMLV.

CMLV tratadas con PO+Dkk-1 presentaron niveles de calcificación significativamente más bajos que las células tratadas sólo con PO ($1,91 \pm 0,1$ vs $2,77 \pm 0,09$, $P < 0,05$). Asimismo, CMLV tratadas con PO+CTR+Dkk-1 mostraron una calcificación significativamente menor que las células tratadas sólo con PO+CTR ($2,50 \pm 0,10$ vs $4,12 \pm 0,13$, $P < 0,05$). Es decir, la inhibición de la ruta Wnt/ β -Catenina con Dkk-1 redujo el nivel de calcificación inducida por PO y previno del aumento en la calcificación inducida por CTR. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre el grupo PO+PC+Dkk-1 y el mismo tratamiento sin Dkk-1.

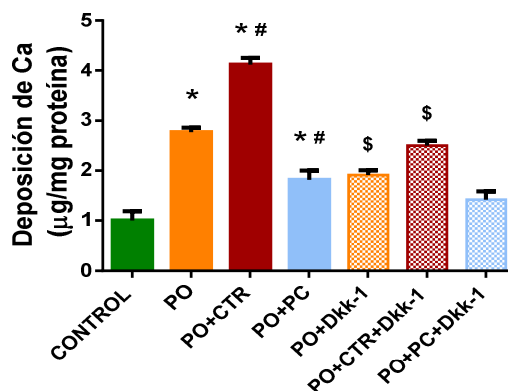


Figura 9. Efecto de la inhibición de la vía Wnt/ β -Catenina mediante Dkk-1 sobre la calcificación de CMLV. Durante 9 días CMLV fueron incubadas con fosfato alto solo (3,3 mM, PO) o suplementado con calcitriol (10^{-8} M, PO+CTR), paricalcitol (3×10^{-8} M, PO+PC), Dkk-1 (100 ng/ml, PO+DKK-1), calcitriol y Dkk-1 (PO+CTR+DKK-1) o paricalcitol y Dkk-1 (PO+PC+DKK-1). Células incubadas en DMEM (fosfato 0,9 mM) fueron usadas como control. El calcio se determinó mediante espectrofotometría utilizando la fenolsulfoneftaleina como colorante. Los datos se representan como la media y el error estándar de la media (SEM) de 3 experimentos independientes ($n=6$ /grupo, 3 experimentos, * $P < 0,05$ vs Control; # $P < 0,05$ vs PO; \$ $P < 0,05$ vs el mismo tratamiento sin DKK1).

4. EFECTO DEL FOSFATO, DEL CALCITRIOL Y DEL PARICALCITOL SOBRE LA INFLAMACIÓN EN CMLV.

Una vez descrito el efecto estimulante que el PO ejerce sobre el desarrollo de calcificaciones, sobre la diferenciación osteogénica y sobre la activación de la ruta canónica Wnt/ β -Catenina en CMLV, se procedió a valorar si también actúa como un elemento de carácter proinflamatorio. Además, al igual que el calcitriol y el paricalcitol ejercían efectos netamente opuestos sobre la calcificación, la diferenciación osteogénica y la activación de la ruta canónica Wnt/ β -Catenina, quisimos evaluar si ambos análogos de la vitamina D ejercen o no el mismo efecto desde el punto de vista inflamatorio.

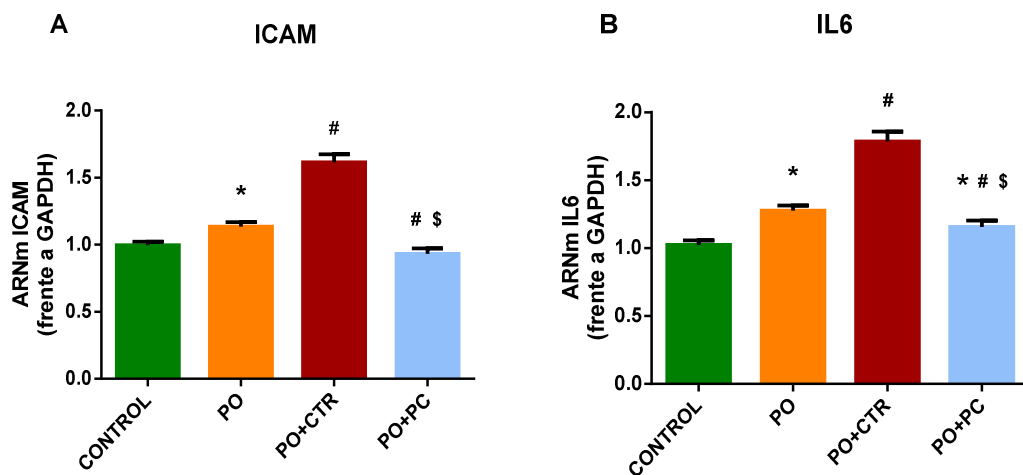
4.1. Efecto de niveles elevados de fosfato sobre la expresión génica de citoquinas inflamatorias en células del músculo liso vascular. Modulación diferencial por calcitriol y paricalcitol.

Al valorar la expresión génica de varios marcadores de inflamación, como son la Molécula de Adhesión Intercelular 1 (ICAM-1) y las citoquinas inflamatorias Interleuquina-1 Beta (IL-1 β), Interleuquina-6 (IL-6), Interleuquina-8 (IL-8) y Factor de Necrosis Tumoral Alpha (TNF α), se observó que las CMLV cultivadas con una concentración alta de fosfato (3,3 mM) presentaban una expresión génica significativamente más alta que en las células del grupo control (aumento del 14% en la expresión de ICAM, un 32% en IL-1 β , un 25% en IL-6, un 48% en IL-8 y un 27% en TNF α).

Al añadir CTR, además de potenciar el desarrollo de calcificaciones como vimos previamente, se pudo comprobar que se producía un incremento adicional y

significativo de la expresión de ICAM-1, IL-6 y TNF α respecto a las células cultivadas en un medio sólo con PO. Sin embargo, los niveles de expresión de IL-1 β y de IL-8 disminuyeron de manera significativa respecto a las células tratadas sólo con PO, alcanzando en ambos casos valores similares a los de las células control.

Por otro lado, el PC produjo un efecto inmunomodulador frente al estado de inflamación inducido en las CMLV cultivadas con PO. Al igual que el PC disminuía el desarrollo de calcificaciones, cuando dicho análogo de la vitamina D fue añadido a las células tratadas con PO la expresión de citoquinas disminuyó de manera significativa respecto de las células tratadas únicamente con PO.



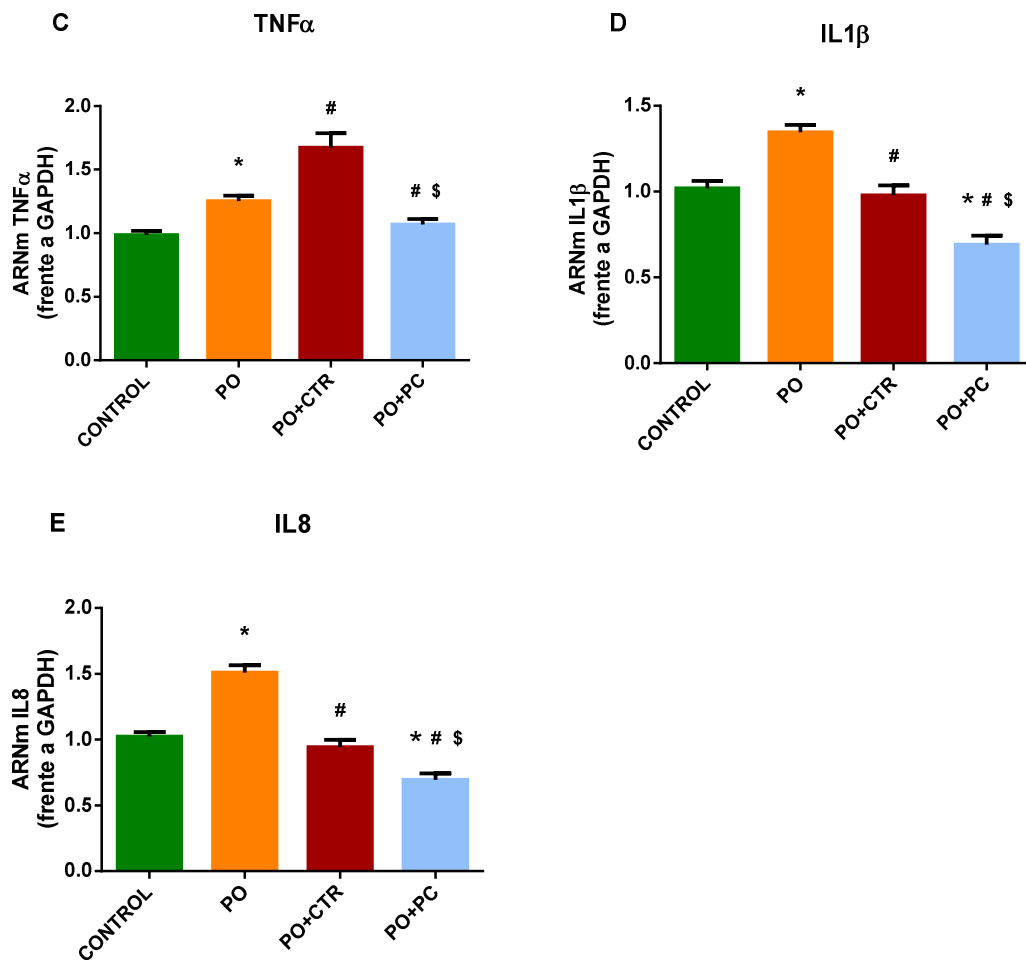


Figura 10. Efecto del fosfato, del calcitriol y del paricalcitol sobre la expresión génica de citoquinas en CMLV. CMLV fueron incubadas durante 9 días con fosfato (3,3 mM, PO) solo o suplementado con calcitriol (10^{-8} M, PO+CTR), o paricalcitol (3×10^{-8} M, PO+PC). Células control fueron incubadas con niveles normales de fosfato (0,9mM). La expresión génica de citoquinas se determinó mediante RT-PCR a tiempo real. Los datos son representados como la media y el error estándar de la media (SEM) (n=6/grupo, 5 experimentos, * P<0.05 vs Control; # P<0.05 vs PO; \$ p<0,05 vs CTR).

4.2. Efecto del fosfato, calcitriol y paricalcitol sobre la presentación de ICAM-1 en la superficie celular y la secreción de citoquinas en CMLV.

Como muestra la Figura 11, mediante análisis por citometría de flujo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de ICAM en la superficie celular entre los grupos control y PO. Sin embargo, la adición de CTR (10^{-8} M) a células incubadas con niveles altos de fosfato indujo un aumento significativo en los niveles de proteína ICAM. Por el contrario, el tratamiento con PC disminuyó los niveles de ICAM incluso por debajo de los valores observados en el grupo control.

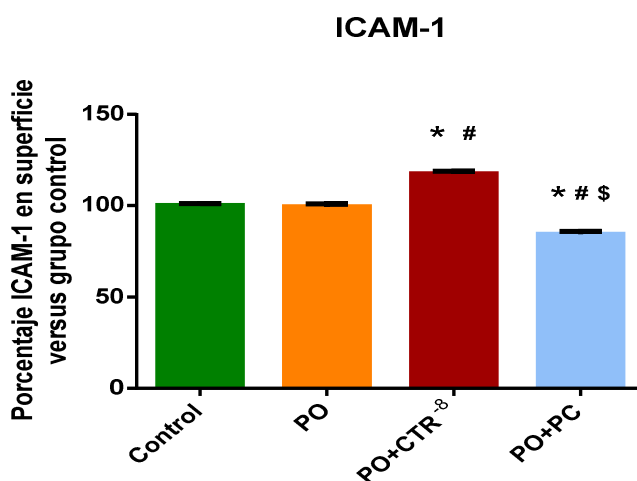


Figura 11. Efecto diferencial del calcitriol y del paricalcitol sobre los niveles de ICAM-1 en la superficie de CMLV. CMLV fueron incubadas durante 9 días en DMEM sólo con fosfato (3,3mM) o suplementado con calcitriol (10^{-8} M; PO+CTR) o paricalcitol (3×10^{-8} M; PO+PC). Células control fueron incubadas con DMEM (0,9mM de fosfato). Niveles de ICAM-1 fueron detectados mediante citometría de flujo. Los datos son representados como la media y el error estándar de la media (SEM) (n=6/grupo, 3 experimentos, * P<0,05 vs Control; # P<0,05 vs PO; \$ P<0,05 vs CTR).

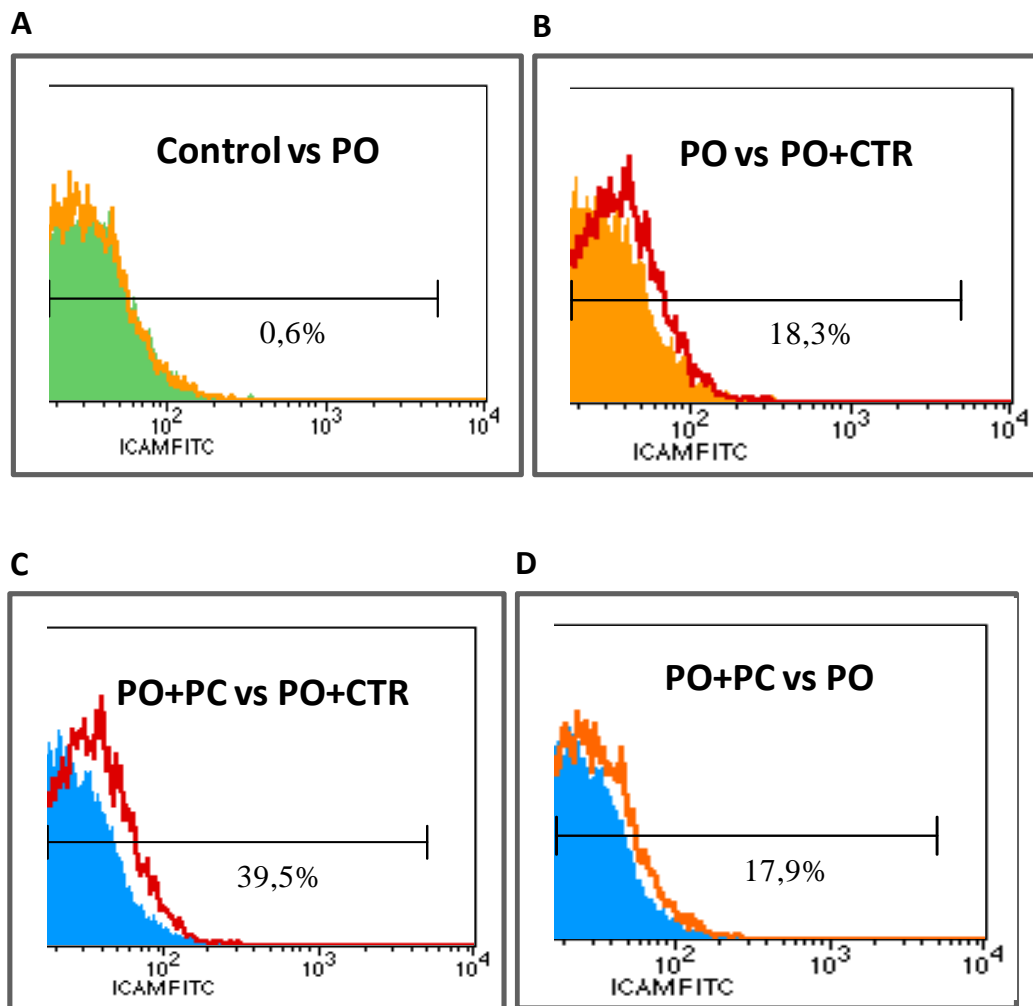


Figura 12. Análisis por citometría de flujo de los niveles de ICAM-1 en CMLV en los distintos grupos experimentales estudiados. Los porcentajes indicados corresponden a los cambios de ICAM-1 entre los distintos tratamientos. **A:** Comparación Control vs PO. **B:** Comparación PO vs PO+CTR. **C:** Comparación PO+PC vs PO+CTR. **D:** Comparación PO+PC vs PO.

En cuanto a la secreción de IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF α cuando las CMLV fueron cultivadas en un medio con PO se produjo un aumento significativo en la secreción de dichas citoquinas respecto a las células del grupo control. El CTR indujo un aumento adicional en la secreción de las citoquinas IL-6 y TNF α , así como un descenso en los niveles de IL-1 β y IL-8, respecto a las células tratadas sólo con PO (Figura 13). Estos datos están en consonancia con los datos de expresión génica descritos en el apartado 4.1. Por el contrario, el tratamiento con PC produjo un descenso significativo en la secreción de todas las citoquinas analizadas respecto al grupo PO, alcanzando niveles similares (IL-6 y TNF α) o incluso inferiores (IL-1 β y IL-8) al grupo control. Además, los niveles de IL-6, TNF α y IL-8 fueron inferiores a los obtenidos en el grupo PO+CTR.

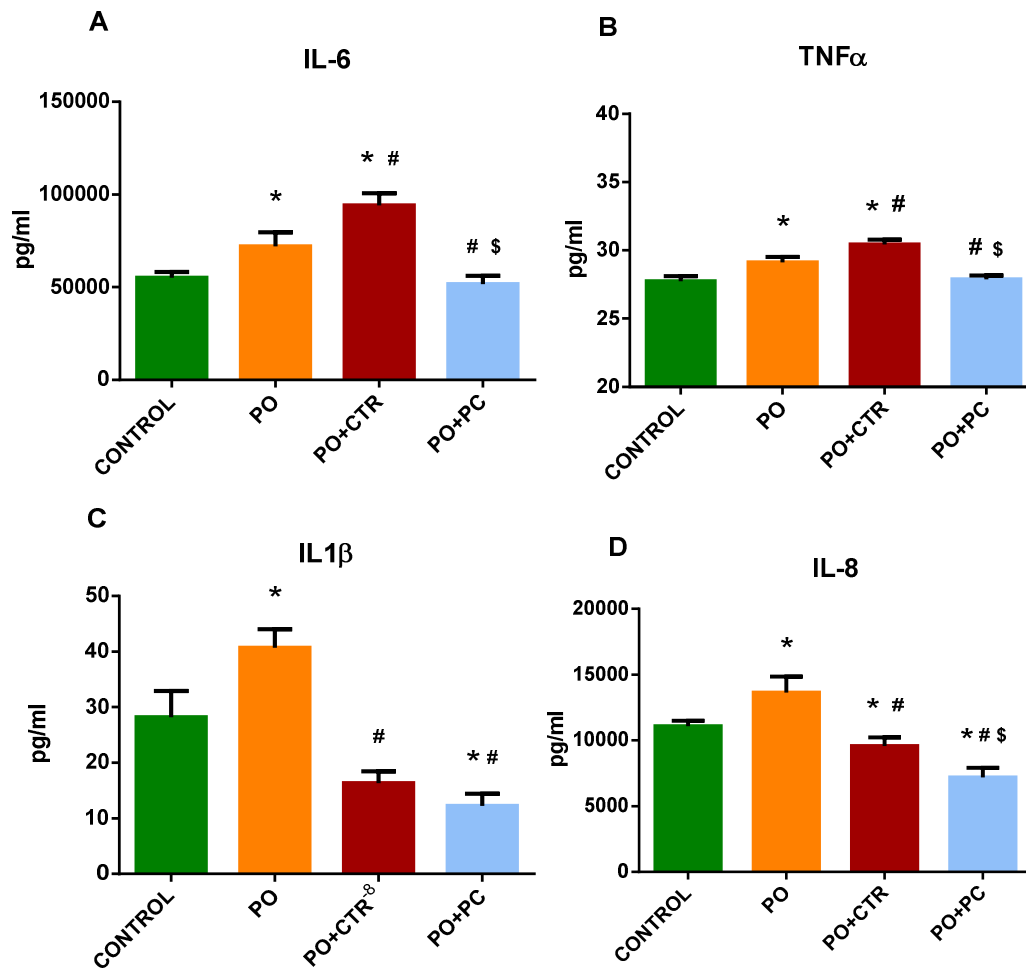


Figura 13. Efecto diferencial del calcitriol y del paricalcitol sobre la secreción de citoquinas inducida por fosfato. CMLV fueron incubadas durante 9 días sólo con fosfato alto (3,3mM; PO) o suplementado con calcitriol (10^{-8} M; PO+CTR) o paricalcitol (3×10^{-8} M; PO+PC). Células control fueron incubadas con DMEM (0,9mM de fosfato). La secreción de citoquinas al medio de cultivo fue determinada mediante el sistema de array Bio-Plex Pro Human Cytokine 4-Plex Panel. Los datos son representados como la media y el error estándar de la media (SEM) (n=6/grupo, 3 experimentos, * P<0,05 vs Control; # P<0,05 vs PO; \$ P<0,05 vs CTR).

4.3. Activación de la ruta de señalización de NFκβ/p65 por niveles elevados de fosfato. Efecto diferencial del calcitriol y del paricalcitol.

Trabajos previos a este estudio demuestran que existen distintos elementos capaces de activar la secreción de diversas citoquinas inflamatorias en CMLV (272, 426, 427). Sahar y colaboradores han descrito que la activación de NFκβ mediante IL-18, una citoquina inflamatoria, potencia la expresión de otras citoquinas inflamatorias en CMLV de ratón (428). Asimismo, Zhao y colaboradores argumentan que el fosfato alto promueve la calcificación vascular y la transdiferenciación osteogénica de CMLV a través de la translocación de p65 al núcleo impulsado por especies reactivas de oxígeno (EROs) (326). Por tanto, en este estudio hemos evaluado si dicha vía de señalización está implicada en mediar el efecto del fosfato sobre la expresión y posterior secreción de las citoquinas proinflamatorias descrito anteriormente. Asimismo, se procedió a valorar el efecto diferencial del CTR y del PC sobre la activación de dicha ruta.

El análisis mediante Western blot reveló que una concentración alta de fosfato (PO) produjo un aumento significativo en la translocación nuclear de p65 (NFκβ) respecto a las células del grupo control ($1,37 \pm 0,07$ vs $1,00 \pm 0,02$; $p < 0,05$) (Figura 14A y 14B).

Cuando se añadió calcitriol a las células tratadas con fosfato (PO+CTR) se produjo un leve pero significativo aumento en la translocación nuclear de NFκβ respecto a las células tratadas sólo con fosfato (PO) ($1,95 \pm 0,26$ vs $1,37 \pm 0,07$; $p < 0,05$). Sin embargo, al añadir paricalcitol (PO+PC) se produjo un descenso

significativo en la translocación nuclear de NFκβ respecto al grupo PO ($0,83 \pm 0,13$ vs $1,37 \pm 0,07$; $p < 0,05$) alcanzando niveles similares a los del grupo control.

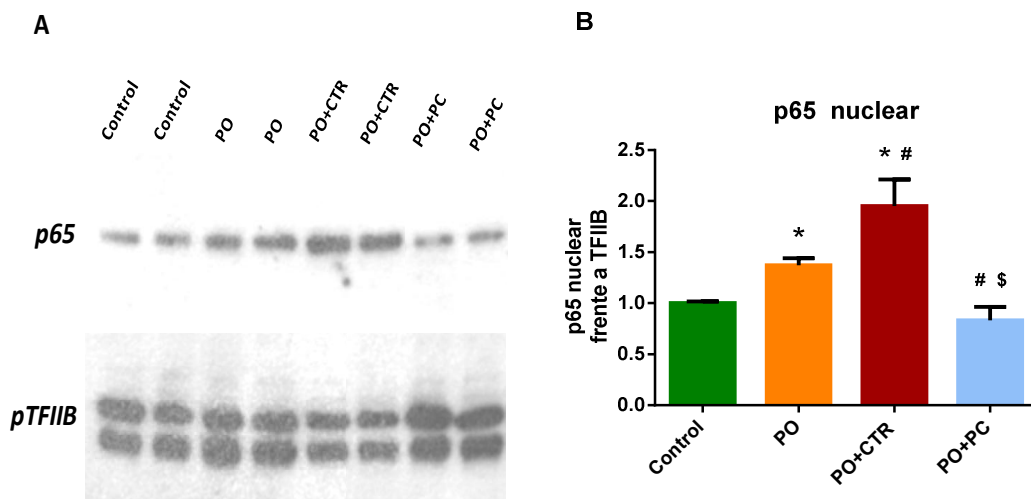


Figura 14. Efecto del fosfato, del calcitriol y del paricalcitol sobre la activación de la ruta canónica NFκβ. CMLV fueron incubadas durante 24 horas con fosfato solo (3,3 mM; PO) o suplementado con calcitriol (10^{-8} M; PO+CTR) o con paricalcitol (3×10^{-8} M; PO+PC). Células control fueron incubadas con DMEM (0,9 mM de fosfato). **A:** El factor de transcripción NFκβ fue determinado mediante western blot. El western es representativo de tres experimentos diferentes. **B:** La intensidad de las bandas fue cuantificada usando ImageJ y normalizada frente a TFIIB. Los datos son representados como la media y el error estándar de la media (SEM) (3 experimentos independientes, * $P < 0,05$ vs Control; # $P < 0,05$ vs PO; \$ $P < 0,05$ vs PO+CTR).

Por otro lado, el análisis por inmunofluorescencia mediante microscopía confocal confirmó un aumento de NFκβ nuclear en las células con PO, así como en las células tratadas con calcitriol (PO+CTR), respecto a las células control. Por

el contrario, se produjo un descenso en la localización nuclear de NF κ B cuando las células fueron tratadas con paricalcitol (PO+PC) (Figura 15C y 15D).

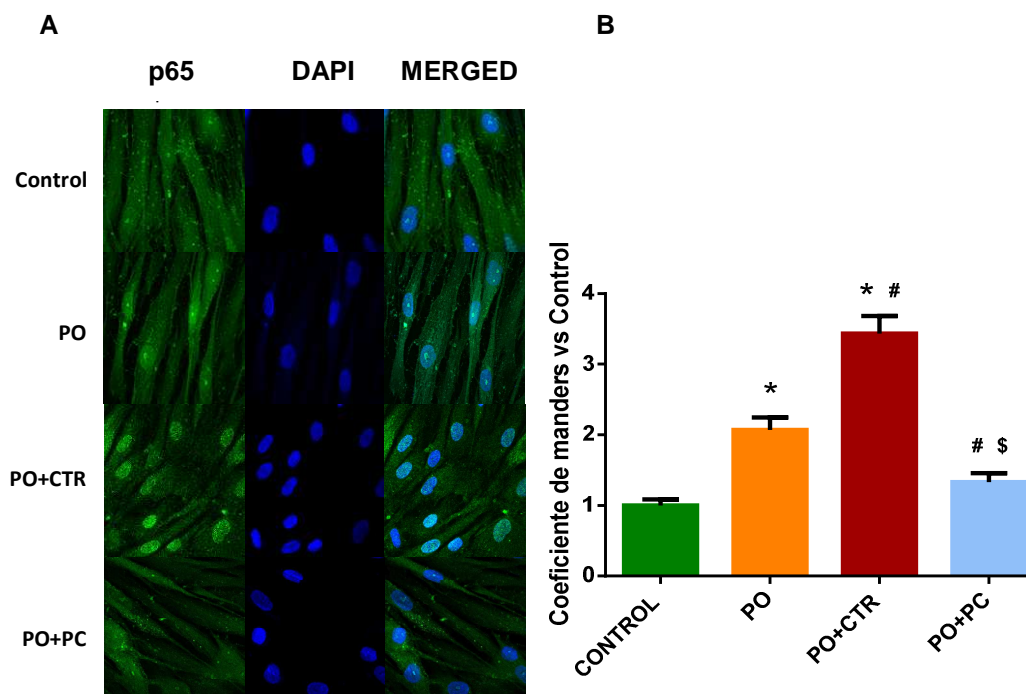


Figura 15. Efecto del fosfato, del calcitriol y del paricalcitol sobre la activación de la ruta canónica NF κ B. CMLV fueron incubadas durante 24 horas con fosfato solo (3,3 mM; PO) o suplementado con calcitriol (10^{-8} M; PO+CTR) o con paricalcitol (3×10^{-8} M; PO+PC). Células control fueron incubadas con DMEM (0,9 mM de fosfato). **A:** La localización intracelular de p65 fue visualizada mediante inmunofluorescencia con microscopía confocal. Para cada tratamiento el marcaje de p65 (verde) es mostrado en la columna de la izquierda; en la columna central aparece la tinción de los núcleos mediante marcaje fluorescente con DAPI (azul) La composición de la imagen (MERGED) es mostrada en la columna de la derecha. Las imágenes son representativas de 3 experimentos diferentes. **B:** Cuantificación del coeficiente de Manders (M1 plugin Verde vs. DAPI) del marcaje por fluorescencia de p65 nuclear (3 experimentos independientes, *P<0,05 vs Control; # P<0,05 vs PO; \$ P<0,05 vs PO+CTR).

5. EFECTO DEL FOSFATO, DEL CALCITRIOL Y DEL PARICALCITOL SOBRE LA GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROs) EN CMLV

Diversos autores sugieren que existe una relación entre la producción de EROs y la presencia de inflamación, por lo que ambos procesos aparecen frecuentemente asociados (429, 430). Varios trabajos indican que el aumento de EROs induce la activación de la vía de señalización de NFκβ en diferentes tipos celulares por distintos mecanismos (431, 432), al igual que ocurre en las CMLV (326).

Por tanto, basándonos en trabajos previos y una vez confirmado que el PO elevado activa la vía de señalización de NFκβ/p65 y favorece la expresión y secreción de citoquinas inflamatorias, se procedió a analizar el efecto que ejerce el fosfato sobre la generación de EROs, así como la influencia del calcitriol y del paricalcitol sobre la regulación de dicho proceso.

La generación de EROs en CMLV se determinó empleando la sonda de fluorescencia H2DCFDA. Esta sonda se torna fluorescente en presencia de distintas especies reactivas de oxígeno (anión peroxinitrito y radicales hidroxilos y peroxilos).

Como se muestra en la Figura 16, niveles elevados de PO produjeron un aumento significativo en la generación de EROs respecto a las células del grupo control, al igual que ocurría con la translocación nuclear de p65. De igual manera, la adición de CTR (PO+CTR) produjo aumento significativo en la producción de EROs respecto a las células tratadas sólo con PO. Por el contrario, la

administración de PC (PO+PC) a CMLV redujo de manera significativa los niveles de anión peroxinitrito y de radicales hidroxilo y peroxilo inducidos por el PO.

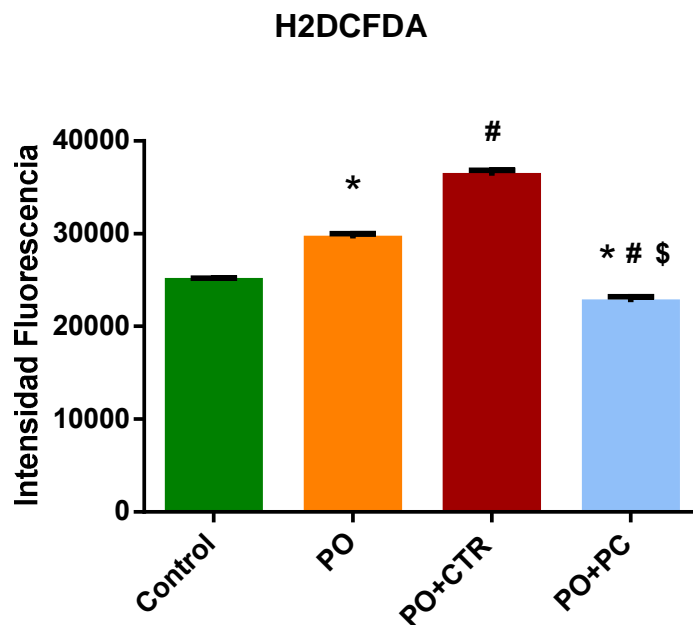


Figura 16. Efecto del fosfato, del calcitriol y del paricalcitol sobre la producción de EROs en CMLV. CMLV fueron tratadas durante 24 horas sólo con fosfato (3,3 mM; PO) o suplementado con calcitriol (10^{-8} M; PO+CTR) o paricalcitol (3×10^{-8} M; PO+PC). Las células control fueron incubadas con DMEM (0,9mM de fosfato). La producción de EROs en CMLV se midió mediante la sonda H2DCFDA. Los datos son representados como la media y el error estándar de la media (SEM) (n = 18/grupo, 3 experimentos independientes, * P<0.05 versus control; # P<0,05 versus PO; \$ P<0.05 versus PO+CTR).

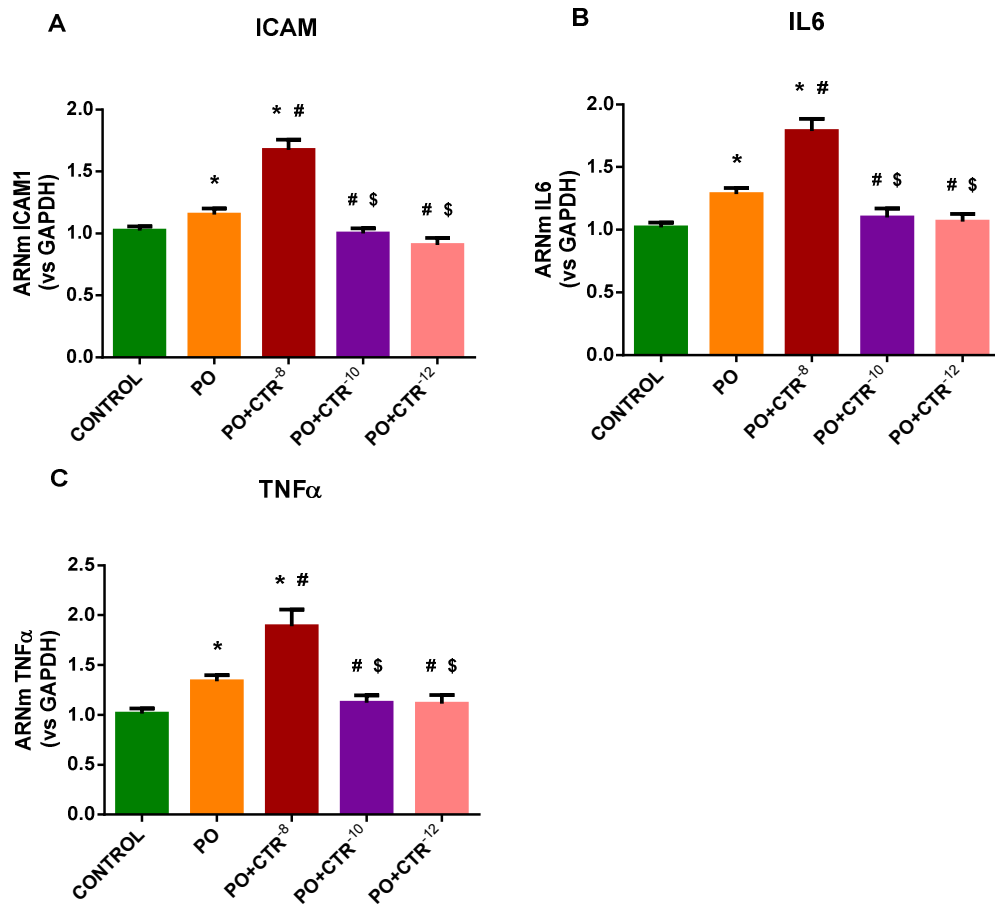
6. EFECTO “DOSIS DEPENDIENTE” DEL CALCITRIOL SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CITOQUINAS, LA ACTIVACIÓN DE NFκβ Y LA GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.

Dado que altas dosis de CTR resultaron desencadenar un estímulo pro-inflamatorio y pro-oxidante y que en la literatura se describe al CTR como una de las principales moléculas antiinflamatorias evaluamos un posible efecto dual del CTR dependiente de la concentración.

En base a esto, analizamos si la expresión de citoquinas, la activación de NFκβ y la generación de EROs en nuestro modelo de CMLV tratadas con PO responde a una relación “dosis-dependiente” con el CTR.

6.1 Efecto “dosis-dependiente” del calcitriol sobre la expresión génica de citoquinas inflamatorias en CMLV cultivadas con niveles elevados de fosfato.

Como vimos en el apartado 4.1, la adición de una concentración elevada de CTR (10^{-8} M) a CMLV cultivadas con PO provocó un aumento adicional en la expresión de ICAM-1, de IL-6 y de TNFα. Por el contrario, y como muestra la Figura 17, al añadir CTR a concentraciones más bajas (10^{-10} y 10^{-12} M) la expresión de estas citoquinas descendió de manera significativa respecto a las células tratadas sólo con PO, alcanzando niveles similares a los del grupo control. Sin embargo, la expresión de IL-1β y de IL-8 disminuyó de manera significativa con las tres concentraciones de CTR (10^{-12} M, 10^{-10} M y 10^{-8} M) respecto a las células tratadas sólo con PO, aunque el descenso más importante fue el inducido por la mayor de estas concentraciones (10^{-8} M).



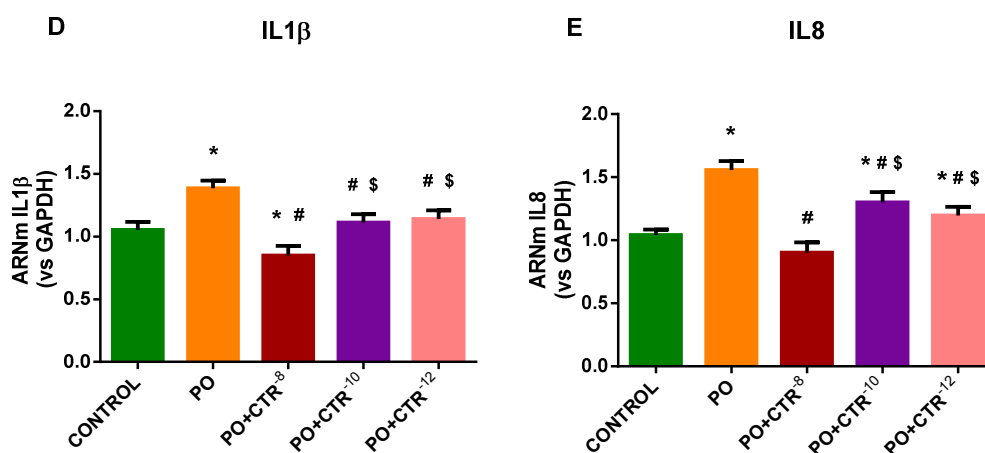


Figura 17. Efecto dosis dependiente del calcitriol sobre la expresión génica de citoquinas inducida por fosfato. CMLV fueron incubadas durante 9 días con DMEM sólo con fosfato (3,3mM; PO) o suplementado con diferentes concentraciones de CTR (10^{-8} M, 10^{-10} M y 10^{-12} M). Células control fueron incubadas con DMEM (0,9 mM de fosfato). La expresión génica de citoquinas proinflamatorias fue determinada por RT-PCR a tiempo real y normalizada frente a GAPDH. Los datos son representados como la media y el error estándar de la media (SEM) (n=6/grupo, 3 experimentos independientes, * P<0.05 vs control; # P<0.05 vs PO; \$ P<0,05 vs PO+CTR (10^{-8} M)).

Por tanto, nuestros resultados indican que el CTR a concentraciones más bajas (10^{-10} M y 10^{-12} M) inhibe la expresión génica de ICAM-1 y de las citoquinas inflamatorias inducidas por PO en CMLV. Sin embargo, una concentración 10^{-8} M de CTR aumenta la expresión de ICAM-1, IL-6 y TNF α .

6.2 Efecto “dosis-dependiente” del calcitriol sobre el nivel de ICAM-1 en la superficie de CMLV y la secreción de citoquinas inducidos por fosfato.

Al analizar la presentación de ICAM-1 en la superficie de CMLV tratadas con PO y CTR 10^{-10} M o 10^{-12} M, no se observaron diferencias significativas

respecto a células tratadas sólo con PO; sin embargo, los niveles de ICAM-1 fueron significativamente más bajos que en las células tratadas con CTR 10^{-8} M.

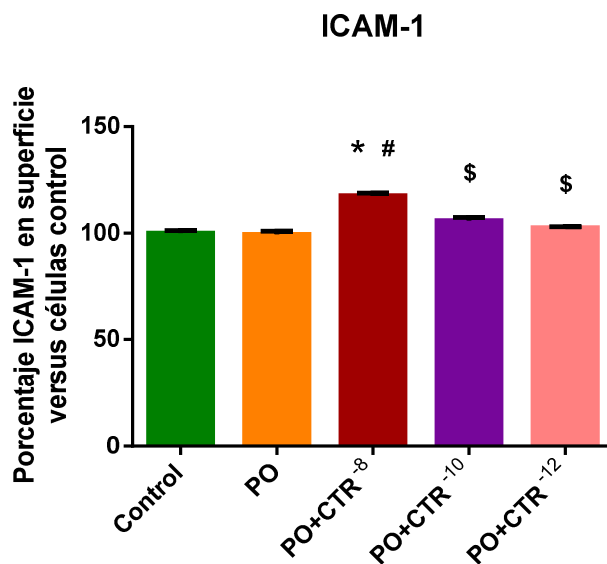


Figura 18. Efecto “dosis-dependiente” del calcitriol sobre los niveles de ICAM-1 en la superficie de CMLV. Las células fueron incubadas durante 9 días con DMEM con fosfato solo (3,3mM) o suplementado con diferentes concentraciones de CTR (10^{-8} M, 10^{-10} M y 10^{-12} M). Células control fueron incubadas en DMEM (fosfato 0,9 mM). Niveles de ICAM-1 fueron detectados mediante citometría de flujo. Los datos son representados como la media y el error estándar de la media (SEM) (n=6/grupo, 3 experimentos independientes, * P<0.05 vs control; # P<0.05 vs PO; \$ P<0,05 vs PO+CTR (10^{-8} M)).

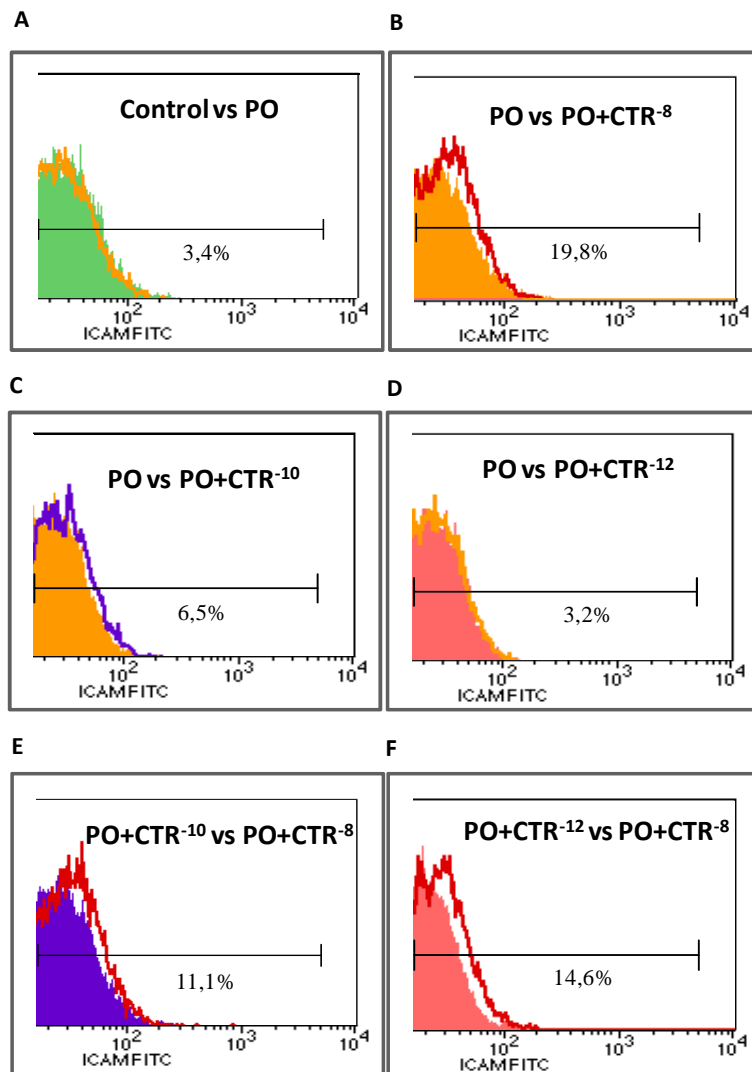
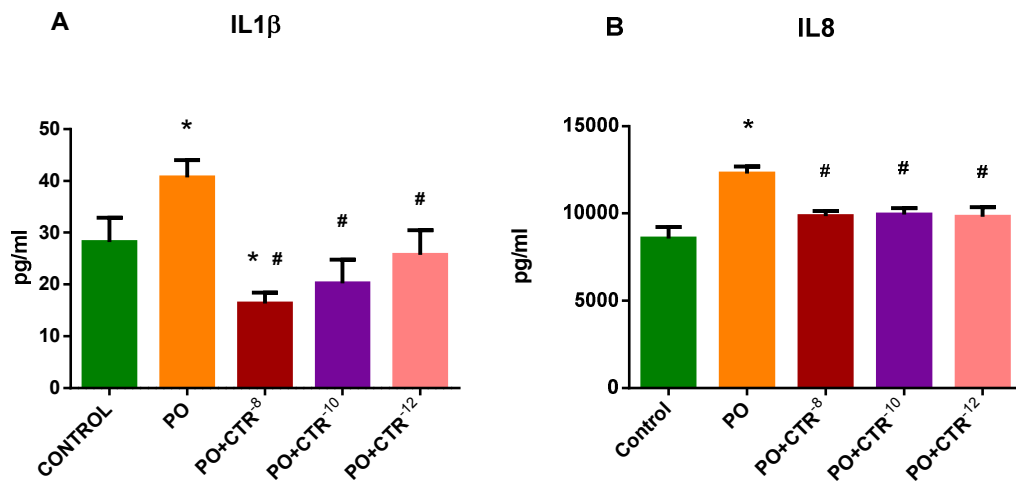


Figura 19. Figura 19. Análisis por citometría de flujo de los niveles de ICAM-1 en CMLV en presencia de PO alto con distintas dosis de CTR. Los porcentajes indicados corresponden a los cambios de ICAM-1 entre los distintos tratamientos. **A:** Comparación Control vs PO. **B:** Comparación PO vs PO+CTR. **C:** Comparación PO vs PO+CTR⁻¹⁰. **D:** Comparación PO vs PO+CTR⁻¹². **E:** Comparación PO+CTR⁻¹⁰ vs PO+CTR⁻⁸. **F:** Comparación PO+CTR⁻¹² vs PO+CTR⁻⁸

En relación a la secreción de citoquinas inflamatorias, nuestros resultados indican que cuando las CMLV fueron cultivadas con concentraciones bajas de CTR (10^{-10} M y 10^{-12} M) se observó un descenso significativo de IL1- β , IL-6, IL-8 y TNF α respecto a las células tratadas sólo con PO (aunque este descenso no fue significativo en el caso de TNF α en células incubadas con CTR 10^{-12} M). Sin embargo, como se ha descrito en el apartado 4.2, una concentración de CTR 10^{-8} M produjo un descenso significativo en la secreción de IL1- β y de IL-8 respecto a células tratadas sólo con PO, a la vez que un aumento significativo en la secreción de IL-6 y de TNF α .



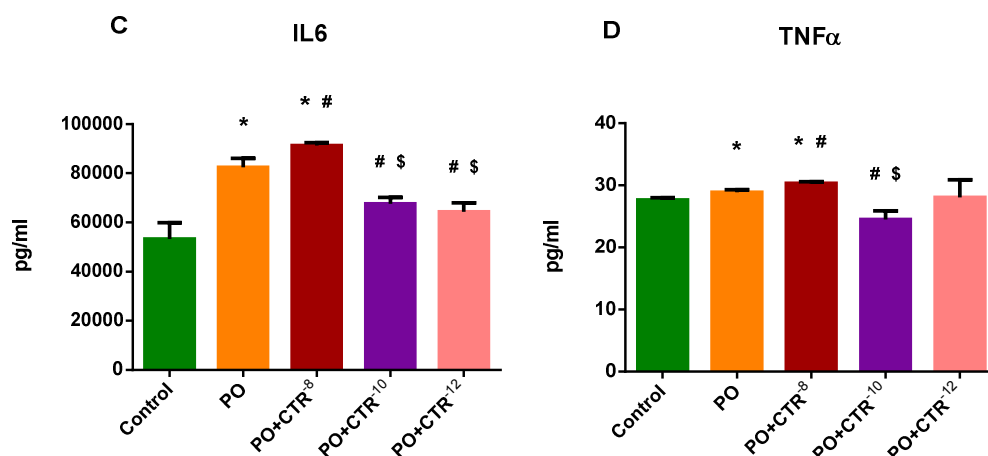


Figura 20. Efecto “dosis-dependiente” del calcitriol sobre la secreción de citoquinas inflamatorias. CMLV fueron incubadas durante 9 días con DMEM con fosfato solo (3,3mM) o suplementado con diferentes concentraciones de CTR (10^{-8} M, 10^{-10} M y 10^{-12} M). Células control fueron tratadas con DMEM (fosfato 0,9 mM). Niveles de citoquinas fueron cuantificados mediante sistema Bioplex. Los datos son representados como la media y el error estándar de la media (SEM) (n=6/grupo, 3 experimentos, * P<0.05 vs control; # P<0.05 vs PO; \$ P<0,05 vs PO+CTR (10^{-8} M)).

6.3. Efecto “dosis-dependiente” del calcitriol sobre la translocación nuclear de NF κ B en CMLV cultivadas con fosfato alto.

El análisis mediante western blot reveló que, al contrario de lo que ocurre en el grupo PO+CTR 10^{-8} M, el CTR en concentraciones más pequeñas (10^{-10} M y 10^{-12} M) inhibe de manera significativa la translocación nuclear de p65 (NF κ B) respecto a células tratadas únicamente con PO.

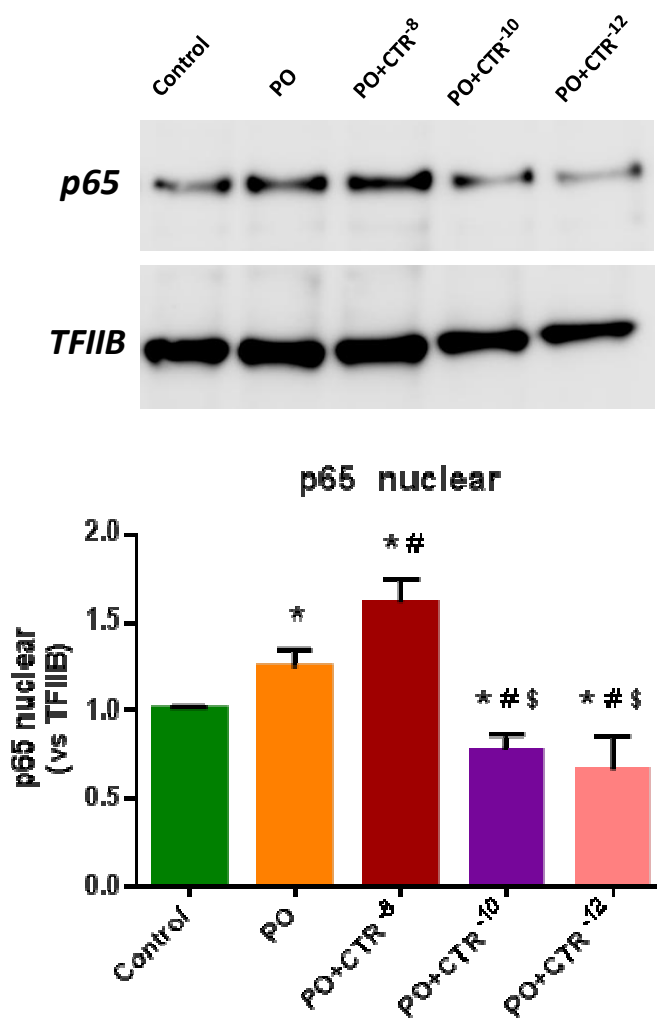


Figura 21. Efecto dosis dependiente del calcitriol sobre la translocación de p65 (NFκβ) al núcleo inducida por fosfato alto. CMLV se incubaron durante 24 horas con medio de cultivo con PO solo (3,3mM) o suplementado con distintas concentraciones de CTR (10^{-8} M, 10^{-10} M y 10^{-12} M). Células control fueron incubadas con DMEM (fosfato 0,9 mM). La activación de NFκβ se determinó mediante western blot. La intensidad de la banda fue cuantificadas por ImageJ y normalizada frente a TFIIB. (n=3/grupo, 4 experimentos independientes, * P<0,05 vs Control; # P<0.05 vs PO; \$ P<0,05 vs PO+CTR (10^{-8} M)).

6.4. Efecto “dosis-dependiente” del CTR sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en CMLV tratadas con fosfato alto.

Como muestra la Figura 19, la adición de 10^{-10} M y 10^{-12} M de CTR a CMLV cultivadas con PO alto indujo una disminución significativa en los niveles de EROs respecto a los niveles obtenidos en los grupos PO y PO+CTR 10^{-8} M

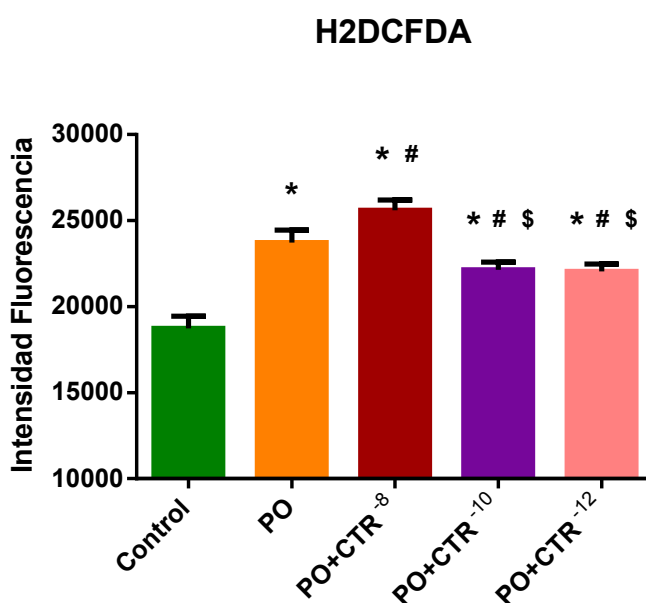


Figura 22. Efecto dosis dependiente del CTR sobre la generación de EROs inducida por fosfato alto. CMLV son tratadas durante 24 horas con medio de cultivo con fosfato alto (3,3mM) (PO) o suplementado con calcitriol a distintas concentraciones (10^{-8} M, 10^{-10} M y 10^{-12} M). Células incubadas con DMEM (fosfato 0,9 mM) fueron usadas como control. La producción de EROs se cuantificó usando la sonda H2DCFDA. Los datos son representados como la media y el error estándar de la media (SEM) (n = 18/grupo de 3 experimentos independientes, * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ versus PO; \$ $P < 0.05$ vs PO+CTR (10^{-8} M)).

DISCUSIÓN

En el presente estudio, hemos explorado el efecto diferencial de dos agonistas del receptor de vitamina D (VDR), paricalcitol y calcitriol, sobre la calcificación inducida con una concentración elevada de fosfato en células del músculo liso vascular (CMLV) cultivadas *in vitro*. De esta manera, comprobamos que el CTR a una concentración elevada potencia la calcificación de estas células cultivadas con fosfato alto, y que este hecho está asociado con la activación de la ruta canónica Wnt/ β -Catenina y con la sobreexpresión de BMP2. Por el contrario, el paricalcitol disminuyó la calcificación en las CMLV, hecho que fue acompañado por la inhibición de la ruta Wnt/ β -Catenina y la disminución en la expresión de BMP2, así como de otros genes marcadores de osteoblasto.

Una de las principales alteraciones del metabolismo mineral durante la ERC es la presencia de altos niveles séricos de fosfato. Otra de las finalidades de este trabajo fue valorar si este fosfato alto es capaz de promover la inflamación en CMLV. Además, se quiso valorar si tanto el calcitriol como el paricalcitol eran capaces de modular la posible respuesta inflamatoria inducida por el fosfato en las CMLV. A raíz de nuestros resultados concluimos que el fosfato elevado inducía un estado de inflamación en las CMLV que se agravó, en términos generales, con el tratamiento con CTR a altas concentraciones. Sin embargo, cuando las CMLV fueron tratadas con paricalcitol se produjo una inhibición de su estado de inflamación, disminuyendo la expresión y secreción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF α .

Como se ha demostrado anteriormente por distintos investigadores y por nuestro grupo de investigación, las CMLV cultivadas con fosfato elevado

experimentan el desarrollo de calcificaciones (deposición de Ca) y una transdiferenciación hacia células de estirpe osteogénica(97, 108, 109, 200, 433, 434). Estos trabajos señalan al fosfato como un inductor inequívocamente clave en el desarrollo de las calcificaciones vasculares y en la transdiferenciación osteogénica. En relación a la regulación de ambos procesos, existen estudios que describen la implicación de ligandos de la familia de proteínas morfogénicas óseas (BMPs) (152, 156, 435), ligandos de la familia Wnt (436) y otros trabajos que implican ligandos de ambas familias (57, 145, 425, 437). En nuestro estudio, encontramos que el proceso de calcificación se acompañó de una variación en la expresión de factores osteogénicos tales como BMP2, la proteína procalcificante Osteocalcina (OC) y los factores de transcripción Runx2 y Msx2. Así, nuestros resultados apoyan estudios previos que muestran cómo la expresión de todos estos marcadores fue inducida de manera significativa en vasos calcificados (438, 439). BMP2 representa un elemento clave en la diferenciación osteogénica de células mesenquimales, promoviendo la activación de los factores de transcripción Runx2 y Msx2 (440). OC es un gen diana inducido por los factores de transcripción Runx2 y Msx2 (441, 442).

El presente estudio muestra también que la calcificación de las CMLV está asociada con una activación concomitante de la ruta canónica Wnt/ β -Catenina, como demuestra la detección de β -Catenina en el núcleo de la célula. Además, la adición a CMLV incubadas con fosfato elevado de Dkk-1, un inhibidor de la ruta Wnt/ β -Catenina secretado extracelularmente (443), produjo una inhibición tanto de la translocación nuclear de β -Catenina como de la calcificación. Varios trabajos indican que inhibidores de la señalización Wnt (Dkk-1, sFRP, Wif-1 y esclerostina) pueden actuar como inhibidores del desarrollo de las calcificaciones

y de la diferenciación osteogénica. Dkk-1 inhibe la expresión de fosfatasa alcalina inducida por TNF α en ratones diabéticos que no expresan el receptor de la LDL (444). sFRP-2 (Secreted frizzled-related protein 2) inhibe de manera parcial la actividad fosfatasa alcalina y la formación de nódulos de mineralización en células osteogénicas de ratón (MC3T3E1) inducidas en presencia de BMP-2 (445). Cho y colaboradores presentan a Wif-1 como un inhibidor de la diferenciación de células mesenquimales procedentes de embriones de ratón hacia osteoblasto (446). Otros autores sugieren que Wif-1 podría modular el grado de la calcificación de la válvula aórtica (447). Además, para Jean y Chazot la esclerostina podría actuar como un inhibidor de la calcificación vascular y de la formación de hueso (448).

La activación de la ruta canónica Wnt/ β -Catenina modula la diferenciación a osteoblastos desde células madre mesenquimales (MSC) (449) y la proliferación en CMLV (219). Otros autores han podido observar una proliferación de las CMLV en vasos que desarrollan calcificaciones (450). En particular, nosotros hemos demostrado que la calcificación observada en las células tratadas con fosfato alto se acompañó de un aumento significativo en la activación de la ruta canónica Wnt/ β -Catenina y en la expresión de Ciclina D1, un marcador temprano de la proliferación celular. Está demostrado que Ciclina D1 es un gen diana directo de la activación de la ruta canónica Wnt/ β -Catenina (451), cuya activación es requerida para la propagación de algunos tipos específicos de células osteoprogenitoras necesarias para el desarrollo morfogénico del cráneo durante la embriogénesis en ratones (449). Así, el aumento de los niveles de ARNm de Ciclina D1 observado en nuestro estudio concuerda con estudios previos que indican que la vía de señalización de β -catenina nuclear puede regular la

proliferación de CMLV en la vasculatura (219, 424). La inducción de Ciclina D1, Axina 2, Versican (VCAN) (452), así como la reversión de este efecto por la adición de Dkk-1, que se observa en nuestro estudio, revela una activación de la ruta canónica Wnt/ β -Catenina que ocurre de forma paralela al proceso de calcificación en las CMLV.

Por otro lado, el papel de la vía de señalización de BMP y de Wnt/ β -Catenina sobre la Calcificación Vasculare no está completamente dilucidado (437) (453). Mikhaylova y colaboradores apuntan a la implicación de ligandos de la familia BMP y de la familia Wnt en la regulación de la transdiferenciación osteoblástica de CMLV (437). Según Gaur y colaboradores tanto la señalización por BMP como por Wnt contribuyen a la regulación de la masa ósea promoviendo la osteogénesis de células mesenquimales a través de la estimulación de la expresión de Runx2 (454). Para Kamiya y colaboradores la interacción de ambas vías de señalización en la diferenciación osteoblástica y en la formación del hueso no ha sido del todo caracterizada (455). Sin embargo, estos y otros autores sugieren que BMP2 actúa antes de la vía de señalización Wnt induciendo la activación de β -Catenina en células mesenquimales (455, 456). Rawadi y colaboradores mostraban que la capacidad de BMP2 y Shh (Sonic hedgehog homolog) para inducir fosfatasa alcalina depende de la expresión de genes de la familia Wnt, y que los efectos de BMP2 sobre la mineralización extracelular en osteoblastos son mediados por la inducción de la ruta (457). Rodríguez-Carballo y colaboradores investigaron los efectos cooperativos de BMP y de la vía canónica de Wnt sobre la expresión de los genes maestros osteogénicos tempranos, *Dlx5*, *Msx2*, y *Runx2*, en la diferenciación osteoblástica (458). Estos autores encontraron

que la inducción de dichos genes está mediada por la interacción de complejos transcripcionales cooperativos de proteínas de la familia Smad y de TCF4/ β -Catenina los cuales se unen a sitios de unión al ADN. A partir de diferentes modelos *in vivo* e *in vitro*, diferentes autores han descrito la participación de un eje BMP-Wnt/ β -Catenina en la transdiferenciación osteogénica observada en las calcificaciones vasculares (424, 425). Sin embargo, un trabajo de nuestro grupo sugiere que la activación canónica de Wnt podría actuar potenciando el efecto del fosfato alto sobre la activación de BMP2 (158). Otros autores también han sugerido que la activación de la señalización Wnt/ β -Catenina puede anteponerse a la activación de la señalización de BMP. Tal es el caso de la regulación de la formación de la cresta ectodérmica apical y del eje dorso-ventral durante el desarrollo de las extremidades posteriores en ratones (459) o de la inhibición de la maduración de oligodendrocitos (460). Tang y colaboradores demostraron que el osthole, un derivado del tipo cumarina, estimulaba la diferenciación de osteoblastos a través de una inducción de la expresión de BMP2 promovida por la activación de la ruta Wnt/ β -Catenina (461).

Por otro lado, Shao y colaboradores proponen estudiar más a fondo la contribución relativa de la señalización canónica y no canónica de Wnt en la regulación de las calcificaciones vasculares (425). De hecho, el papel de la vía de señalización Wnt en la diferenciación osteogénica durante el desarrollo del hueso sigue siendo controvertido. La vía de señalización Wnt canónica puede suprimir la diferenciación osteogénica o activar la osteogénesis según las condiciones celulares. La falta de uniformidad en la literatura puede ser el resultado de las diferencias encontradas en las distintas condiciones basales celulares, las especies

empleadas, o incluso en las condiciones experimentales y estímulos aplicados (462). El efecto de la activación de la vía Wnt no canónica a través de Wnt5a en la osteogénesis se ha demostrado en células madre adultas (463) y en células MC3T3E1 (preosteoblastos) (442). En modelos de calcificación dependiente de Msx2 llevados a cabo en cultivos primarios de miofibroblastos y en células 10T1/2, se observó una regulación al alza tanto de los agonistas canónicos de la Wnt (Wnt3a, Wnt7) como de los no canónicos (Wnt5a), los cuales inhiben las acciones de la vía Wnt canónica, pero no la osteogénesis (425). En la actualidad se desconoce si el fosfato podría ser un nuevo estimulador de las vías Wnt no canónicas.

Nuestros datos indican que el fosfato podría ser un activador de la ruta canónica Wnt/ β -Catenina. Del mismo modo nuestros resultados parecen indicar que la presencia de altas concentraciones de CTR podría favorecer la activación de la ruta Wnt y con ello el proceso de calcificación de las CMLV. En este sentido, muchos estudios in vivo, algunos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, han descrito que el tratamiento de animales urémicos con vitamina D produce un aumento en el desarrollo de la CV (120, 123, 464-466). Koleganova y colaboradores también demostraron que una dosis moderada de CTR produjo CV tanto en ratas control como en ratas urémicas (450). Este efecto se observó incluso a pesar de no producirse cambios en los niveles séricos de calcio y de fosfato, lo cual sugiere que el CTR pueda tener una influencia directa sobre el desarrollo de CV. Curiosamente, en un estudio llevado a cabo con un modelo de ratas urémicas, la inducción de calcificaciones aórticas por CTR fue parcialmente revertida después de la interrupción de la administración de CTR (464). El efecto directo del

CTR sobre el proceso de calcificación fue evaluado en estudios *in vitro* en CMLV. Jono y colaboradores demostraron que en CMLV bovinas cultivadas con una concentración alta de fosfato, la adición de CTR en concentraciones crecientes produjo un aumento dosis-dependiente de la calcificación (117). Estos datos van en consonancia con los observados en este trabajo de tesis, donde encontramos que en CMLV, la administración de CTR produce un incremento adicional en la calcificación inducida por fosfato. En este mismo sentido, Zebger-Gong y colaboradores observaron que un tratamiento con dosis altas de CTR induce la transdiferenciación de CMLV a células de fenotipo osteoblástico tanto en ratas urémicas como en cultivos *in vitro*; esto estuvo asociado con la inducción de la expresión de Osterix, factor de transcripción osteogénico, y de otras proteínas implicadas en el proceso de mineralización (467).

En nuestro estudio se evaluó el efecto que ejercen en nuestro modelo de calcificación tanto el calcitriol como el paricalcitol. La concentración de CTR elegida para llevar a cabo nuestros experimentos fue seleccionada tomando como referencia estudios previos llevados a cabo con CMLV cultivadas *in vitro* (119,468), y que están en consonancia con la dosis empleada por otros investigadores en estudios *in vitro* llevados a cabo con glándulas paratiroides normales de perro, para inhibir la proliferación (469) o para reducir la secreción de PTH en glándulas paratiroides hiperplásicas humanas procedentes de pacientes con HPT2 (470). Nuestros resultados demuestran que las CMLV tratadas con CTR mostraron un aumento significativo en la calcificación inducida por fosfato alto. Por el contrario, la adición de paricalcitol al medio de cultivo resultó en una disminución significativa de la calcificación. Estudios experimentales anteriores a

éste, tanto *in vivo* (123, 124) como *in vitro* (120), han demostrado también que el paricalcitol produce menos calcificación que el calcitriol. En este estudio confirmamos que el paricalcitol reduce la calcificación inducida por fosfato, lo cual está en marcado contraste con el efecto producido por el calcitriol, que empeora la calcificación inducida por fosfato.

Para entender mejor los mecanismos moleculares que apoyan los diferentes efectos llevados a cabo por calcitriol y paricalcitol sobre la calcificación, hemos analizado la expresión génica de BMP2 que, como hemos comentado previamente, aparecía aumentada en las CMLV expuestas a fosfato alto. Los resultados obtenidos indican que si bien el CTR produjo un aumento en los niveles de ARNm de BMP2, el paricalcitol los disminuyó. En consonancia con estos datos observamos que el CTR estimuló la expresión génica de Runx2 y Msx2 mientras que el paricalcitol la redujo. La estimulación de Runx2 por el CTR está en línea con resultados derivados de estudios previos que muestran un aumento de la expresión de dicho factor de transcripción en la aorta de los animales tratados con CTR (450). Asimismo, nuestros experimentos confirmaron que la expresión de OC también fue incrementada en células tratadas con calcitriol, pero no se observó ningún cambio en células expuestas a paricalcitol respecto a las células tratadas con fosfato alto y respecto a las células control. Igualmente, Mizobuchi y colaboradores comprobaron que se producía un aumento en la expresión de OC y de Runx2 en la aorta de ratas urémicas tratadas con calcitriol o doxercalciferol y por el contrario, el paricalcitol los disminuía (123). Makita y colaboradores establecen que 2 de las 4 isoformas de Runx2 inducen la expresión de OC en células osteoblásticas humanas (471).

El análisis colectivo de estos resultados indica que el calcitriol y el paricalcitol inducen perfiles fenotípicos diferentes entre sí y que conducen a las CMLV de aorta humana hacia la estimulación y la inhibición del proceso de calcificación respectivamente.

La unión del VDR con su ligando determina su activación y la consiguiente unión a secuencias específicas del ADN situadas en el área de influencia de los promotores de algunos genes. Al unirse al ADN, el VDR recluta una serie de complejos correguladores que llevan a cabo funciones adicionales necesarias para modificar la actividad transcripcional de los genes diana (472). De esta manera, la unión de diferentes análogos de la vitamina D con el VDR provocaría su activación y la sucesión de eventos celulares distintos, lo cual podría explicar por qué el calcitriol y el paricalcitol ejercen diferentes efectos sobre el desarrollo de la calcificación en CMLV tratadas con P alto, promovéndola en el caso del calcitriol e inhibiéndola en el caso del paricalcitol. En este sentido, Issa y colaboradores demostraron que la activación del VDR por el paricalcitol o el 22-oxacalcitriol recluta coactivadores que son diferentes de los reclutados por el calcitriol (473). Así, el efecto diferencial que hemos observado en el proceso de calcificación producido por el calcitriol y el paricalcitol podría ser explicado por una modulación diferencial de las vías de señalización intracelulares implicadas en dicho proceso de calcificación. Como se ha indicado anteriormente, en nuestros experimentos llevados a cabo con CMLV cultivadas *in vitro* comprobamos que la calcificación inducida por fosfato alto va asociada a una activación de la ruta Wnt/ β -Catenina. En base a ello, a continuación valoramos el efecto del calcitriol y del paricalcitol sobre la vía de señalización

Wnt/ β -Catenina. Nuestros resultados indicaron una mayor activación de la ruta Wnt/ β -Catenina (mayor localización nuclear de β -Catenina) cuando las células son tratadas con CTR. Adicionalmente, verificamos la implicación de esta ruta sobre la calcificación inducida por fosfato y por calcitriol, mediante la co-incubación con el inhibidor específico Dkk-1. Los resultados mostraron una reducción de la calcificación después de dicho tratamiento. El efecto del paricalcitol sobre la ruta Wnt/ β -Catenina fue el contrario del observado con el calcitriol. De esta manera, la inhibición de la calcificación llevada a cabo por el paricalcitol estuvo acompañada por una reducción en los niveles de β -Catenina localizada en el núcleo de la célula. La expresión de Ciclina D1, gen blanco de la ruta Wnt/ β -Catenina, no se modificó por la adición de CTR respecto a las células tratadas con fosfato alto. Sin embargo, el tratamiento con paricalcitol tendió a reducir la expresión de dicho gen. Además, el análisis de la expresión de otros genes diana de dicha ruta Wnt/ β -Catenina (VCAN y Axin 2) indicó una mayor activación de la ruta en las CMLV tratadas con fosfato y en las tratadas con CTR respecto a las células control.

Diversos estudios sugieren una interacción funcional entre la señalización por calcitriol y la vía Wnt/ β -Catenina. Varios autores han descrito que el VDR puede actuar como un modulador de la ruta canónica Wnt/ β -Catenina reprimiéndola en células de cáncer de colon (474, 475). Sin embargo, Fretz y colaboradores apuntan que en osteoblastos la activación del VDR por CTR y su posterior unión a un VDRE, (elemento de respuesta de vitamina D) incrementa la expresión de LRP5 (Proteína 5 relacionada con el receptor de lipoproteínas de

baja densidad) (476), un correceptor de Wnt fundamental en la activación de β -Catenina que desempeña un importante papel en la formación de hueso (477).

En un trabajo llevado a cabo con ratones knockout para ApoE, Rajamannan y colaboradores concluyen que el colesterol alto aumenta la expresión de LRP5 y Runx2 y el desarrollo de calcificaciones (478). Además, Sheng y colaboradores indican que el colesterol activa selectivamente la ruta canónica Wnt/ β -Catenina sobre la ruta no canónica mediante el reclutamiento de Dishevelled (Dsh) y su interacción con otras proteínas (479). Es importante señalar que una región de la molécula de calcitriol mantiene cierta homología con una región de la molécula de colesterol, y que en dicha región es donde se introdujo el cambio molecular para generar la molécula de paricalcitol. Palmer y colaboradores demostraron que una serie de genes inducidos por β -Catenina son regulados a través de elementos de respuesta a la vitamina D. Estos autores sugieren que la activación combinada de VDR y de la vía Wnt/ β -Catenina promovía la formación de complejos TCF/LEF/ β -Catenina y VDR/ β -Catenina los cuales inducen conjuntamente la expresión de genes implicados en el desarrollo de tricofoliculomas (tumores del folículo capilar). Además, el análogo de la vitamina D, EB1089, sinergizó con β -Catenina para estimular la diferenciación capilar (480). Estos trabajos apoyan la hipótesis de que las interacciones entre VDR y β -Catenina puedan ejercer un papel fundamental en el desarrollo de otros procesos como la CV y, por lo tanto, puedan ser susceptibles de ser afectadas por la unión de distintos análogos de la vitamina D. El papel regulador de la señalización de Wnt en la CV ofrece la posibilidad de una intervención terapéutica apuntando a esta vía. Sin embargo, dado el papel central de la vía Wnt

en la regulación del crecimiento y el desarrollo en muchos tejidos, será necesario garantizar la seguridad de estas nuevas terapias (467).

Nuestros resultados sugieren efectos diferenciales del calcitriol y del paricalcitol en la CV que parecen estar mediados por una diferente regulación de la vía de señalización de BMP-2 y de la ruta Wnt/ β -Catenina. El CTR activa la ruta canónica Wnt/ β -Catenina, lo que parece estar asociado con el aumento de la calcificación, y con la estimulación de la expresión de genes de diferenciación osteoblástica como son BMP2, Runx2, Msx2, y OC. Por el contrario, el paricalcitol disminuye la actividad en la vía de señalización Wnt/ β -Catenina, lo que se acompañó de una disminución en la expresión de estos genes osteoblásticos y una menor calcificación.

El control del fósforo sérico es uno de los objetivos terapéuticos más importantes en el tratamiento de los pacientes con ERC, particularmente para la prevención de enfermedades cardiovasculares. Un efecto directo del fósforo como agente pro-inflamatorio y pro-oxidante sobre las CMLV podría ser responsable de la generación de daño cardiovascular.

Uno de los principales factores asociados al progreso y a la severidad de la ERC es la inflamación. Además, existe una relación causal entre inflamación y calcificación vascular (481, 482). Por otro lado, existen algunas evidencias que vinculan al estrés oxidativo con la aparición de las calcificaciones vasculares, considerándose éstas como un importante factor de riesgo de disfunción cardiovascular en pacientes con ERC (483, 484).

Dicho esto, otro de los principales objetivos del presente estudio fue evaluar si la exposición de las CMLV a niveles elevados de fosfato induce la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), si produce un aumento en el estado inflamatorio de estas células y si activa la expresión, así como la secreción, de citoquinas pro-inflamatorias e ICAM-1. Además, se propuso evaluar si el calcitriol o el paricalcitol pueden modular el estrés oxidativo y la inflamación inducidos por niveles elevados de fosfato.

Para la consecución de este objetivo se llevó a cabo el modelo de calcificación inducida por fosfato alto en CMLV previamente descrito en este estudio. A partir de este modelo se estudiaron diferentes eventos de carácter inflamatorio y oxidativo que pudieran ocurrir de manera concomitante con la CV.

Nuestros resultados mostraron que el fosfato induce la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), la activación de la vía de señalización de NF κ β y la expresión de la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF α . Además, la activación de VDR por calcitriol (10^{-8} M) y por paricalcitol (3×10^{-8} M) tuvo distintos efectos sobre estas respuestas. Por una parte, el calcitriol aumentó el efecto pro-oxidante del fosfato, indujo una mayor activación de NF- κ β y además propició un aumento de ICAM-1 y de la secreción de 2 de las citoquinas analizadas (IL-6 y TNF α); sin embargo, la expresión de las otras 2 citoquinas analizadas (IL-1 β e IL-8) mostró un ligero descenso respecto a las células tratadas con fosfato alto. Por otro lado, el tratamiento con paricalcitol produjo una inhibición tanto del efecto pro-inflamatorio como del efecto pro-oxidante del fosfato.

Estudios previos *in vivo* demostraron que la inflamación desencadena la calcificación cardiovascular y la osteogénesis de placas ateroscleróticas en estadios tempranos de la aterosclerosis (485). Además, es bien sabido que las citoquinas inflamatorias liberadas por los macrófagos aceleran el proceso de diferenciación osteogénica y de calcificación en las CMLV (486). Por otro lado, Nadra y colaboradores comprobaron en cultivos “*in vitro*” que los macrófagos son capaces de captar e internalizar nanocristales, lo cual desencadena una respuesta pro-inflamatoria mediada por la liberación de TNF α (487).

Una de las principales conclusiones de nuestro estudio es que el fosfato extracelular a una concentración elevada provoca, en las CMLV, un aumento en la producción de ICAM-1 y de las citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF-alfa). Los mecanismos celulares que subyacen al efecto del fosfato sobre la liberación de citoquinas se evaluaron mediante el estudio de la activación de la vía de señalización de NF κ β . En este sentido, hemos demostrado que el aumento en la expresión génica de ICAM-1 y de las citoquinas pro-inflamatorias se acompañó de la activación de la vía de señalización de NF κ β . Esta activación fue puesta de manifiesto a través del notable aumento en la translocación nuclear de dicho factor de transcripción respecto a las células control, visualizado mediante Western blot e inmunofluorescencia por microscopía confocal.

La expresión de ICAM-1 y de citoquinas pro-inflamatorias, así como la activación de NF κ β es consistente con una serie de evidencias anteriores que sugieren que las CMLV pueden potencialmente jugar un papel activo en la inflamación vascular (488, 489). Yang y colaboradores mostraron que en CMLV, el LPS era un potente inductor de la actividad de NF κ β y promovía la liberación

de la proteína quimioatrayente de monocito 1 (MCP-1) y de IL-6, así como estimulaba la expresión de IL-1 α (490). En un estudio reciente, Kiyan y colaboradores demuestran que la LDL oxidada reduce la expresión del fenotipo contráctil en CMLV e inducía la expresión de citoquinas dependientes de NF κ B, como son G-CSF y GM-CSF, IL-6, IL-8 y PAI-1. Esto a su vez, induce la producción de MCP-1 por monocitos y macrófagos, lo que sugiere un nuevo papel de las CMLV en la modulación activa de las funciones de los macrófagos (491). En base a nuestro conocimiento, nuestro estudio muestra por primera vez un efecto directo específico del fosfato sobre la inducción de la respuesta inflamatoria en CMLV a través de la vía de señalización canónica de NF κ B. Estos resultados amplían nuestra comprensión sobre cómo los niveles altos de fosfato, un elemento clave en el contexto de la enfermedad renal, afectan al sistema cardiovascular promoviendo la inflamación y el estrés oxidativo (3). En la ERC se ha descrito que la vitamina D produce efectos indeseados, como un aumento en los niveles de calcio y de fosfato séricos, que favorecen el desarrollo de CV. Sin embargo, otras funciones que pudiera ejercer la vitamina D, tales como la modulación de una respuesta inflamatoria, pueden tener un efecto beneficioso (492).

Se sabe que el CTR es un importante regulador del sistema inmune. Las células del sistema inmune no sólo expresan VDR sino que además sintetizan y liberan CTR, pudiendo actuar de manera autocrina (493, 494). En diferentes trabajos se ha descrito también al CTR como un elemento que ejerce efectos inmunomoduladores sobre distintos tipos de tumores (495, 496) y en general sobre patologías inflamatorias de diversa índole (497, 498). Para Li y colaboradores, los

efectos producidos por los activadores del VDR podrían ser llevados a cabo de manera directa sobre las CMLV, ser ejercidos a través de los macrófagos u ocurrir ambos efectos al mismo tiempo (499). Estos autores, mediante el uso de cocultivos de CMLV y de macrófagos, demostraron que los macrófagos activados favorecían el desarrollo de CV debido a la liberación de factores pro-calcificantes, tales como BMP-2 y TNF α , y a los bajos niveles de OPN, una molécula de carácter anticalcificante. Sin embargo, el calcitriol y el paricalcitol en estos cocultivos indujeron un cambio paracrino desde el fenotipo procalcificante al anticalcificante; de manera que disminuyó la producción de BMP-2 y de TNF α y aumentó la expresión de OPN (499). Además, se ha descrito en fibroblastos un efecto directo del VDR sobre la modulación de la actividad de NF κ B (500). En este mismo sentido, otros datos experimentales muestran que este efecto puede estar mediado bien a través de la interacción del VDR con NF κ B para inhibir su función (501) o por medio de la activación de I κ B α , un inhibidor de NF- κ B, ya que la supresión de VDR tal y como describen Wu et al, conlleva una reducción de los niveles celulares de I κ B α (502). Tukaj y colaboradores encontraron recientemente que el calcitriol a una concentración de 10^{-7} M protegía a las CMLV de un estado de inflamación inducido por un choque térmico estimulando la expresión de I κ B α , aunque dicha estimulación no influyera en los niveles totales de NF κ B. Además, el calcitriol tanto a 10^{-7} M como a 10^{-8} M, inducía la expresión de superóxido dismutasa (SOD) e inhibía también la secreción de citoquinas (IL-6 y TNF-alfa) (503).

En general, gran parte de la literatura describe al CTR como un inmunosupresor. Sin embargo, efectos contrarios a los expuestos anteriormente

han sido también descritos. Sun y Zemel describen al CTR como un potenciador del estrés oxidativo y como un activador de la inflamación. En condiciones fisiológicas, el CTR induce la producción de una batería de citoquinas proinflamatorias en adipocitos y en macrófagos derivados del tejido adiposo. En el caso de la obesidad, que ya se encuentra asociada a un estado basal de inflamación, el CTR induce una intercomunicación entre macrófagos y adipocitos que resulta en un incremento inapropiado del estrés oxidativo y en la secreción de citoquinas inflamatorias por parte de los macrófagos (504). Además, el CTR en concentraciones próximas a las fisiológicas inhibe el crecimiento celular de monocitos y los diferencia a macrófagos (505, 506). Esta diferenciación va asociada a un incremento en la actividad fagocítica y al aumento de la producción de anión superóxido (507). En un estudio muy reciente realizado en cocultivos de macrófagos, adipocitos y células de músculo esquelético, Choi y colaboradores han demostrado que el calcitriol (10^{-8} M) produce un incremento en la producción de citoquinas inflamatorias (TNF α , IL6) un descenso en las citoquinas antiinflamatorias (IL10, IL15) así como un aumento en la producción de EROs (508). Asimismo, Agharazii y colaboradores demostraron mediante un estudio realizado en ratas con ERC, que la calcificación inducida con una dieta alta en fosfato, alta en Ca y suplementada con calcitriol está mediada por un aumento de la secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF α ; y por un aumento en la generación de EROs (292).

Los resultados derivados de nuestro estudio mostraron que cuando las CMLV se incubaron con calcitriol se produjo un aumento adicional en la expresión de ICAM-1, IL-6 y TNF α , respecto de las células tratadas sólo con

fosfato. Sin embargo, la expresión de IL-1 β e IL-8 se redujo. Asimismo, el análisis de la secreción de las citoquinas analizadas confirmó el efecto del CTR sobre la expresión génica, siendo menor en el caso de la IL-8 e IL-1 β , y mayor en el caso de IL-6, TNF α e ICAM. Además, el tratamiento con CTR provocó un aumento en la activación de NF κ B respecto a las células tratadas con fosfato elevado.

Por otro lado, se ha comprobado que el paricalcitol ejerce propiedades anti-inflamatorias en procesos patológicos asociados al daño renal. Tan y colaboradores sugieren que el paricalcitol inhibe la infiltración de células T en el riñón en estado de inflamación y la expresión de RANTES, proteína que atrae a los linfocitos T memoria y a los monocitos, mediante el secuestro de NF κ B mediado por VDR (509). Para Park y colaboradores, el paricalcitol es capaz de suprimir factores inflamatorios a través de la inhibición del NF κ B y otras vías de señalización que conducen a la atenuación de la nefropatía inducida por ciclosporina A (510). Además, según Hwang y colaboradores el tratamiento con paricalcitol revierte entre otras citoquinas, la expresión de TNF α , IFN γ y IL-1 β en macrófagos y células T inducida por lesión asociada a la isquemia-reperfusión (511).

En nuestro estudio, el tratamiento con paricalcitol de las CMLV cultivadas con fosfato alto inhibe la expresión génica y la secreción de IL-1 β IL-6, IL-8 y TNF α así como la expresión de la citoquina de membrana ICAM. A tenor de este resultado se procedió a evaluar la activación del factor de transcripción NF κ B. Los resultados indicaron que el paricalcitol también inducía una inhibición sobre la activación de la vía de señalización de NF κ B.

El estrés oxidativo se define como la pérdida del equilibrio establecido entre la generación de elementos oxidantes y la actividad antioxidante en favor de los primeros. En general se acepta que el estado urémico produce un aumento neto del estrés oxidativo (483, 512, 513). El estrés oxidativo puede modular la respuesta inflamatoria a través de la inducción de la vía de señalización NFκβ y la producción de citoquinas pro-inflamatorias dependiente de EROs (514). Además, la producción de EROs puede ser estimulada por citoquinas pro-inflamatorias mediante la NADPH oxidasa (515). De hecho, en condiciones urémicas, se ha demostrado que los leucocitos potencian, de manera simultánea, la liberación de EROs y de citoquinas (516). Asimismo, algunas proteínas producidas por genes diana de la vía de señalización NFκβ son generadoras de EROs, como NOX2 que genera anión superóxido (517). Además, la generación de EROs promueve la fosforilación de IκB-α, inhibidor de NFκβ, para su degradación por proteólisis y la subsiguiente activación de NF-κβ (518).

Por otro lado, un aumento del estrés oxidativo se ha relacionado con el aumento de las calcificaciones en CMLV. Distintos autores han comprobado en un modelo *in vitro* de CMLV bovinas tratadas con beta-glicerolfosfato (BGP) y en un modelo de fallo renal inducido en ratas con dieta rica en adenina, que la calcificación inducida estuvo asociada con un aumento en la producción de EROs, la cual estaba mediado por la translocación nuclear de NFκβ (326, 327). Por otro lado, Mody y colaboradores comprobaron que el tratamiento de CMLV con H₂O₂ promovía la diferenciación osteogénica de CMLV(519), lo cual estuvo asociado con un aumento en la expresión de Runx2 y ALP (520) y potenció la actividad de fosfatasa alcalina (ALP) inducida por BMP-2 (483). Además, en las células del

músculo liso coronarias humanas, BMP-2 aumentó la actividad de la NADPH oxidasa y el estrés oxidativo induciendo la expresión de Runx2 y promoviendo la calcificación (521). Hay que señalar que, tal como dijimos anteriormente, en nuestro modelo de calcificación inducida por fosfato, observamos un aumento en la expresión de estos genes.

Los resultados de este estudio revelaron también que los niveles de EROs fueron significativamente más altos en las células expuestas a fosfato elevado respecto a las células control. Por lo tanto, nuestros resultados indican que el estrés oxidativo podría ser un mecanismo implicado en la desregulación de las CMLV inducida por el fosfato alto en pacientes con ERC.

Diversos trabajos reconocen al CTR como un elemento capaz de reducir la generación de EROs. Dong y colaboradores afirman que la activación del receptor de la vitamina D por el calcitriol mejora la función endotelial debido a la normalización en la expresión del receptor tipo 1 de la angiotensina II y a la prevención de la generación de EROs (522). Sin embargo, Sun y Zemel han descrito cómo el CTR inhibe en adipocitos la expresión de UCP2 (proteína desacoplante 2), enzima mitocondrial encargada de atenuar la acumulación de EROs, resultando en un aumento en la generación de EROs en la mitocondria (523). Asimismo, el CTR promueve la producción de EROs, la producción de citoquinas inflamatorias y la inhibición de citoquinas antiinflamatorias en cultivos de adipocitos de ratón y humanos. Además, en este mismo estudio, la inhibición de la producción del CTR por una dieta con alto contenido en Ca suprimió la producción de citoquinas asociadas a la obesidad por los adipocitos en ratones (524).

En nuestro estudio, la adición de calcitriol (10^{-8} M) a CMLV cultivadas *in vitro* con fosfato alto dio lugar a un incremento adicional en la producción de EROs respecto a las células tratadas sólo con fosfato. Sin embargo, cuando se añadió paricalcitol a las CMLV se produjo un descenso significativo de la producción de EROs. Nuestra observación es consistente con otros estudios previos que demuestran propiedades antioxidantes del paricalcitol. Ari y colaboradores demostraron que el paricalcitol reduce la nefropatía inducida por contraste a través de la inhibición de la peroxidación lipídica (525). Otros autores comprobaron que la terapia con paricalcitol y su combinación con Enalapril refuerza la protección contra el estrés oxidativo cardíaco (526) y renal (484) en ratas urémicas (526). En un estudio reciente en pacientes con ERC se ha observado que el paricalcitol no sólo disminuye los niveles de varios marcadores inflamatorios (PCR, IL-6, IL-8 y TNF), y aumenta los de la citoquina anti-inflamatoria IL-10, sino que además produce un descenso en los niveles basales de los marcadores de oxidación MDA, óxido nítrico (513).

Los resultados recogidos de la literatura indican que los efectos del CTR sobre el sistema inmune y el sistema REDOX son múltiples dependiendo de la dosis y el tiempo, así como del tipo de célula. Estudios previos ponen de manifiesto la necesidad de profundizar en los distintos efectos que pueda producir el CTR dependiendo de la concentración a la que se encuentre. Mathew y colaboradores llevaron a cabo un estudio con ratones urémicos LDLR^{-/-} donde comprobaron que altas dosis de CTR producen una mayor transición fenotípica hacia osteoblasto, una mayor calcificación y mayor producción de proteínas promineralizantes en CMLV; sin embargo, dosis pequeñas de CTR tienen un

efecto protector frente a las calcificaciones (125). Shroff y colaboradores mostraron una asociación bimodal entre los niveles de CTR y la enfermedad vascular en un estudio llevado a cabo en una población pediátrica en diálisis. Así, siguiendo una distribución en “forma de U”, tanto niveles plasmáticos bajos como altos de Vitamina D se asociaron con una mayor calcificación y cambios morfológicos adversos en las arterias mayores; siendo menor dicha calcificación en pacientes con niveles normales de CTR en sangre (527). Asimismo, en otro estudio reciente se ha encontrado una asociación entre los niveles séricos de vitamina D y los marcadores de inflamación en la población general adulta, encontrándose de nuevo una asociación en forma de U entre los niveles de 25(OH)D y los de PCR (528).

En base a estas afirmaciones y para poder explicar nuestra observación de que el CTR actúa como un elemento proinflamatorio en las CMLV tratadas con fosfato alto, contrariamente a lo que promulgan multitud de trabajos previos a este estudio descritos anteriormente, se llevaron a cabo una serie de experimentos con distintas dosis de CTR para valorar su efecto sobre el estado inflamatorio y la generación de EROs en CMLV expuestas a P alto.

Nuestros resultados demuestran que el CTR lleva a cabo distintos efectos sobre las CMLV dependiendo de la concentración a la que se encuentre en el medio de cultivo. Como se ha descrito previamente en este trabajo, cuando las CMLV son cultivadas en un medio con 10^{-8} M de CTR, el resultado es un mayor aumento del estrés oxidativo y, en general, del estado de inflamación respecto a los niveles inducidos por fosfato alto. Sin embargo, el resultado obtenido cuando se añadió CTR en concentraciones sensiblemente más bajas (10^{-10} M o 10^{-12} M)

fue un efecto anti-oxidante, generando una menor cantidad de EROs, y un efecto anti-inflamatorio, inhibiendo la vía de señalización de NFκβ canónica y reprimiendo la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias analizadas (IL-1β, IL-6, IL-8 y TNFα) y de ICAM-1.

En conclusión, nuestros resultados indican que el fosfato alto ejerce un efecto directo sobre las CMLV induciendo el desarrollo de calcificación mediante la activación de la ruta canónica Wnt/β-Catenina, y actúa al mismo tiempo como un elemento capaz de aumentar la generación de EROs y de activar la ruta canónica de NFκβ, induciendo así un estrés oxidativo y un estado pro-inflamatorio en dichas células. El estado de inflamación originado en las CMLV se traduce en un aumento de la producción de citoquinas, como IL-1β, IL-6, IL-8 y TNF-alfa, y de la molécula de adhesión celular ICAM-1. La adición de CTR a una concentración de 10^{-8} M en estas mismas condiciones de fosfato alto resulta en una mayor activación de la ruta canónica Wnt/β-Catenina y en consecuencia de la calcificación, efectos que van acompañados de una mayor generación de EROs y en una mayor activación de NFκβ. Esta activación de NFκβ está fuertemente relacionada con procesos asociados a la calcificación y explicaría el aumento en la expresión de ICAM-1 y de algunas de las citoquinas analizadas (IL-6 y TNFα) respecto a las células tratadas con fosfato. En cambio, cuando las CMLV son tratadas con concentraciones menores de CTR (10^{-10} M y 10^{-12} M), se produce la disminución tanto en la generación de EROs como en la respuesta proinflamatoria inducida por el fosfato. Esta inhibición del estado de inflamación se traduce en una menor activación de la vía de señalización de NFκβ y en una menor expresión de citoquinas pro-inflamatorias.

Por otro lado, el tratamiento de las CMLV con paricalcitol, además de inhibir el desarrollo de la calcificación inducida por el fosfato alto mediante la inactivación de la ruta Wnt/ β -Catenina, fue también capaz de contrarrestar su efecto pro-oxidante y pro-inflamatorio, a través de la inhibición de NF κ β y, en consecuencia, de la reducción de ICAM-1 y de las citoquinas pro-inflamatorias analizadas (IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF α).

En conjunto, nuestros resultados “*in vitro*” apoyan la conveniencia de una terapia frente a la inflamación y el estrés oxidativo para prevenir las complicaciones cardiovasculares en los pacientes con ERC. En este sentido, y de acuerdo a nuestros resultados, el paricalcitol así como las dosis más bajas de calcitriol (10^{-10} , 10^{-12} M) cumplen estos requerimientos simultáneamente. Sin embargo, el hecho de que niveles más elevados de calcitriol (10^{-8} M) produzcan resultados opuestos así como un aumento en el desarrollo de las calcificaciones, implica la necesidad de llevar a cabo un minucioso control de las dosis empleadas del CTR en relación a la salud vascular.

CONCLUSIONES

1. En cultivos de Células de Músculo Liso Vascular (CMLV), niveles elevados de fosfato inducen el desarrollo de calcificación y diferenciación a células de estirpe osteogénica mediante la activación de la ruta canónica Wnt/ β -Catenina.
2. La adición de calcitriol (10^{-8} M) a CMLV cultivadas en condiciones de alto fosfato, produce una sobreactivación de la ruta Wnt/ β -Catenina, resultando en una mayor calcificación y diferenciación osteogénica.
3. En CMLV, el paricalcitol inhibe la activación de la ruta Wnt/ β -Catenina, reduce el grado de calcificación y la transdiferenciación osteogénica inducidos por niveles elevados de fosfato.
4. En este mismo modelo in vitro, los niveles elevados de fosfato inducen un incremento en la producción de EROs, la activación de NF κ β y un aumento en la expresión de marcadores inflamatorios.
5. La adición de calcitriol (10^{-8} M) a CMLV incubadas con fosfato elevado incrementa la producción de EROs, la activación de NF κ β y la expresión de los marcadores inflamatorios ICAM-1, IL-6 y TNF α . Por el contrario, el tratamiento con dosis más bajas de calcitriol (10^{-10} y 10^{-12} M) supone una reducción del estado inflamatorio y del estrés oxidativo inducidos por el fosfato.
6. El tratamiento con Paricalcitol de las CMLV cultivadas con niveles elevados de fosfato inhibe el estrés oxidativo, la activación de NF κ β y la expresión de citoquinas inflamatorias.

Por tanto, en base a todo lo expuesto anteriormente, los resultados de este estudio describen nuevos mecanismos por los que el fosfato elevado favorece la disfunción vascular y apoyan la conveniencia de una terapia frente a la calcificación, la inflamación y el estrés oxidativo mediante el uso de análogos de la vitamina D para prevenir las complicaciones cardiovasculares en los pacientes con ERC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tonelli M, Wiebe N, Culleton B, House A, Rabbat C, Fok M, et al. Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review. *J Am Soc Nephrol JASN*. julio de 2006;17(7):2034-47.
2. Mitsnefes MM. Cardiovascular disease in children with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol JASN*. abril de 2012;23(4):578-85.
3. Mizobuchi M, Towler D, Slatopolsky E. Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol JASN*. julio de 2009;20(7):1453-64.
4. Massy ZA, Drüeke TB. Magnesium and outcomes in patients with chronic kidney disease: focus on vascular calcification, atherosclerosis and survival. *Clin Kidney J*. 2 de enero de 2012;5(Suppl 1):i52-61.
5. Prié D, Friedlander G. Reciprocal control of 1,25-dihydroxyvitamin D and FGF23 formation involving the FGF23/Klotho system. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. septiembre de 2010;5(9):1717-22.
6. Burnett S-AM, Gunawardene SC, Bringham FR, Jüppner H, Lee H, Finkelstein JS. Regulation of C-terminal and intact FGF-23 by dietary phosphate in men and women. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. agosto de 2006;21(8):1187-96.
7. Ferrari SL, Bonjour J-P, Rizzoli R. Fibroblast growth factor-23 relationship to dietary phosphate and renal phosphate handling in healthy young men. *J Clin Endocrinol Metab*. marzo de 2005;90(3):1519-24.
8. London GM, Pannier B, Marchais SJ, Guerin AP. Calcification of the aortic valve in the dialyzed patient. *J Am Soc Nephrol JASN*. abril de 2000;11(4):778-83.
9. Shigematsu T, Kono T, Satoh K, Yokoyama K, Yoshida T, Hosoya T, et al. Phosphate overload accelerates vascular calcium deposition in end-stage renal disease patients. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. junio de 2003;18 Suppl 3:iii86-9.
10. Block GA. Prevalence and clinical consequences of elevated Ca x P product in hemodialysis patients. *Clin Nephrol*. octubre de 2000;54(4):318-24.
11. Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK. Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. abril de 1998;31(4):607-17.
12. Shobeiri N, Adams MA, Holden RM. Phosphate: an old bone molecule but new cardiovascular risk factor. *Br J Clin Pharmacol*. 1 de enero de 2014;77(1):39-54.
13. Cross HS, Debiec H, Peterlik M. Mechanism and regulation of intestinal phosphate absorption. *Miner Electrolyte Metab*. 1990;16(2-3):115-24.

14. Murer H, Hernando N, Forster I, Biber J. Regulation of Na/Pi transporter in the proximal tubule. *Annu Rev Physiol.* 2003;65:531-42.
15. Hruska KA, Mathew S, Lund R, Qiu P, Pratt R. Hyperphosphatemia of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int.* julio de 2008;74(2):148-57.
16. Prié D, Torres PU, Friedlander G. Latest findings in phosphate homeostasis. *Kidney Int.* 4 de febrero de 2009;75(9):882-9.
17. Hu MC, Shi M, Zhang J, Pastor J, Nakatani T, Lanske B, et al. Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* septiembre de 2010;24(9):3438-50.
18. Kestenbaum B. Phosphate metabolism in the setting of chronic kidney disease: significance and recommendations for treatment. *Semin Dial.* agosto de 2007;20(4):286-94.
19. Koh N, Fujimori T, Nishiguchi S, Tamori A, Shiomi S, Nakatani T, et al. Severely reduced production of klotho in human chronic renal failure kidney. *Biochem Biophys Res Commun.* 2 de febrero de 2001;280(4):1015-20.
20. Isakova T, Wahl P, Vargas GS, Gutiérrez OM, Scialla J, Xie H, et al. Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney Int.* junio de 2011;79(12):1370-8.
21. Renkema KY, Alexander RT, Bindels RJ, Hoenderop JG. Calcium and phosphate homeostasis: concerted interplay of new regulators. *Ann Med.* 2008;40(2):82-91.
22. Chang Q, Hoefs S, van der Kemp AW, Topala CN, Bindels RJ, Hoenderop JG. The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science.* 21 de octubre de 2005;310(5747):490-3.
23. Koenig KG, Lindberg JS, Zerwekh JE, Peralta DM, Cushner HM, Copley JB. Free and total 1,25-dihydroxyvitamin D levels in subjects with renal disease. *Kidney Int.* enero de 1992;41(1):161-5.
24. Moe SM, Drüeke TB. Management of secondary hyperparathyroidism: the importance and the challenge of controlling parathyroid hormone levels without elevating calcium, phosphorus, and calcium-phosphorus product. *Am J Nephrol.* diciembre de 2003;23(6):369-79.
25. Slatopolsky E, Brown A, Dusso A. Calcium, phosphorus and vitamin D disorders in uremia. *Contrib Nephrol.* 2005;149:261-71.
26. Almaden Y, Canalejo A, Hernandez A, Ballesteros E, Garcia-Navarro S, Torres A, et al. Direct effect of phosphorus on PTH secretion from whole rat parathyroid glands in vitro. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* julio de 1996;11(7):970-6.

27. Canalejo A, Canalejo R, Rodríguez ME, Martínez-Moreno JM, Felsenfeld AJ, Rodríguez M, et al. Development of parathyroid gland hyperplasia without uremia: role of dietary calcium and phosphate. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. abril de 2010;25(4):1087-97.
28. Moe SM. Disorders involving calcium, phosphorus, and magnesium. *Prim Care*. junio de 2008;35(2):215-37, v - vi.
29. Silver J, Naveh-Many T. FGF-23 and secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. noviembre de 2013;9(11):641-9.
30. López I, Rodríguez-Ortiz ME, Almadén Y, Guerrero F, de Oca AM, Pineda C, et al. Direct and indirect effects of parathyroid hormone on circulating levels of fibroblast growth factor 23 in vivo. *Kidney Int*. septiembre de 2011;80(5):475-82.
31. Rodríguez M, Canalejo A, Garfía B, Aguilera E, Almadén Y. Pathogenesis of refractory secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int Suppl*. mayo de 2002;(80):155-60.
32. Liu S, Tang W, Zhou J, Stubbs JR, Luo Q, Pi M, et al. Fibroblast Growth Factor 23 Is a Counter-Regulatory Phosphaturic Hormone for Vitamin D. *J Am Soc Nephrol*. 5 de enero de 2006;17(5):1305-15.
33. Stubbs JR, Liu S, Tang W, Zhou J, Wang Y, Yao X, et al. Role of hyperphosphatemia and 1,25-dihydroxyvitamin D in vascular calcification and mortality in fibroblastic growth factor 23 null mice. *J Am Soc Nephrol JASN*. julio de 2007;18(7):2116-24.
34. Canalejo R, Canalejo A, Martínez-Moreno JM, Rodríguez-Ortiz ME, Estepa JC, Mendoza FJ, et al. FGF23 fails to inhibit uremic parathyroid glands. *J Am Soc Nephrol JASN*. julio de 2010;21(7):1125-35.
35. Takeshita K, Fujimori T, Kurotaki Y, Honjo H, Tsujikawa H, Yasui K, et al. Sinoatrial node dysfunction and early unexpected death of mice with a defect of *klotho* gene expression. *Circulation*. 13 de abril de 2004;109(14):1776-82.
36. Nemere I. The ins and outs of phosphate homeostasis. *Kidney Int*. julio de 2007;72(2):140-2.
37. Westerberg P-A, Linde T, Wikström B, Ljunggren O, Stridsberg M, Larsson TE. Regulation of fibroblast growth factor-23 in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. noviembre de 2007;22(11):3202-7.
38. Schuman M, Sun Z. Abstract 521: Upregulation of Fibroblast Growth Factor 23 Contributes to *Klotho* Gene Deficiency-induced. Hypertension. 9 de enero de 2013;62(3_MeetingAbstracts):A521.

39. Vervloet MG, Larsson TE. Fibroblast growth factor-23 and Klotho in chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* septiembre de 2011;1(4):130-5.
40. Memon F, El-Abbadi M, Nakatani T, Taguchi T, Lanske B, Razzaque MS. Does Fgf23-klotho activity influence vascular and soft tissue calcification through regulating mineral ion metabolism? *Kidney Int.* septiembre de 2008;74(5):566-70.
41. Foley RN, Parfrey PS. Cardiovascular disease and mortality in ESRD. *J Nephrol.* octubre de 1998;11(5):239-45.
42. Weiner DE, Tighiouart H, Amin MG, Stark PC, MacLeod B, Griffith JL, et al. Chronic Kidney Disease as a Risk Factor for Cardiovascular Disease and All-Cause Mortality: A Pooled Analysis of Community-Based Studies. *J Am Soc Nephrol.* 5 de enero de 2004;15(5):1307-15.
43. Khan AM, Chirinos JA, Litt H, Yang W, Rosas SE. FGF-23 and the progression of coronary arterial calcification in patients new to dialysis. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* diciembre de 2012;7(12):2017-22.
44. Giachelli CM. The emerging role of phosphate in vascular calcification. *Kidney Int.* mayo de 2009;75(9):890-7.
45. Rumberger JA, Simons DB, Fitzpatrick LA, Sheedy PF, Schwartz RS. Coronary artery calcium area by electron-beam computed tomography and coronary atherosclerotic plaque area. A histopathologic correlative study. *Circulation.* 15 de octubre de 1995;92(8):2157-62.
46. Sangiorgi G, Rumberger JA, Severson A, Edwards WD, Gregoire J, Fitzpatrick LA, et al. Arterial calcification and not lumen stenosis is highly correlated with atherosclerotic plaque burden in humans: a histologic study of 723 coronary artery segments using nondecalcifying methodology. *J Am Coll Cardiol.* enero de 1998;31(1):126-33.
47. Burke AP, Taylor A, Farb A, Malcom GT, Virmani R. Coronary calcification: insights from sudden coronary death victims. *Z Für Kardiologie.* 2000;89 Suppl 2:49-53.
48. Fitzgerald PJ, Ports TA, Yock PG. Contribution of localized calcium deposits to dissection after angioplasty. An observational study using intravascular ultrasound. *Circulation.* julio de 1992;86(1):64-70.
49. BEADENKOPF WG, DAOUD AS, LOVE BM. CALCIFICATION IN THE CORONARY ARTERIES AND ITS RELATIONSHIP TO ARTERIOSCLEROSIS AND MYOCARDIAL INFARCTION. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med.* octubre de 1964;92:865-71.
50. Loecker TH, Schwartz RS, Cotta CW, Hickman JR Jr. Fluoroscopic coronary artery calcification and associated coronary disease in asymptomatic young men. *J Am Coll Cardiol.* mayo de 1992;19(6):1167-72.

51. Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, London GM. Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension*. octubre de 2001;38(4):938-42.
52. London GM, Guérin AP, Marchais SJ, Métivier F, Pannier B, Adda H. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. septiembre de 2003;18(9):1731-40.
53. Lee C-T, Huang C-C, Hsu C-Y, Chiou TT-Y, Ng H-Y, Wu C-H, et al. Calcification of the aortic arch predicts cardiovascular and all-cause mortality in chronic hemodialysis patients. *Cardiorenal Med*. abril de 2014;4(1):34-42.
54. Virchow R. Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries. 1858. *Nutr Rev*. enero de 1989;47(1):23-5.
55. Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Mönckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation*. 23 de noviembre de 1999;100(21):2168-76.
56. Moe SM, Chen NX. Pathophysiology of vascular calcification in chronic kidney disease. *Circ Res*. 17 de septiembre de 2004;95(6):560-7.
57. Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation*. 3 de junio de 2008;117(22):2938-48.
58. Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebbersold R, et al. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res*. 7 de diciembre de 2001;89(12):1147-54.
59. Tintut Y, Alfonso Z, Saini T, Radcliff K, Watson K, Boström K, et al. Multilineage potential of cells from the artery wall. *Circulation*. 18 de noviembre de 2003;108(20):2505-10.
60. Yang H, Curinga G, Giachelli CM. Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro. *Kidney Int*. diciembre de 2004;66(6):2293-9.
61. Towler DA. Inorganic pyrophosphate: a paracrine regulator of vascular calcification and smooth muscle phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. abril de 2005;25(4):651-4.
62. Vattikuti R, Towler DA. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. mayo de 2004;286(5):E686-96.
63. Small JV, Sobieszek A. Studies on the function and composition of the 10-NM(100-A) filaments of vertebrate smooth muscle. *J Cell Sci*. febrero de 1977;23:243-68.

64. Zhang JC, Kim S, Helmke BP, Yu WW, Du KL, Lu MM, et al. Analysis of SM22alpha-deficient mice reveals unanticipated insights into smooth muscle cell differentiation and function. *Mol Cell Biol.* febrero de 2001;21(4):1336-44.
65. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* julio de 2004;84(3):767-801.
66. Rensen SSM, Doevendans PAFM, van Eys GJJM. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J Mon J Neth Soc Cardiol Neth Heart Found.* 2007;15(3):100-8.
67. Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev.* julio de 1995;75(3):487-517.
68. Zhang JC, Kim S, Helmke BP, Yu WW, Du KL, Lu MM, et al. Analysis of SM22alpha-deficient mice reveals unanticipated insights into smooth muscle cell differentiation and function. *Mol Cell Biol.* febrero de 2001;21(4):1336-44.
69. Kaplan-Albuquerque N, Garat C, Van Putten V, Nemenoff RA. Regulation of SM22 alpha expression by arginine vasopressin and PDGF-BB in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* octubre de 2003;285(4):H1444-52.
70. Adelstein RS, Hathaway DR. Role of calcium and cyclic adenosine 3':5' monophosphate in regulating smooth muscle contraction. Mechanisms of excitation-contraction coupling in smooth muscle. *Am J Cardiol.* 22 de octubre de 1979;44(5):783-7.
71. Somlyo AP. Excitation-contraction coupling and the ultrastructure of smooth muscle. *Circ Res.* octubre de 1985;57(4):497-507.
72. Wang N, Yang J, Yu X, Hu J, Xing C, Ju X, et al. Radial artery calcification in end-stage renal disease patients is associated with deposition of osteopontin and diminished expression of alpha-smooth muscle actin. *Nephrol Carlton Vic.* octubre de 2008;13(5):367-75.
73. Kolakowski J, Karkucińska A, Dąbrowska R. Calponin Inhibits Actin-Activated MgATPase of Myosin Subfragment 1 (S1) Without Displacing S1 from Its Binding Site on Actin. *Eur J Biochem.* 1 de febrero de 1997;243(3):624-9.
74. Yoshikawa H, Taniguchi SI, Yamamura H, Mori S, Sugimoto M, Miyado K, et al. Mice lacking smooth muscle calponin display increased bone formation that is associated with enhancement of bone morphogenetic protein responses. *Genes Cells Devoted Mol Cell Mech.* octubre de 1998;3(10):685-95.
75. Shanahan CM, Weissberg PL, Metcalfe JC. Isolation of gene markers of differentiated and proliferating vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* julio de 1993;73(1):193-204.

76. Shanahan CM, Cary NR, Metcalfe JC, Weissberg PL. High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* junio de 1994;93(6):2393-402.
77. Shioi A, Katagi M, Okuno Y, Mori K, Jono S, Koyama H, 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. *Circ Res.* 12 de julio de 2002;91(1):9-16.
78. Feil S, Hofmann F, Feil R. SM22alpha modulates vascular smooth muscle cell phenotype during atherogenesis. *Circ Res.* 16 de abril de 2004;94(7):863-5.
79. Ibels LS, Alfrey AC, Huffer WE, Craswell PW, Anderson JT, Weil R 3rd. Arterial calcification and pathology in uremic patients undergoing dialysis. *Am J Med.* mayo de 1979;66(5):790-6.
80. Schwarz U, Buzello M, Ritz E, Stein G, Raabe G, Wiest G, et al. Morphology of coronary atherosclerotic lesions in patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* febrero de 2000;15(2):218-23.
81. Burke AP, Taylor A, Farb A, Malcom GT, Virmani R. Coronary calcification: insights from sudden coronary death victims. *Z Für Kardiologie.* 2000;89 Suppl 2:49-53.
82. Edmonds ME, Morrison N, Laws JW, Watkins PJ. Medial arterial calcification and diabetic neuropathy. *Br Med J Clin Res Ed.* 27 de marzo de 1982;284(6320):928-30.
83. Coll B, Betriu A, Martinez-Alonso M, Amoedo ML, Arcidiacono MV, Borrás M, et al. Large Artery Calcification on Dialysis Patients Is Located in the Intima and Related to Atherosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* febrero de 2011;6(2):303-10.
84. Hunt JL, Fairman R, Mitchell ME, Carpenter JP, Golden M, Khalapyan T, et al. Bone formation in carotid plaques: a clinicopathological study. *Stroke J Cereb Circ.* mayo de 2002;33(5):1214-9.
85. Lehto S, Niskanen L, Suhonen M, Rönnemaa T, Laakso M. Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* agosto de 1996;16(8):978-83.
86. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 14 de septiembre de 2000;407(6801):233-41.
87. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 19 de diciembre de 2002;420(6917):868-74.
88. Badimon L, Badimon JJ, Cohen M, Chesebro JH, Fuster V. Vessel wall-related risk factors in acute vascular events. *Drugs.* 1991;42 Suppl 5:1-9.
89. Detrano RC, Doherty TM, Davies MJ, Satory HC. Predicting coronary events with coronary calcium: pathophysiologic and clinical problems. *Curr Probl Cardiol.* junio de 2000;25(6):374-402.

90. Jeziorska M, McCollum C, Wooley DE. Observations on bone formation and remodelling in advanced atherosclerotic lesions of human carotid arteries. *Virchows Arch Int J Pathol.* diciembre de 1998;433(6):559-65.
91. Micheletti RG, Fishbein GA, Currier JS, Fishbein MC. Mönckeberg sclerosis revisited: a clarification of the histologic definition of Mönckeberg sclerosis. *Arch Pathol Lab Med.* enero de 2008;132(1):43-7.
92. Hruska K, Mathew S, Lund R, Fang Y, Sugatani T. Cardiovascular risk factors in chronic kidney disease: does phosphate qualify? *Kidney Int.* abril de 2011;79(S121):S9-13.
93. Ahmed S, O'Neill KD, Hood AF, Evan AP, Moe SM. Calciphylaxis is associated with hyperphosphatemia and increased osteopontin expression by vascular smooth muscle cells. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* junio de 2001;37(6):1267-76.
94. Goodman WG. Vascular calcification in chronic renal failure. *Lancet.* 6 de octubre de 2001;358(9288):1115-6.
95. Giachelli CM. Vascular calcification mechanisms. *J Am Soc Nephrol JASN.* diciembre de 2004;15(12):2959-64.
96. Kapustin AN, Davies JD, Reynolds JL, McNair R, Jones GT, Sidibe A, et al. Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization. *Circ Res.* 24 de junio de 2011;109(1):e1-12.
97. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, 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. *J Am Soc Nephrol JASN.* noviembre de 2004;15(11):2857-67.
98. Larsson TE, Olauson H, Hagström E, Ingelsson E, Arnlöv J, Lind L, et al. Conjoint effects of serum calcium and phosphate on risk of total, cardiovascular, and noncardiovascular mortality in the community. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* febrero de 2010;30(2):333-9.
99. Yamada K, Fujimoto S, Nishiura R, Komatsu H, Tatsumoto M, Sato Y, et al. Risk factors of the progression of abdominal aortic calcification in patients on chronic haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* julio de 2007;22(7):2032-7.
100. West SL, Swan VJD, Jamal SA. Effects of calcium on cardiovascular events in patients with kidney disease and in a healthy population. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* enero de 2010;5 Suppl 1:S41-7.
101. Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie EG, Chertow GM. Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol JASN.* agosto de 2004;15(8):2208-18.

102. Block GA, Raggi P, Bellasi A, Kooienga L, Spiegel DM. Mortality effect of coronary calcification and phosphate binder choice in incident hemodialysis patients. *Kidney Int.* marzo de 2007;71(5):438-41.
103. Russo D, Miranda I, Ruocco C, Battaglia Y, Buonanno E, Manzi S, et al. The progression of coronary artery calcification in predialysis patients on calcium carbonate or sevelamer. *Kidney Int.* noviembre de 2007;72(10):1255-61.
104. Toussaint ND, Lau KK, Polkinghorne KR, Kerr PG. Attenuation of aortic calcification with lanthanum carbonate versus calcium-based phosphate binders in haemodialysis: A pilot randomized controlled trial. *Nephrol Carlton Vic.* marzo de 2011;16(3):290-8.
105. Suki WN, Zabaneh R, Cangiano JL, Reed J, Fischer D, Garrett L, et al. Effects of sevelamer and calcium-based phosphate binders on mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int.* noviembre de 2007;72(9):1130-7.
106. Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* julio de 2004;24(7):1161-70.
107. Giachelli CM, Speer MY, Li X, Rajachar RM, Yang H. Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin. *Circ Res.* 15 de abril de 2005;96(7):717-22.
108. Montes de Oca A, Madueño JA, Martínez-Moreno JM, Guerrero F, Muñoz-Castañeda J, Rodríguez-Ortiz ME, et al. High-phosphate-induced calcification is related to SM22 α promoter methylation in vascular smooth muscle cells. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* septiembre de 2010;25(9):1996-2005.
109. Villa-Bellosta R, Millan A, Sorribas V. Role of calcium-phosphate deposition in vascular smooth muscle cell calcification. *Am J Physiol Cell Physiol.* enero de 2011;300(1):C210-20.
110. Zheng C-M, Lu K-C, Wu C-C, Hsu Y-H, Lin Y-F. Association of Serum Phosphate and Related Factors in ESRD-Related Vascular Calcification. *Int J Nephrol.* 2011;2011:939613.
111. Moe SM, O'Neill KD, Duan D, Ahmed S, Chen NX, Leapman SB, et al. Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins. *Kidney Int.* febrero de 2002;61(2):638-47.
112. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, et al. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res.* 29 de septiembre de 2000;87(7):E10-7.
113. Li X, Yang H-Y, Giachelli CM. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res.* 14 de abril de 2006;98(7):905-12.

114. Mizobuchi M, Ogata H, Hatamura I, Koiwa F, Saji F, Shiizaki K, et al. Up-regulation of Cbfa1 and Pit-1 in calcified artery of uraemic rats with severe hyperphosphataemia and secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* abril de 2006;21(4):911-6.
115. Nielsen LB, Pedersen FS, Pedersen L. Expression of type III sodium-dependent phosphate transporters/retroviral receptors mRNAs during osteoblast differentiation. *Bone.* febrero de 2001;28(2):160-6.
116. Villa-Belosta R, Sorribas V. Phosphonoformic acid prevents vascular smooth muscle cell calcification by inhibiting calcium-phosphate deposition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* mayo de 2009;29(5):761-6.
117. Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, Morii H. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide. *Circulation.* 29 de septiembre de 1998;98(13):1302-6.
118. Cozzolino M, Dusso AS, Slatopolsky E. Role of calcium-phosphate product and bone-associated proteins on vascular calcification in renal failure. *J Am Soc Nephrol JASN.* noviembre de 2001;12(11):2511-6.
119. Merke J, Hofmann W, Goldschmidt D, Ritz E. Demonstration of 1,25(OH)₂ vitamin D3 receptors and actions in vascular smooth muscle cells in vitro. *Calcif Tissue Int.* agosto de 1987;41(2):112-4.
120. Cardús A, Panizo S, Parisi E, Fernandez E, Valdivielso JM. Differential effects of vitamin D analogs on vascular calcification. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* junio de 2007;22(6):860-6.
121. Lopez I, Mendoza FJ, Guerrero F, Almaden Y, Henley C, Aguilera-Tejero E, et al. The calcimimetic AMG 641 accelerates regression of extraosseous calcification in uremic rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* junio de 2009;296(6):F1376-85.
122. Mendoza FJ, Lopez I, Montes de Oca A, Perez J, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E. Metabolic acidosis inhibits soft tissue calcification in uremic rats. *Kidney Int.* febrero de 2008;73(4):407-14.
123. Mizobuchi M, Finch JL, Martin DR, Slatopolsky E. Differential effects of vitamin D receptor activators on vascular calcification in uremic rats. *Kidney Int.* septiembre de 2007;72(6):709-15.
124. Lopez I, Mendoza FJ, Aguilera-Tejero E, Perez J, Guerrero F, Martin D, et al. The effect of calcitriol, paricalcitol, and a calcimimetic on extraosseous calcifications in uremic rats. *Kidney Int.* febrero de 2008;73(3):300-7.
125. Mathew S, Lund RJ, Chaudhary LR, Geurs T, Hruska KA. Vitamin D receptor activators can protect against vascular calcification. *J Am Soc Nephrol JASN.* agosto de 2008;19(8):1509-19.

126. Chen NX, O'Neill KD, Duan D, Moe SM. Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. *Kidney Int.* noviembre de 2002;62(5):1724-31.
127. Ito S, Higuchi Y, Yagi Y, Nishijima F, Yamato H, Ishii H, et al. Reduction of indoxyl sulfate by AST-120 attenuates monocyte inflammation related to chronic kidney disease. *J Leukoc Biol.* junio de 2013;93(6):837-45.
128. Adijiang A, Goto S, Uramoto S, Nishijima F, Niwa T. Indoxyl sulphate promotes aortic calcification with expression of osteoblast-specific proteins in hypertensive rats. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* junio de 2008;23(6):1892-901.
129. Chang M-C, Chang H-H, Chan C-P, Yeung S-Y, Hsien H-C, Lin B-R, et al. p-Cresol affects reactive oxygen species generation, cell cycle arrest, cytotoxicity and inflammation/atherosclerosis-related modulators production in endothelial cells and mononuclear cells. *PLoS One.* 2014;9(12):e114446.
130. Liabeuf S, Drüeke TB, Massy ZA. Protein-bound uremic toxins: new insight from clinical studies. *Toxins.* julio de 2011;3(7):911-9.
131. Tintut Y, Patel J, Parhami F, Demer LL. Tumor necrosis factor-alpha promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation.* 21 de noviembre de 2000;102(21):2636-42.
132. Tintut Y, Patel J, Territo M, Saini T, Parhami F, Demer LL. Monocyte/macrophage regulation of vascular calcification in vitro. *Circulation.* 5 de febrero de 2002;105(5):650-5.
133. Li X, Massa PE, Hanidu A, Peet GW, Aro P, Savitt A, et al. IKKalpha, IKKbeta, and NEMO/IKKgamma are each required for the NF-kappa B-mediated inflammatory response program. *J Biol Chem.* 22 de noviembre de 2002;277(47):45129-40.
134. Nadra I, Mason JC, Philippidis P, Florey O, Smythe CDW, McCarthy GM, et al. Proinflammatory activation of macrophages by basic calcium phosphate crystals via protein kinase C and MAP kinase pathways: a vicious cycle of inflammation and arterial calcification? *Circ Res.* 24 de junio de 2005;96(12):1248-56.
135. Tanaka T, Sato H, Doi H, Yoshida CA, Shimizu T, Matsui H, et al. Runx2 represses myocardin-mediated differentiation and facilitates osteogenic conversion of vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Biol.* febrero de 2008;28(3):1147-60.
136. Blyth K, Cameron ER, Neil JC. The RUNX genes: gain or loss of function in cancer. *Nat Rev Cancer.* mayo de 2005;5(5):376-87.
137. Ito Y. Oncogenic potential of the RUNX gene family: «overview». *Oncogene.* 24 de mayo de 2004;23(24):4198-208.

138. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 30 de mayo de 1997;89(5):747-54.
139. Ducy P. *Cbfa1*: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat*. diciembre de 2000;219(4):461-71.
140. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*. 30 de mayo de 1997;89(5):755-64.
141. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, et al. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*. 30 de mayo de 1997;89(5):765-71.
142. Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, et al. *Msx2* deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet*. abril de 2000;24(4):391-5.
143. Tribioli C, Lufkin T. The murine *Bapx1* homeobox gene plays a critical role in embryonic development of the axial skeleton and spleen. *Dev Camb Engl*. diciembre de 1999;126(24):5699-711.
144. Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, et al. A *Cbfa1*-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev*. 15 de abril de 1999;13(8):1025-36.
145. Hruska KA, Mathew S, Saab G. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circ Res*. 22 de julio de 2005;97(2):105-14.
146. Galvin KM, Donovan MJ, Lynch CA, Meyer RI, Paul RJ, Lorenz JN, et al. A role for *smad6* in development and homeostasis of the cardiovascular system. *Nat Genet*. febrero de 2000;24(2):171-4.
147. Yang K, Cao W, Hao X, Xue X, Zhao J, Liu J, et al. Metallofullerene nanoparticles promote osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells through BMP signaling pathway. *Nanoscale*. 7 de febrero de 2013;5(3):1205-12.
148. Boström K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. abril de 1993;91(4):1800-9.
149. Chen NX, Duan D, O'Neill KD, Wolisi GO, Koczman JJ, Laclair R, et al. The mechanisms of uremic serum-induced expression of bone matrix proteins in bovine vascular smooth muscle cells. *Kidney Int*. septiembre de 2006;70(6):1046-53.

150. Rifas L. T-cell cytokine induction of BMP-2 regulates human mesenchymal stromal cell differentiation and mineralization. *J Cell Biochem.* 1 de julio de 2006;98(4):706-14.
151. Shin V, Zebboudj AF, Boström K. Endothelial cells modulate osteogenesis in calcifying vascular cells. *J Vasc Res.* abril de 2004;41(2):193-201.
152. Buendía P, Montes de Oca A, Madueño JA, Merino A, Martín-Malo A, Aljama P, et al. Endothelial microparticles mediate inflammation-induced vascular calcification. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 23 de octubre de 2014;
153. Chaudhary LR, Hofmeister AM, Hruska KA. Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. *Bone.* marzo de 2004;34(3):402-11.
154. Lee M-H, Kim Y-J, Kim H-J, Park H-D, Kang A-R, Kyung H-M, et al. BMP-2-induced Runx2 Expression Is Mediated by Dlx5, and TGF- β 1 Opposes the BMP-2-induced Osteoblast Differentiation by Suppression of Dlx5 Expression. *J Biol Chem.* 9 de mayo de 2003;278(36):34387-94.
155. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* 11 de enero de 2002;108(1):17-29.
156. Li X, Yang H-Y, Giachelli CM. BMP-2 promotes phosphate uptake, phenotypic modulation, and calcification of human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* agosto de 2008;199(2):271-7.
157. Abe E, Yamamoto M, Taguchi Y, Lecka-Czernik B, O'Brien CA, Economides AN, et al. Essential requirement of BMPs-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* abril de 2000;15(4):663-73.
158. Guerrero F, Herencia C, Almadén Y, Martínez-Moreno JM, Montes de Oca A, Rodríguez-Ortiz ME, et al. TGF- β Prevents Phosphate-Induced Osteogenesis through Inhibition of BMP and Wnt/ β -Catenin Pathways. *PLoS ONE [Internet].* 27 de febrero de 2014 [citado 21 de enero de 2015];9(2). Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3937350/>
159. Cordes KR, Srivastava D. MicroRNA regulation of cardiovascular development. *Circ Res.* 27 de marzo de 2009;104(6):724-32.
160. Balderman JAF, Lee H-Y, Mahoney CE, Handy DE, White K, Annis S, et al. Bone morphogenetic protein-2 decreases microRNA-30b and microRNA-30c to promote vascular smooth muscle cell calcification. *J Am Heart Assoc.* diciembre de 2012;1(6):e003905.

161. Fukui N, Zhu Y, Maloney WJ, Clohisy J, Sandell LJ. Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A Suppl 3:59-66.
162. Parhami F, Morrow AD, Balucan J, Leitinger N, Watson AD, Tintut Y, et al. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* abril de 1997;17(4):680-7.
163. Csiszar A, Smith KE, Koller A, Kaley G, Edwards JG, Ungvari Z. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression in endothelial cells: role of nuclear factor-kappaB activation by tumor necrosis factor-alpha, H2O2, and high intravascular pressure. *Circulation.* 10 de mayo de 2005;111(18):2364-72.
164. Csiszar A, Ahmad M, Smith KE, Labinskyy N, Gao Q, Kaley G, et al. Bone morphogenetic protein-2 induces proinflammatory endothelial phenotype. *Am J Pathol.* febrero de 2006;168(2):629-38.
165. Stenvinkel P. Inflammation in end-stage renal disease: the hidden enemy. *Nephrol Carlton Vic.* febrero de 2006;11(1):36-41.
166. Shimizu T, Tanaka T, Iso T, Doi H, Sato H, Kawai-Kowase K, et al. Notch signaling induces osteogenic differentiation and mineralization of vascular smooth muscle cells: role of Msx2 gene induction via Notch-RBP-Jk signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* julio de 2009;29(7):1104-11.
167. Lee H-L, Woo KM, Ryoo H-M, Baek J-H. Tumor necrosis factor-alpha increases alkaline phosphatase expression in vascular smooth muscle cells via MSX2 induction. *Biochem Biophys Res Commun.* 1 de enero de 2010;391(1):1087-92.
168. Shao J-S, Cheng S-L, Pingsterhaus JM, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *J Clin Invest.* mayo de 2005;115(5):1210-20.
169. Cheng S-L, Shao J-S, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. MSX2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors. *J Biol Chem.* 14 de noviembre de 2003;278(46):45969-77.
170. Karsenty G, Ferron M. The contribution of bone to whole-organism physiology. *Nature.* 19 de enero de 2012;481(7381):314-20.
171. Klein JR, Grunewald RW, Steffgen J, Franz HE. Clearance of osteocalcin in adults with end-stage renal disease undergoing CAPD. *Adv Perit Dial Conf Perit Dial.* 1991;7:225-9.
172. Bharadwaj S, Naidu AGT, Betageri GV, Prasadarao NV, Naidu AS. Milk ribonuclease-enriched lactoferrin induces positive effects on bone turnover markers in postmenopausal women.

- Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA. septiembre de 2009;20(9):1603-11.
173. Rutsch F, Ruf N, Vaingankar S, Toliat MR, Suk A, Höhne W, et al. Mutations in ENPP1 are associated with «idiopathic» infantile arterial calcification. *Nat Genet.* agosto de 2003;34(4):379-81.
 174. Luo G, Ducey P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature.* 6 de marzo de 1997;386(6620):78-81.
 175. Jono S, Shioi A, Ikari Y, Nishizawa Y. Vascular calcification in chronic kidney disease. *J Bone Miner Metab.* 2006;24(2):176-81.
 176. Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R, Wildberger JE, Mahnken AH, Böhm R, et al. Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet.* 8 de marzo de 2003;361(9360):827-33.
 177. Schurgers LJ, Teunissen KJF, Knapen MHJ, Kwaijtaal M, van Diest R, Appels A, et al. Novel conformation-specific antibodies against matrix gamma-carboxyglutamic acid (Gla) protein: undercarboxylated matrix Gla protein as marker for vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* agosto de 2005;25(8):1629-33.
 178. Boström KI. Cell differentiation in vascular calcification. *Z Für Kardiologie.* 2000;89 Suppl 2:69-74.
 179. Schoppet M, Shroff RC, Hofbauer LC, Shanahan CM. Exploring the biology of vascular calcification in chronic kidney disease: what's circulating? *Kidney Int.* febrero de 2008;73(4):384-90.
 180. Price PA, Nguyen TMT, Williamson MK. Biochemical characterization of the serum fetuin-mineral complex. *J Biol Chem.* 13 de junio de 2003;278(24):22153-60.
 181. Reinholt FP, Hulthén K, Oldberg A, Heinegård D. Osteopontin—a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* junio de 1990;87(12):4473-5.
 182. Rittling SR, Matsumoto HN, McKee MD, Nanci A, An XR, Novick KE, et al. Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* julio de 1998;13(7):1101-11.
 183. Steitz SA, Speer MY, McKee MD, Liaw L, Almeida M, Yang H, et al. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol.* diciembre de 2002;161(6):2035-46.

184. Heiss A, DuChesne A, Denecke B, Grötzinger J, Yamamoto K, Renné T, et al. Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles. *J Biol Chem.* 11 de abril de 2003;278(15):13333-41.
185. Price PA, Thomas GR, Pardini AW, Figueira WF, Caputo JM, Williamson MK. Discovery of a high molecular weight complex of calcium, phosphate, fetuin, and matrix gamma-carboxyglutamic acid protein in the serum of etidronate-treated rats. *J Biol Chem.* 8 de febrero de 2002;277(6):3926-34.
186. Schafer C, Heiss A, Schwarz A, Westenfeld R, Ketteler M, Floege J, et al. The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest.* agosto de 2003;112(3):357-66.
187. Schlieper G, Westenfeld R, Brandenburg V, Ketteler M. Inhibitors of calcification in blood and urine. *Semin Dial.* abril de 2007;20(2):113-21.
188. Odamaki M, Shibata T, Takita T, Kumagai H. Serum fetuin-A and aortic calcification in hemodialysis patients. *Kidney Int.* diciembre de 2005;68(6):2915; author reply 2916.
189. FLEISCH H, BISAZ S. Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor. *Am J Physiol.* octubre de 1962;203:671-5.
190. Fleisch H, Russell RG, Straumann F. Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. *Nature.* 26 de noviembre de 1966;212(5065):901-3.
191. Okawa A, Nakamura I, Goto S, Moriya H, Nakamura Y, Ikegawa S. Mutation in Npps in a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Nat Genet.* julio de 1998;19(3):271-3.
192. O'Neill WC, Lomashvili KA, Malluche HH, Faugere M-C, Riser BL. Treatment with pyrophosphate inhibits uremic vascular calcification. *Kidney Int.* marzo de 2011;79(5):512-7.
193. Fleisch H, Schibler D, Maerki J, Frossard I. Inhibition of aortic calcification by means of pyrophosphate and polyphosphates. *Nature.* 18 de septiembre de 1965;207(5003):1300-1.
194. Schibler D, Russell RG, Fleisch H. Inhibition by pyrophosphate and polyphosphate of aortic calcification induced by vitamin D3 in rats. *Clin Sci.* octubre de 1968;35(2):363-72.
195. Lomashvili KA, Garg P, Narisawa S, Millan JL, O'Neill WC. Upregulation of alkaline phosphatase and pyrophosphate hydrolysis: potential mechanism for uremic vascular calcification. *Kidney Int.* mayo de 2008;73(9):1024-30.
196. Rutsch F, Vaingankar S, Johnson K, Goldfine I, Maddux B, Schauerte P, et al. PC-1 nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in idiopathic infantile arterial calcification. *Am J Pathol.* febrero de 2001;158(2):543-54.

197. Lomashvili KA, Cobbs S, Hennigar RA, Hardcastle KI, O'Neill WC. Phosphate-induced vascular calcification: role of pyrophosphate and osteopontin. *J Am Soc Nephrol JASN*. junio de 2004;15(6):1392-401.
198. Reynolds JL, Skepper JN, McNair R, Kasama T, Gupta K, Weissberg PL, et al. Multifunctional roles for serum protein fetuin-a in inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification. *J Am Soc Nephrol JASN*. octubre de 2005;16(10):2920-30.
199. Dai X-Y, Zhao M-M, Cai Y, Guan Q-C, Zhao Y, Guan Y, et al. Phosphate-induced autophagy counteracts vascular calcification by reducing matrix vesicle release. *Kidney Int*. junio de 2013;83(6):1042-51.
200. Sage AP, Lu J, Tintut Y, Demer LL. Hyperphosphatemia-induced nanocrystals upregulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteopontin genes in mouse smooth muscle cells in vitro. *Kidney Int*. febrero de 2011;79(4):414-22.
201. Ewence AE, Bootman M, Roderick HL, Skepper JN, McCarthy G, Epple M, et al. Calcium phosphate crystals induce cell death in human vascular smooth muscle cells: a potential mechanism in atherosclerotic plaque destabilization. *Circ Res*. 29 de agosto de 2008;103(5):e28-34.
202. Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, Weissberg PL. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res*. 24 de noviembre de 2000;87(11):1055-62.
203. Son B-K, Akishita M, Iijima K, Eto M, Ouchi Y. Mechanism of pi-induced vascular calcification. *J Atheroscler Thromb*. abril de 2008;15(2):63-8.
204. Bouvet C, Moreau S, Blanchette J, de Blois D, Moreau P. Sequential activation of matrix metalloproteinase 9 and transforming growth factor beta in arterial elastocalcinosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. mayo de 2008;28(5):856-62.
205. Aikawa E, Aikawa M, Libby P, Figueiredo J-L, Rusanescu G, Iwamoto Y, et al. Arterial and aortic valve calcification abolished by elastolytic cathepsin S deficiency in chronic renal disease. *Circulation*. 7 de abril de 2009;119(13):1785-94.
206. Hosaka N, Mizobuchi M, Ogata H, Kumata C, Kondo F, Koiwa F, et al. Elastin degradation accelerates phosphate-induced mineralization of vascular smooth muscle cells. *Calcif Tissue Int*. diciembre de 2009;85(6):523-9.
207. Pai A, Leaf EM, El-Abbadi M, Giachelli CM. Elastin degradation and vascular smooth muscle cell phenotype change precede cell loss and arterial medial calcification in a uremic mouse model of chronic kidney disease. *Am J Pathol*. febrero de 2011;178(2):764-73.

208. Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, et al. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1 de marzo de 2005;102(9):3324-9.
209. Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell*. mayo de 2005;8(5):739-50.
210. Shao J-S, Aly ZA, Lai C-F, Cheng S-L, Cai J, Huang E, et al. Vascular Bmp Msx2 Wnt signaling and oxidative stress in arterial calcification. *Ann N Y Acad Sci*. noviembre de 2007;1117:40-50.
211. Gu G, Chen T, Zhou H, Sun K, Li J. Role of Wnt/ β -catenin signaling pathway in the mechanism of calcification of aortic valve. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci Hua Zhong Ke Ji Xue Xue Bao Yi Xue Ying Wen Ban Huazhong Keji Daxue Xuebao Yixue Yingdewen Ban*. febrero de 2014;34(1):33-6.
212. Kirton JP, Crofts NJ, George SJ, Brennan K, Canfield AE. Wnt/beta-catenin signaling stimulates chondrogenic and inhibits adipogenic differentiation of pericytes: potential relevance to vascular disease? *Circ Res*. 14 de septiembre de 2007;101(6):581-9.
213. Taipaleenmäki H, Abdallah BM, AlDahmash A, Säämänen A-M, Kassem M. Wnt signalling mediates the cross-talk between bone marrow derived pre-adipocytic and pre-osteoblastic cell populations. *Exp Cell Res*. 1 de abril de 2011;317(6):745-56.
214. Choi YS, Zhang Y, Xu M, Yang Y, Ito M, Peng T, et al. Distinct Functions for Wnt/ β -Catenin in Hair Follicle Stem Cell Proliferation and Survival and Interfollicular Epidermal Homeostasis. *Cell Stem Cell*. 5 de diciembre de 2013;13(6):720-33.
215. Jacques BE, Montgomery WH 4th, Uribe PM, Yatteau A, Asuncion JD, Resendiz G, et al. The role of Wnt/ β -catenin signaling in proliferation and regeneration of the developing basilar papilla and lateral line. *Dev Neurobiol*. abril de 2014;74(4):438-56.
216. Hadjihannas MV, Bernkopf DB, Brückner M, Behrens J. Cell cycle control of Wnt/ β -catenin signalling by conductin/axin2 through CDC20. *EMBO Rep*. abril de 2012;13(4):347-54.
217. Hirabayashi Y, Itoh Y, Tabata H, Nakajima K, Akiyama T, Masuyama N, et al. The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Dev Camb Engl*. junio de 2004;131(12):2791-801.
218. Miki T, Yasuda S, Kahn M. Wnt/ β -catenin signaling in embryonic stem cell self-renewal and somatic cell reprogramming. *Stem Cell Rev*. noviembre de 2011;7(4):836-46.

219. Quasnichka H, Slater SC, Beeching CA, Boehm M, Sala-Newby GB, George SJ. Regulation of smooth muscle cell proliferation by beta-catenin/T-cell factor signaling involves modulation of cyclin D1 and p21 expression. *Circ Res.* 8 de diciembre de 2006;99(12):1329-37.
220. Gehrke I, Gandhirajan RK, Kreuzer K-A. Targeting the WNT/beta-catenin/TCF/LEF1 axis in solid and haematological cancers: Multiplicity of therapeutic options. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. noviembre de 2009;45(16):2759-67.
221. Takemaru KI, Moon RT. The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *J Cell Biol.* 17 de abril de 2000;149(2):249-54.
222. Sun Y, Kolligs FT, Hottiger MO, Mosavin R, Fearon ER, Nabel GJ. Regulation of beta -catenin transformation by the p300 transcriptional coactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7 de noviembre de 2000;97(23):12613-8.
223. Cselenyi CS, Lee E. Context-dependent activation or inhibition of Wnt-beta-catenin signaling by Kremen. *Sci Signal.* 2008;1(8):pe10.
224. Jones SE, Jomary C. Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* septiembre de 2002;24(9):811-20.
225. Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science.* 5 de marzo de 2004;303(5663):1483-7.
226. Sato A, Khadka DK, Liu W, Bharti R, Runnels LW, Dawid IB, et al. Profilin is an effector for Daam1 in non-canonical Wnt signaling and is required for vertebrate gastrulation. *Dev Camb Engl.* noviembre de 2006;133(21):4219-31.
227. Cheung WW, Paik KH, Mak RH. Inflammation and cachexia in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* abril de 2010;25(4):711-24.
228. Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, McMonagle E, Morrow J, Ikizler TA, et al. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int.* marzo de 2004;65(3):1009-16.
229. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, 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 Int.* abril de 2005;67(4):1216-33.
230. Doherty TM, Asotra K, Fitzpatrick LA, Qiao J-H, Wilkin DJ, Detrano RC, et al. Calcification in atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 30 de septiembre de 2003;100(20):11201-6.

231. Caglar K, Peng Y, Pupim LB, Flakoll PJ, Levenhagen D, Hakim RM, et al. Inflammatory signals associated with hemodialysis. *Kidney Int.* octubre de 2002;62(4):1408-16.
232. Takahashi T, Kubota M, Nakamura T, Ebihara I, Koide H. Interleukin-6 gene expression in peripheral blood mononuclear cells from patients undergoing hemodialysis or continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Ren Fail.* mayo de 2000;22(3):345-54.
233. Jofré R, Rodríguez-Benitez P, López-Gómez JM, Pérez-García R. Inflammatory Syndrome in Patients on Hemodialysis. *J Am Soc Nephrol.* 12 de enero de 2006;17(12 suppl 3):S274-80.
234. Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, et al. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med.* 1 de abril de 2004;350(14):1387-97.
235. Ridker PM, Haughey P. Prospective studies of C-reactive protein as a risk factor for cardiovascular disease. *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res.* octubre de 1998;46(8):391-5.
236. Tripepi G, Mallamaci F, Zoccali C. Inflammation markers, adhesion molecules, and all-cause and cardiovascular mortality in patients with ESRD: searching for the best risk marker by multivariate modeling. *J Am Soc Nephrol JASN.* marzo de 2005;16 Suppl 1:S83-8.
237. Bologa RM, Levine DM, Parker TS, Cheigh JS, Serur D, Stenzel KH, et al. Interleukin-6 predicts hypoalbuminemia, hypocholesterolemia, and mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* julio de 1998;32(1):107-14.
238. Tsimihodimos V, Mitrogianni Z, Elisaf M. Dyslipidemia Associated with Chronic Kidney Disease. *Open Cardiovasc Med J.* 24 de febrero de 2011;5:41-8.
239. Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JFE. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation.* 3 de julio de 2007;116(1):85-97.
240. Eleftheriadis T, Antoniadis G, Liakopoulos V, Kartsios C, Stefanidis I, Galaktidou G. Paricalcitol reduces basal and lipopolysaccharide-induced (LPS) TNF-alpha and IL-8 production by human peripheral blood mononuclear cells. *Int Urol Nephrol.* marzo de 2010;42(1):181-5.
241. Panichi V, Maggiore U, Taccola D, Migliori M, Rizza GM, Consani C, et al. Interleukin-6 is a stronger predictor of total and cardiovascular mortality than C-reactive protein in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* mayo de 2004;19(5):1154-60.
242. Shimizu H, Yisireyili M, Higashiyama Y, Nishijima F, Niwa T. Indoxyl sulfate upregulates renal expression of ICAM-1 via production of ROS and activation of NF- κ B and p53 in proximal tubular cells. *Life Sci.* 7 de febrero de 2013;92(2):143-8.

243. Vasudevan SS, Lopes NHM, Seshiah PN, Wang T, Marsh CB, Kereiakes DJ, et al. Mac-1 and Fas activities are concurrently required for execution of smooth muscle cell death by M-CSF-stimulated macrophages. *Cardiovasc Res.* 1 de septiembre de 2003;59(3):723-33.
244. Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, et al. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell.* 11 de agosto de 1989;58(3):573-81.
245. Jones SA, Horiuchi S, Topley N, Yamamoto N, Fuller GM. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* enero de 2001;15(1):43-58.
246. Stenvinkel P, Barany P, Heimbürger O, Pecoits-Filho R, Lindholm B. Mortality, malnutrition, and atherosclerosis in ESRD: what is the role of interleukin-6? *Kidney Int Suppl.* mayo de 2002;(80):103-8.
247. Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, et al. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* septiembre de 2003;285(3):E527-33.
248. Luettig B, Decker T, Lohmann-Matthes ML. Evidence for the existence of two forms of membrane tumor necrosis factor: an integral protein and a molecule attached to its receptor. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 de diciembre de 1989;143(12):4034-8.
249. Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, et al. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature.* 20 de enero de 1984;312(5996):724-9.
250. Bemelmans MH, Gouma DJ, Buurman WA. Influence of nephrectomy on tumor necrosis factor clearance in a murine model. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 de marzo de 1993;150(5):2007-17.
251. Nakanishi I, Moutabarrik A, Okada N, Kitamura E, Hayashi A, Syouji T, et al. Interleukin-8 in chronic renal failure and dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 1994;9(10):1435-42.
252. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 23 de febrero de 2001;104(4):487-501.
253. Mease PJ. Tumour necrosis factor (TNF) in psoriatic arthritis: pathophysiology and treatment with TNF inhibitors. *Ann Rheum Dis.* abril de 2002;61(4):298-304.
254. Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med.* octubre de 2008;29(5):258-89.

255. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatol Oxf Engl*. julio de 2010;49(7):1215-28.
256. Grell M, Douni E, Wajant H, Löhden M, Clauss M, Maxeiner B, et al. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*. 1 de diciembre de 1995;83(5):793-802.
257. Masuda M, Miyazaki-Anzai S, Levi M, Ting TC, Miyazaki M. PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP signaling contributes to TNF α -induced vascular calcification. *J Am Heart Assoc*. octubre de 2013;2(5):e000238.
258. Villa-Belosta R, Levi M, Sorribas V. Vascular smooth muscle cell calcification and SLC20 inorganic phosphate transporters: effects of PDGF, TNF-alpha, and Pi. *Pflüg Arch Eur J Physiol*. octubre de 2009;458(6):1151-61.
259. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 15 de marzo de 1996;87(6):2095-147.
260. Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, Mucci SF, Rich A, Wolff SM, et al. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. diciembre de 1984;81(24):7907-11.
261. Huising MO, Stet RJM, Savelkoul HFJ, Verburg-van Kemenade BML. The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines; IL-18 in teleost fish. *Dev Comp Immunol*. 3 de mayo de 2004;28(5):395-413.
262. Lomedico PT, Gubler U, Hellmann CP, Dukovich M, Giri JG, Pan YC, et al. Cloning and expression of murine interleukin-1 cDNA in *Escherichia coli*. *Nature*. 29 de diciembre de 1984;312(5993):458-62.
263. Burton DGA, Giles PJ, Sheerin ANP, Smith SK, Lawton JJ, Ostler EL, et al. Microarray analysis of senescent vascular smooth muscle cells: A link to atherosclerosis and vascular calcification. *Exp Gerontol*. octubre de 2009;44(10):659-65.
264. Loppnow H, Libby P. Functional significance of human vascular smooth muscle cell-derived interleukin 1 in paracrine and autocrine regulation pathways. *Exp Cell Res*. febrero de 1992;198(2):283-90.
265. Turner NA. Effects of interleukin-1 on cardiac fibroblast function: Relevance to post-myocardial infarction remodelling. *Vascul Pharmacol [Internet]*. [citado 22 de octubre de 2013]; Recuperado a partir de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S153718911300075X>

266. Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Libby P. Enhanced expression of vascular matrix metalloproteinases induced in vitro by cytokines and in regions of human atherosclerotic lesions. *Ann N Y Acad Sci.* 17 de enero de 1995;748:501-7.
267. Waehre T, Yndestad A, Smith C, Haug T, Tunheim SH, Gullestad L, et al. Increased expression of interleukin-1 in coronary artery disease with downregulatory effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Circulation.* 27 de abril de 2004;109(16):1966-72.
268. Apostolopoulos J, Davenport P, Tipping PG. Interleukin-8 production by macrophages from atheromatous plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* agosto de 1996;16(8):1007-12.
269. Tipping PG, Hancock WW. Production of tumor necrosis factor and interleukin-1 by macrophages from human atheromatous plaques. *Am J Pathol.* junio de 1993;142(6):1721-8.
270. Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res.* 1 de agosto de 2008;79(3):360-76.
271. Rader DJ. IL-1 and atherosclerosis: a murine twist to an evolving human story. *J Clin Invest.* 3 de enero de 2012;122(1):27-30.
272. Sun J, Ding Y. NOD2 agonist promotes the production of inflammatory cytokines in VSMC in synergy with TLR2 and TLR4 agonists. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:607157.
273. Quan J, Liu J, Gao X, Liu J, Yang H, Chen W, et al. Palmitate induces interleukin-8 expression in human aortic vascular smooth muscle cells via Toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B pathway (TLR4/NF- κ B-8). *J Diabetes.* enero de 2014;6(1):33-41.
274. Panichi V, Taccola D, Rizza GM, Consani C, Ghiadoni L, Filippi C, et al. Interleukin-8 is a powerful prognostic predictor of all-cause and cardiovascular mortality in dialytic patients. *Nephron Clin Pract.* 2006;102(2):c51-8.
275. Zhan C-D, Sindhu RK, Pang J, Ehdaie A, Vaziri ND. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the spontaneously hypertensive rat kidney: effect of antioxidant-rich diet. *J Hypertens.* octubre de 2004;22(10):2025-33.
276. Kunii H, Ishikawa K, Yamaguchi T, Komatsu N, Ichihara T, Maruyama Y. Bilirubin and its oxidative metabolite biopyrrins in patients with acute myocardial infarction. *Fukushima J Med Sci.* diciembre de 2009;55(2):39-51.
277. Sedlak TW, Saleh M, Higginson DS, Paul BD, Juluri KR, Snyder SH. Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 31 de marzo de 2009;106(13):5171-6.

278. Fabbrini E, Serafini M, Colic Baric I, Hazen SL, Klein S. Effect of plasma uric acid on antioxidant capacity, oxidative stress, and insulin sensitivity in obese subjects. *Diabetes*. marzo de 2014;63(3):976-81.
279. Showkat A, Bastnagel WR, Hudson JQ. Effect of α -Lipoic Acid on Oxidative Stress in End-Stage Renal Disease Patients Receiving Intravenous Iron. *ISRN Nephrol*. 2014;2014:634515.
280. Russcher M, Koch B, Nagtegaal E, van der Putten K, ter Wee P, Gaillard C. The role of melatonin treatment in chronic kidney disease. *Front Biosci Landmark Ed*. 2012;17:2644-56.
281. Quiroz Y, Ferrebuz A, Romero F, Vaziri ND, Rodriguez-Iturbe B. Melatonin ameliorates oxidative stress, inflammation, proteinuria, and progression of renal damage in rats with renal mass reduction. *Am J Physiol Renal Physiol*. febrero de 2008;294(2):F336-44.
282. Altamura C, Squitti R, Pasqualetti P, Gaudino C, Palazzo P, Tibuzzi F, et al. Ceruloplasmin/Transferrin system is related to clinical status in acute stroke. *Stroke J Cereb Circ*. abril de 2009;40(4):1282-8.
283. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. octubre de 2006;8(9-10):1865-79.
284. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem*. abril de 2006;52(4):601-23.
285. Rajasekaran NS, Sathyanarayanan S, Devaraj NS, Devaraj H. Chronic depletion of glutathione (GSH) and minimal modification of LDL in vivo: its prevention by glutathione mono ester (GME) therapy. *Biochim Biophys Acta*. 30 de junio de 2005;1741(1-2):103-12.
286. Dirican M, Sarandol E, Serdar Z, Ocak N, Dilek K. Oxidative status and prevalent cardiovascular disease in patients with chronic renal failure treated by hemodialysis. *Clin Nephrol*. septiembre de 2007;68(3):144-50.
287. Nakayama H, Akiyama S, Inagaki M, Gotoh Y, Oguchi K. Dehydroascorbic acid and oxidative stress in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 3 de enero de 2001;16(3):574-9.
288. Deicher R, Ziai F, Bieglmayer C, Schillinger M, Hörl WH. Low total vitamin C plasma level is a risk factor for cardiovascular morbidity and mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol JASN*. junio de 2005;16(6):1811-8.
289. Morena M, Jaussent I, Chalabi L, Bargnoux A-S, Dupuy A-M, Badiou S, et al. Biocompatibility of heparin-grafted hemodialysis membranes: impact on monocyte chemoattractant protein-1 circulating level and oxidative status. *Hemodial Int Int Symp Home Hemodial*. octubre de 2010;14(4):403-10.

290. Takouli L, Hadjiyannakos D, Metaxaki P, Sideris V, Filiopoulos V, Anogiati A, et al. Vitamin E-coated cellulose acetate dialysis membrane: long-term effect on inflammation and oxidative stress. *Ren Fail.* enero de 2010;32(3):287-93.
291. Peuchant E, Carbonneau MA, Dubourg L, Thomas MJ, Perromat A, Vallot C, et al. Lipoperoxidation in plasma and red blood cells of patients undergoing haemodialysis: vitamins A, E, and iron status. *Free Radic Biol Med.* marzo de 1994;16(3):339-46.
292. Agharazii M, St-Louis R, Gautier-Bastien A, Ung R-V, Mokas S, Larivière R, et al. Inflammatory Cytokines and Reactive Oxygen Species as Mediators of Chronic Kidney Disease-Related Vascular Calcification. *Am J Hypertens.* 27 de noviembre de 2014;
293. Färbom P, Wahlstrand B, Almgren P, Skrtic S, Lanke J, Weiss L, et al. Interaction between renal function and microalbuminuria for cardiovascular risk in hypertension: the nordic diltiazem study. *Hypertension.* julio de 2008;52(1):115-22.
294. Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F, Liang K, Pandian R. Enhanced Nitric Oxide Inactivation and Protein Nitration by Reactive Oxygen Species in Renal Insufficiency. *Hypertension.* 1 de enero de 2002;39(1):135-41.
295. Dounousi E, Papavasiliou E, Makedou A, Ioannou K, Katopodis KP, Tselepis A, et al. Oxidative stress is progressively enhanced with advancing stages of CKD. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* noviembre de 2006;48(5):752-60.
296. Putri AY, Thaha M. Role of oxidative stress on chronic kidney disease progression. *Acta Medica Indones.* julio de 2014;46(3):244-52.
297. Suliman ME, Stenvinkel P, Qureshi AR, Bárány P, Heimbürger O, Anderstam B, et al. Hyperhomocysteinemia in relation to plasma free amino acids, biomarkers of inflammation and mortality in patients with chronic kidney disease starting dialysis therapy. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* septiembre de 2004;44(3):455-65.
298. Ninomiya T, Kiyohara Y, Kubo M, Tanizaki Y, Tanaka K, Okubo K, et al. Hyperhomocysteinemia and the development of chronic kidney disease in a general population: the Hisayama study. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* septiembre de 2004;44(3):437-45.
299. Silverstein DM. Inflammation in chronic kidney disease: role in the progression of renal and cardiovascular disease. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* agosto de 2009;24(8):1445-52.
300. Addabbo F, Mallamaci F, Leonardis D, Tripepi R, Tripepi G, Goligorsky MS, et al. Searching for biomarker patterns characterizing carotid atherosclerotic burden in patients with reduced renal function. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* diciembre de 2007;22(12):3521-6.

301. Van Tellingen A, Grooteman MPC, Schoorl M, Bartels PCM, Schoorl M, van der Ploeg T, et al. Intercurrent clinical events are predictive of plasma C-reactive protein levels in hemodialysis patients. *Kidney Int.* agosto de 2002;62(2):632-8.
302. Memoli B, Minutolo R, Bisesti V, Postiglione L, Conti A, Marzano L, et al. Changes of serum albumin and C-reactive protein are related to changes of interleukin-6 release by peripheral blood mononuclear cells in hemodialysis patients treated with different membranes. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* febrero de 2002;39(2):266-73.
303. Schindler R, Beck W, Deppisch R, Aussieker M, Wilde A, Göhl H, et al. Short bacterial DNA fragments: detection in dialysate and induction of cytokines. *J Am Soc Nephrol JASN.* diciembre de 2004;15(12):3207-14.
304. Arizono K, Nomura K, Motoyama T, Matsushita Y, Matsuoka K, Miyazu R, et al. Use of ultrapure dialysate in reduction of chronic inflammation during hemodialysis. *Blood Purif.* 2004;22 Suppl 2:26-9.
305. Schiff H, Lang SM, Stratakis D, Fischer R. Effects of ultrapure dialysis fluid on nutritional status and inflammatory parameters. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* septiembre de 2001;16(9):1863-9.
306. Ayus JC, Mizani MR, Achinger SG, Thadhani R, Go AS, Lee S. Effects of short daily versus conventional hemodialysis on left ventricular hypertrophy and inflammatory markers: a prospective, controlled study. *J Am Soc Nephrol JASN.* septiembre de 2005;16(9):2778-88.
307. Panichi V, Rizza GM, Taccola D, Paoletti S, Mantuano E, Migliori M, et al. C-reactive protein in patients on chronic hemodialysis with different techniques and different membranes. *Biomed Pharmacother Bioméd Pharmacothérapie.* enero de 2006;60(1):14-7.
308. Kato A, Takita T, Furuhashi M, Maruyama Y, Hishida A. Association between seroprevalence of anti-chlamydial antibodies and long-term cardiovascular mortality in chronic hemodialysis patients. *Atherosclerosis.* septiembre de 2006;188(1):120-5.
309. Kim DK, Kim HJ, Han SH, Lee JE, Moon SJ, Kim BS, et al. Chlamydia pneumoniae accompanied by inflammation is associated with the progression of atherosclerosis in CAPD patients: a prospective study for 3 years. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* marzo de 2008;23(3):1011-8.
310. Chen L-P, Chiang C-K, Chan C-P, Hung K-Y, Huang C-S. Does periodontitis reflect inflammation and malnutrition status in hemodialysis patients? *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* mayo de 2006;47(5):815-22.
311. Buhlin K, Bárány P, Heimbürger O, Stenvinkel P, Gustafsson A. Oral health and pro-inflammatory status in end-stage renal disease patients. *Oral Health Prev Dent.* 2007;5(3):235-44.

312. Enia G, Mallamaci F, Benedetto FA, Panuccio V, Parlongo S, Cutrupi S, et al. Long-term CAPD patients are volume expanded and display more severe left ventricular hypertrophy than haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* julio de 2001;16(7):1459-64.
313. Suliman ME, Heimbürger O, Bárány P, Anderstam B, Pecoits-Filho R, Rodríguez Ayala E, et al. Plasma pentosidine is associated with inflammation and malnutrition in end-stage renal disease patients starting on dialysis therapy. *J Am Soc Nephrol JASN.* junio de 2003;14(6):1614-22.
314. Wang AY-M, Sea MM-M, Tang N, Sanderson JE, Lui S-F, Li PK-T, et al. Resting energy expenditure and subsequent mortality risk in peritoneal dialysis patients. *J Am Soc Nephrol JASN.* diciembre de 2004;15(12):3134-43.
315. Axelsson J, Rashid Qureshi A, Suliman ME, Honda H, Pecoits-Filho R, Heimbürger O, et al. Truncal fat mass as a contributor to inflammation in end-stage renal disease. *Am J Clin Nutr.* noviembre de 2004;80(5):1222-9.
316. Cordeiro AC, Qureshi AR, Stenvinkel P, Heimbürger O, Axelsson J, Bárány P, et al. Abdominal fat deposition is associated with increased inflammation, protein-energy wasting and worse outcome in patients undergoing haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* febrero de 2010;25(2):562-8.
317. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* diciembre de 2003;112(12):1796-808.
318. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest.* diciembre de 2003;112(12):1785-8.
319. Yamamoto T, Carrero JJ, Lindholm B, Stenvinkel P, Axelsson J. Leptin and uremic protein-energy wasting—the axis of eating. *Semin Dial.* agosto de 2009;22(4):387-90.
320. Moschen AR, Kaser A, Enrich B, Mosheimer B, Theurl M, Niederegger H, et al. Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 de febrero de 2007;178(3):1748-58.
321. Romacho T, Villalobos LA, Cercas E, Carraro R, Sánchez-Ferrer CF, Peiró C. Visfatin as a novel mediator released by inflamed human endothelial cells. *PloS One.* 2013;8(10):e78283.
322. Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol.* 15 de enero de 2010;314(1):1-16.

323. Wannamethee SG, Welsh P, Whincup PH, Sawar N, Thomas MC, Gudnarsson V, et al. High adiponectin and increased risk of cardiovascular disease and mortality in asymptomatic older men: does NT-proBNP help to explain this association? *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil Off J Eur Soc Cardiol Work Groups Epidemiol Prev Card Rehabil Exerc Physiol.* febrero de 2011;18(1):65-71.
324. Carrero JJ, Cordeiro AC, Lindholm B, Stenvinkel P. The emerging pleiotrophic role of adipokines in the uremic phenotype. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* enero de 2010;19(1):37-42.
325. Yamada S, Tokumoto M, Tatsumoto N, Taniguchi M, Noguchi H, Nakano T, et al. Phosphate overload directly induces systemic inflammation and malnutrition as well as vascular calcification in uremia. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 15 de junio de 2014;306(12):F1418-28.
326. Zhao M-M, Xu M-J, Cai Y, Zhao G, Guan Y, Kong W, et al. Mitochondrial reactive oxygen species promote p65 nuclear translocation mediating high-phosphate-induced vascular calcification in vitro and in vivo. *Kidney Int.* mayo de 2011;79(10):1071-9.
327. Al-Aly Z. Phosphate, oxidative stress, and nuclear factor- κ B activation in vascular calcification. *Kidney Int.* mayo de 2011;79(10):1044-7.
328. Melamed ML, Michos ED, Post W, Astor B. 25-hydroxyvitamin D levels and the risk of mortality in the general population. *Arch Intern Med.* 11 de agosto de 2008;168(15):1629-37.
329. Melamed ML, Astor B, Michos ED, Hostetter TH, Powe NR, Muntner P. 25-hydroxyvitamin D levels, race, and the progression of kidney disease. *J Am Soc Nephrol JASN.* diciembre de 2009;20(12):2631-9.
330. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation.* 29 de enero de 2008;117(4):503-11.
331. Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW, Rimm EB. 25-hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men: a prospective study. *Arch Intern Med.* 9 de junio de 2008;168(11):1174-80.
332. Sunyecz JA. The use of calcium and vitamin D in the management of osteoporosis. *Ther Clin Risk Manag.* agosto de 2008;4(4):827-36.
333. Nasri H, Behradmanesh S, Maghsoudi AR, Ahmadi A, Nasri P, Rafieian-Kopaei M. Efficacy of supplementary vitamin D on improvement of glycemic parameters in patients with type 2 diabetes mellitus; a randomized double blind clinical trial. *J Ren Inj Prev.* 2014;3(1):31-4.
334. Dusso A, González EA, Martin KJ. Vitamin D in chronic kidney disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* agosto de 2011;25(4):647-55.

335. Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM, Recker RR, Heaney RP. Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *Am J Clin Nutr.* junio de 2007;85(6):1586-91.
336. AlSaleem A, AlE'ed A, AlSaghier A, Al-Mayouf SM. Vitamin D status in children with systemic lupus erythematosus and its association with clinical and laboratory parameters. *Clin Rheumatol.* 4 de noviembre de 2014;
337. Hyppönen E, Boucher BJ, Berry DJ, Power C. 25-hydroxyvitamin D, IGF-1, and metabolic syndrome at 45 years of age: a cross-sectional study in the 1958 British Birth Cohort. *Diabetes.* febrero de 2008;57(2):298-305.
338. Franczyk A, Stolarz-Skrzypek K, Wesołowska A, Czarnecka D. Vitamin D and vitamin D receptor activators in treatment of hypertension and cardiovascular disease. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2014;14(1):34-44.
339. Gurlek A, Pittelkow MR, Kumar R. Modulation of growth factor/cytokine synthesis and signaling by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3): implications in cell growth and differentiation. *Endocr Rev.* diciembre de 2002;23(6):763-86.
340. Chertow BS, Sivitz WI, Baranetsky NG, Clark SA, Waite A, Deluca HF. Cellular mechanisms of insulin release: the effects of vitamin D deficiency and repletion on rat insulin secretion. *Endocrinology.* octubre de 1983;113(4):1511-8.
341. Lin R, White JH. The pleiotropic actions of vitamin D. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* enero de 2004;26(1):21-8.
342. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol.* julio de 2005;289(1):F8-28.
343. Zittermann A. Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence? *Br J Nutr.* 2003;89(05):552-72.
344. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev.* octubre de 2008;29(6):726-76.
345. Townsend K, Evans KN, Campbell MJ, Colston KW, Adams JS, Hewison M. Biological actions of extra-renal 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase and implications for chemoprevention and treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol.* octubre de 2005;97(1-2):103-9.

346. Brumbaugh PF, Haussler MR. 1 Alpha,25-dihydroxycholecalciferol receptors in intestine. I. Association of 1 alpha,25-dihydroxycholecalciferol with intestinal mucosa chromatin. *J Biol Chem.* 25 de febrero de 1974;249(4):1251-7.
347. Norman AW, Bouillon R. Vitamin D nutritional policy needs a vision for the future. *Exp Biol Med* Maywood NJ. septiembre de 2010;235(9):1034-45.
348. Mizwicki MT, Norman AW. The vitamin D sterol-vitamin D receptor ensemble model offers unique insights into both genomic and rapid-response signaling. *Sci Signal.* 2009;2(75):re4.
349. Matsuda S, Kitagishi Y. Peroxisome proliferator-activated receptor and vitamin d receptor signaling pathways in cancer cells. *Cancers.* 2013;5(4):1261-70.
350. Di Rosa M, Malaguarnera L, Nicolosi A, Sanfilippo C, Mazzarino C, Pavone P, et al. Vitamin D3: an ever green molecule. *Front Biosci Sch Ed.* 2013;5:247-60.
351. Dusso AS. Vitamin D receptor: mechanisms for vitamin D resistance in renal failure. *Kidney Int Suppl.* junio de 2003;(85):S6-9.
352. Nykjaer A, Dragun D, Walther D, Vorum H, Jacobsen C, Herz J, et al. An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3. *Cell.* 19 de febrero de 1999;96(4):507-15.
353. Storm T, Tranebjærg L, Frykholm C, Birn H, Verroust PJ, Nevéus T, et al. Renal phenotypic investigations of megalin-deficient patients: novel insights into tubular proteinuria and albumin filtration. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* marzo de 2013;28(3):585-91.
354. Gallieni M, Kamimura S, Ahmed A, Bravo E, Delmez J, Slatopolsky E, et al. Kinetics of monocyte 1 alpha-hydroxylase in renal failure. *Am J Physiol.* abril de 1995;268(4 Pt 2):F746-53.
355. Zittermann A, Gummert JF, Börgermann J. Vitamin D deficiency and mortality. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* noviembre de 2009;12(6):634-9.
356. Zehnder D, Quinkler M, Eardley KS, Bland R, Lепенies J, Hughes SV, et al. Reduction of the vitamin D hormonal system in kidney disease is associated with increased renal inflammation. *Kidney Int.* noviembre de 2008;74(10):1343-53.
357. Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, Yoon C, Gales B, Sider D, et al. Coronary-Artery Calcification in Young Adults with End-Stage Renal Disease Who Are Undergoing Dialysis. *N Engl J Med.* 18 de mayo de 2000;342(20):1478-83.
358. Qunibi WY, Nolan CA, Ayus JC. Cardiovascular calcification in patients with end-stage renal disease: a century-old phenomenon. *Kidney Int Suppl.* diciembre de 2002;(82):S73-80.

359. FIELDING J, MALONEY JJ. Calciferol, streptomycin, and para-aminosalicylic acid in pulmonary tuberculosis. *Lancet*. 6 de octubre de 1951;2(6684):614-7.
360. Lemire JM, Adams JS, Sakai R, Jordan SC. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Invest*. agosto de 1984;74(2):657-61.
361. Provvedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC. 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes. *Science*. 16 de septiembre de 1983;221(4616):1181-3.
362. Holick MF. Vitamin D Deficiency. *N Engl J Med*. 2007;357(3):266-81.
363. Sigmundsdottir H, Pan J, Debes GF, Alt C, Habtezion A, Soler D, et al. DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to «program» T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nat Immunol*. marzo de 2007;8(3):285-93.
364. Fritsche J, Mondal K, Ehrnsperger A, Andreesen R, Kreutz M. Regulation of 25-hydroxyvitamin D3-1 alpha-hydroxylase and production of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 by human dendritic cells. *Blood*. 1 de noviembre de 2003;102(9):3314-6.
365. Van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol*. octubre de 2005;97(1-2):93-101.
366. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE. Modulatory Effects of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 on Human B Cell Differentiation. *J Immunol*. 8 de enero de 2007;179(3):1634-47.
367. Brennan A, Katz DR, Nunn JD, Barker S, Hewison M, Fraher LJ, et al. Dendritic cells from human tissues express receptors for the immunoregulatory vitamin D3 metabolite, dihydroxycholecalciferol. *Immunology*. agosto de 1987;61(4):457-61.
368. Mathieu C, Adorini L. The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) analogs as immunomodulatory agents. *Trends Mol Med*. abril de 2002;8(4):174-9.
369. Cantorna MT. Why do T cells express the vitamin D receptor? *Ann N Y Acad Sci*. enero de 2011;1217:77-82.
370. Kreutz M, Andreesen R, Krause SW, Szabo A, Ritz E, Reichel H. 1,25-dihydroxyvitamin D3 production and vitamin D3 receptor expression are developmentally regulated during differentiation of human monocytes into macrophages. *Blood*. 15 de agosto de 1993;82(4):1300-7.
371. Kim SY. The pleiomorphic actions of vitamin D and its importance for children. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 2013;18(2):45.

372. Cohen-Lahav M, Shany S, Tobvin D, Chaimovitz C, Douvdevani A. Vitamin D decreases NFkappaB activity by increasing IkappaBalpha levels. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* abril de 2006;21(4):889-97.
373. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science.* 24 de marzo de 2006;311(5768):1770-3.
374. Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab.* 5 de enero de 2011;13(1):11-22.
375. Sadeghi K, Wessner B, Laggner U, Ploder M, Tamandl D, Friedl J, et al. Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. *Eur J Immunol.* febrero de 2006;36(2):361-70.
376. Giulietti A, van Etten E, Overbergh L, Stoffels K, Bouillon R, Mathieu C. Monocytes from type 2 diabetic patients have a pro-inflammatory profile. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) works as anti-inflammatory. *Diabetes Res Clin Pract.* julio de 2007;77(1):47-57.
377. Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, Renner W, Seelhorst U, Wellnitz B, et al. Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin d and 1,25-dihydroxyvitamin d levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med.* 23 de junio de 2008;168(12):1340-9.
378. Jablonski KL, Chonchol M, Pierce GL, Walker AE, Seals DR. 25-Hydroxyvitamin D deficiency is associated with inflammation-linked vascular endothelial dysfunction in middle-aged and older adults. *Hypertension.* enero de 2011;57(1):63-9.
379. Ngo DT, Sverdlov AL, McNeil JJ, Horowitz JD. Does vitamin D modulate asymmetric dimethylarginine and C-reactive protein concentrations? *Am J Med.* abril de 2010;123(4):335-41.
380. Peterson CA, Heffernan ME. Serum tumor necrosis factor-alpha concentrations are negatively correlated with serum 25(OH)D concentrations in healthy women. *J Inflamm Lond Engl.* 2008;5:10.
381. Bellia A, Garcovich C, D'Adamo M, Lombardo M, Tesauro M, Donadel G, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels are inversely associated with systemic inflammation in severe obese subjects. *Intern Emerg Med.* febrero de 2013;8(1):33-40.
382. Ganji V, Zhang X, Shaikh N, Tangpricha V. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with prevalence of metabolic syndrome and various cardiometabolic risk factors in US children and adolescents based on assay-adjusted serum 25-hydroxyvitamin D data from NHANES 2001-2006. *Am J Clin Nutr.* julio de 2011;94(1):225-33.
383. Hyppönen E, Berry D, Cortina-Borja M, Power C. 25-Hydroxyvitamin D and pre-clinical alterations in inflammatory and hemostatic markers: a cross sectional analysis in the 1958 British Birth Cohort. *PLoS One.* 2010;5(5):e10801.

384. Jorde R, Haug E, Figenschau Y, Hansen J-B. Serum levels of vitamin D and haemostatic factors in healthy subjects: the Tromsø study. *Acta Haematol.* 2007;117(2):91-7.
385. Vilarrasa N, Vendrell J, Maravall J, Elío I, Solano E, San José P, et al. Is plasma 25(OH) D related to adipokines, inflammatory cytokines and insulin resistance in both a healthy and morbidly obese population? *Endocrine.* octubre de 2010;38(2):235-42.
386. Borazan A, Ustün H, Cefle A, Sekitmez N, Yilmaz A. Comparative efficacy of oral and intravenous calcitriol treatment in haemodialysis patients: effects on serum biochemistry and cytokine levels. *J Int Med Res.* diciembre de 2003;31(6):489-96.
387. Inanir A, Ozoran K, Tutkak H, Mermerci B. The effects of calcitriol therapy on serum interleukin-1, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha concentrations in post-menopausal patients with osteoporosis. *J Int Med Res.* diciembre de 2004;32(6):570-82.
388. Schleithoff SS, Zittermann A, Tenderich G, Berthold HK, Stehle P, Koerfer R. Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr.* abril de 2006;83(4):754-9.
389. Adorini L. Immunomodulatory effects of vitamin D receptor ligands in autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol.* junio de 2002;2(7):1017-28.
390. Cantorna MT, Hayes CE, DeLuca HF. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 23 de julio de 1996;93(15):7861-4.
391. Mason J, Mason AR, Cork MJ. Topical preparations for the treatment of psoriasis: a systematic review. *Br J Dermatol.* marzo de 2002;146(3):351-64.
392. Ashcroft DM, Po AL, Williams HC, Griffiths CE. Systematic review of comparative efficacy and tolerability of calcipotriol in treating chronic plaque psoriasis. *BMJ.* 8 de abril de 2000;320(7240):963-7.
393. Kang S, Yi S, Griffiths CE, Fancher L, Hamilton TA, Choi JH. Calcipotriene-induced improvement in psoriasis is associated with reduced interleukin-8 and increased interleukin-10 levels within lesions. *Br J Dermatol.* enero de 1998;138(1):77-83.
394. Michel G, Gailis A, Jarzebska-Deussen B, Müschen A, Mirmohammadsadegh A, Ruzicka T. 1,25-(OH)₂-vitamin D3 and calcipotriol induce IL-10 receptor gene expression in human epidermal cells. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al.* enero de 1997;46(1):32-4.
395. Casteels K, Bouillon R, Waer M, Mathieu C. Immunomodulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* julio de 1995;4(4):313-8.

396. Deluca HF, Cantorna MT. Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* diciembre de 2001;15(14):2579-85.
397. Veldman CM, Cantorna MT, DeLuca HF. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system. *Arch Biochem Biophys.* 15 de febrero de 2000;374(2):334-8.
398. D'Ambrosio D, Cippitelli M, Cocciolo MG, Mazzeo D, Di Lucia P, Lang R, et al. Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. *J Clin Invest.* 1 de enero de 1998;101(1):252-62.
399. Müller K, Bendtzen K. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 as a natural regulator of human immune functions. *J Investig Dermatol Symp Proc Soc Investig Dermatol Inc Eur Soc Dermatol Res.* abril de 1996;1(1):68-71.
400. Tobler A, Gasson J, Reichel H, Norman AW, Koeffler HP. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Sensitive and receptor-mediated regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in normal human peripheral blood lymphocytes. *J Clin Invest.* junio de 1987;79(6):1700-5.
401. Matsui T, Takahashi R, Nakao Y, Koizumi T, Katakami Y, Mihara K, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3-regulated expression of genes involved in human T-lymphocyte proliferation and differentiation. *Cancer Res.* noviembre de 1986;46(11):5827-31.
402. Penna G, Adorini L. 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 de marzo de 2000;164(5):2405-11.
403. Townsend MJ, Fallon PG, Matthews DJ, Jolin HE, McKenzie AN. T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. *J Exp Med.* 20 de marzo de 2000;191(6):1069-76.
404. O'Neill WC, Lomashvili KA. Recent progress in the treatment of vascular calcification. *Kidney Int.* diciembre de 2010;78(12):1232-9.
405. Teng M, Wolf M, Ofsthun MN, Lazarus JM, Hernán MA, Camargo CA Jr, et al. Activated injectable vitamin D and hemodialysis survival: a historical cohort study. *J Am Soc Nephrol JASN.* abril de 2005;16(4):1115-25.
406. Kalantar-Zadeh K, Kuwae N, Regidor DL, Kovesdy CP, Kilpatrick RD, Shinaberger CS, et al. Survival predictability of time-varying indicators of bone disease in maintenance hemodialysis patients. *Kidney Int.* agosto de 2006;70(4):771-80.
407. Tentori F, Hunt WC, Stidley CA, Rohrscheib MR, Bedrick EJ, Meyer KB, et al. Mortality risk among hemodialysis patients receiving different vitamin D analogs. *Kidney Int.* noviembre de 2006;70(10):1858-65.

408. Nishizawa Y, Morii H, Ogura Y, De Luca HF. Clinical trial of 26,26,26,27,27,27-hexafluoro-1,25-dihydroxyvitamin D3 in uremic patients on hemodialysis: preliminary report. *Contrib Nephrol.* 1991;90:196-203.
409. Akizawa T, Ohashi Y, Akiba T, Suzuki M, Nishizawa Y, Ogata E, et al. Dose-response study of 22-oxacalcitriol in patients with secondary hyperparathyroidism. *Ther Apher Dial Off Peer-Rev J Int Soc Apher Jpn Soc Apher Jpn Soc Dial Ther.* diciembre de 2004;8(6):480-91.
410. Coburn JW, Maung HM, Elangovan L, Germain MJ, Lindberg JS, Sprague SM, et al. Doxercalciferol safely suppresses PTH levels in patients with secondary hyperparathyroidism associated with chronic kidney disease stages 3 and 4. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* mayo de 2004;43(5):877-90.
411. Noonan W, Koch K, Nakane M, Ma J, Dixon D, Bolin A, et al. Differential effects of vitamin D receptor activators on aortic calcification and pulse wave velocity in uraemic rats. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* diciembre de 2008;23(12):3824-30.
412. Takahashi F, Finch JL, Denda M, Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. A new analog of 1,25-(OH)2D3, 19-NOR-1,25-(OH)2D2, suppresses serum PTH and parathyroid gland growth in uremic rats without elevation of intestinal vitamin D receptor content. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* julio de 1997;30(1):105-12.
413. Wu-Wong JR, Nakane M, Gagne GD, Brooks KA, Noonan WT. Comparison of the Pharmacological Effects of Paricalcitol and Doxercalciferol on the Factors Involved in Mineral Homeostasis. *Int J Endocrinol [Internet].* 2010 [citado 27 de mayo de 2014];2010. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2831199/>
414. Holliday LS, Gluck SL, Slatopolsky E, Brown AJ. 1,25-Dihydroxy-19-nor-vitamin D(2), a vitamin D analog with reduced bone resorbing activity in vitro. *J Am Soc Nephrol JASN.* octubre de 2000;11(10):1857-64.
415. Martin KJ, González E, Lindberg JS, Taccetta C, Amdahl M, Malhotra K, et al. Paricalcitol dosing according to body weight or severity of hyperparathyroidism: a double-blind, multicenter, randomized study. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* noviembre de 2001;38(5 Suppl 5):S57-63.
416. Llach F, Yudd M. Paricalcitol in dialysis patients with calcitriol-resistant secondary hyperparathyroidism. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* noviembre de 2001;38(5 Suppl 5):S45-50.
417. Sprague SM, Llach F, Amdahl M, Taccetta C, Batlle D. Paricalcitol versus calcitriol in the treatment of secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int.* abril de 2003;63(4):1483-90.

418. Teng M, Wolf M, Lowrie E, Ofsthun N, Lazarus JM, Thadhani R. Survival of patients undergoing hemodialysis with paricalcitol or calcitriol therapy. *N Engl J Med.* 31 de julio de 2003;349(5):446-56.
419. Slatopolsky E, Finch J, Ritter C, Takahashi F. Effects of 19-nor-1,25(OH)₂D₂, a new analogue of calcitriol, on secondary hyperparathyroidism in uremic rats. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* octubre de 1998;32(2 Suppl 2):S40-7.
420. Lund RJ, Andress DL, Amdahl M, Williams LA, Heaney RP. Differential effects of paricalcitol and calcitriol on intestinal calcium absorption in hemodialysis patients. *Am J Nephrol.* 2010;31(2):165-70.
421. Han T, Rong G, Quan D, Shu Y, Liang Z, She N, et al. Meta-analysis: the efficacy and safety of paricalcitol for the treatment of secondary hyperparathyroidism and proteinuria in chronic kidney disease. *BioMed Res Int.* 2013;2013:320560.
422. Yan Y, Qian J, Chen N, Huang Z, Jiang G, Li X, et al. Efficacy and initial dose determination of paricalcitol for treatment of secondary hyperparathyroidism in Chinese subjects. *Clin Nephrol.* enero de 2014;81(1):20-9.
423. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc.* 2006;1(2):581-5.
424. Cheng S-L, Shao J-S, Halstead LR, Distelhorst K, Sierra O, Towler DA. Activation of vascular smooth muscle parathyroid hormone receptor inhibits Wnt/beta-catenin signaling and aortic fibrosis in diabetic arteriosclerosis. *Circ Res.* 23 de julio de 2010;107(2):271-82.
425. Shao J-S, Cheng S-L, Pingsterhaus JM, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *J Clin Invest.* 2 de mayo de 2005;115(5):1210-20.
426. Satoh K, Nigro P, Matoba T, O'Dell MR, Cui Z, Shi X, et al. Cyclophilin A enhances vascular oxidative stress and the development of angiotensin II-induced aortic aneurysms. *Nat Med.* junio de 2009;15(6):649-56.
427. Liu Y, Drozdov I, Shroff R, Beltran LE, Shanahan CM. Prelamin A accelerates vascular calcification via activation of the DNA damage response and senescence-associated secretory phenotype in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 10 de mayo de 2013;112(10):e99-109.
428. Sahar S, Dwarakanath RS, Reddy MA, Lanting L, Todorov I, Natarajan R. Angiotensin II enhances interleukin-18 mediated inflammatory gene expression in vascular smooth muscle cells: a novel cross-talk in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res.* 27 de mayo de 2005;96(10):1064-71.
429. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal.* 1 de marzo de 2014;20(7):1126-67.

430. Naik E, Dixit VM. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *J Exp Med*. 14 de marzo de 2011;208(3):417-20.
431. Morgan MJ, Liu Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res*. enero de 2011;21(1):103-15.
432. Myant KB, Cammareri P, McGhee EJ, Ridgway RA, Huels DJ, Cordero JB, et al. ROS production and NF- κ B activation triggered by RAC1 facilitate WNT-driven intestinal stem cell proliferation and colorectal cancer initiation. *Cell Stem Cell*. 6 de junio de 2013;12(6):761-73.
433. Ciceri P, Volpi E, Brenna I, Arnaboldi L, Neri L, Brancaccio D, et al. Combined effects of ascorbic acid and phosphate on rat VSMC osteoblastic differentiation. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. enero de 2012;27(1):122-7.
434. Prosdocimo DA, Wyler SC, Romani AM, O'Neill WC, Dubyak GR. Regulation of vascular smooth muscle cell calcification by extracellular pyrophosphate homeostasis: synergistic modulation by cyclic AMP and hyperphosphatemia. *Am J Physiol Cell Physiol*. marzo de 2010;298(3):C702-13.
435. Zhu D, Mackenzie NCW, Shanahan CM, Shroff RC, Farquharson C, MacRae VE. BMP-9 regulates the osteoblastic differentiation and calcification of vascular smooth muscle cells through an ALK1 mediated pathway. *J Cell Mol Med*. enero de 2015;19(1):165-74.
436. Van Gijn ME, Daemen MJAP, Smits JFM, Blankesteyn WM. The wnt-frizzled cascade in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. julio de 2002;55(1):16-24.
437. Mikhaylova L, Malmquist J, Nurminskaya M. Regulation of in vitro vascular calcification by BMP4, VEGF and Wnt3a. *Calcif Tissue Int*. noviembre de 2007;81(5):372-81.
438. Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM. Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1 de marzo de 2003;23(3):489-94.
439. Lei Y, Sinha A, Nosoudi N, Grover A, Vyavahare N. Hydroxyapatite and calcified elastin induce osteoblast-like differentiation in rat aortic smooth muscle cells. *Exp Cell Res*. 15 de abril de 2014;323(1):198-208.
440. Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, et al. BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *J Biol Chem*. 24 de octubre de 2008;283(43):29119-25.
441. Hopyan S, Gokgoz N, Bell RS, Andrusis IL, Alman BA, Wunder JS. Expression of osteocalcin and its transcriptional regulators core-binding factor alpha 1 and MSX2 in osteoid-forming tumours. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. septiembre de 1999;17(5):633-8.

442. Friedman MS, Oyserman SM, Hankenson KD. Wnt11 promotes osteoblast maturation and mineralization through R-spondin 2. *J Biol Chem.* 22 de mayo de 2009;284(21):14117-25.
443. Bafico A, Liu G, Yaniv A, Gazit A, Aaronson SA. Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol.* julio de 2001;3(7):683-6.
444. Al-Aly Z, Shao J-S, Lai C-F, Huang E, Cai J, Behrmann A, et al. Aortic Msx2-Wnt calcification cascade is regulated by TNF-alpha-dependent signals in diabetic Ldlr-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* diciembre de 2007;27(12):2589-96.
445. Oshima T, Abe M, Asano J, Hara T, Kitazoe K, Sekimoto E, et al. Myeloma cells suppress bone formation by secreting a soluble Wnt inhibitor, sFRP-2. *Blood.* 1 de noviembre de 2005;106(9):3160-5.
446. Cho SW, Yang J-Y, Sun HJ, Jung JY, Her SJ, Cho HY, et al. Wnt inhibitory factor (WIF)-1 inhibits osteoblastic differentiation in mouse embryonic mesenchymal cells. *Bone.* junio de 2009;44(6):1069-77.
447. Askevold ET, Gullestad L, Aakhus S, Ranheim T, Tønnessen T, Solberg OG, et al. Secreted Wnt Modulators in Symptomatic Aortic Stenosis. *J Am Heart Assoc.* 19 de diciembre de 2012;1(6):e002261.
448. Jean G, Chazot C. Sclerostin in CKD-MBD: one more paradoxical bone protein? *Nephrol Dial Transplant.* 12 de enero de 2013;28(12):2932-5.
449. Mirando AJ, Maruyama T, Fu J, Yu H-M, Hsu W. β -catenin/cyclin D1 mediated development of suture mesenchyme in calvarial morphogenesis. *BMC Dev Biol.* 2010;10(1):116.
450. Koleganova N, Piecha G, Ritz E, Schmitt CP, Gross M-L. A calcimimetic (R-568), but not calcitriol, prevents vascular remodeling in uremia. *Kidney Int.* enero de 2009;75(1):60-71.
451. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, et al. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11 de mayo de 1999;96(10):5522-7.
452. Rahmani M, Read JT, Carthy JM, McDonald PC, Wong BW, Esfandiarei M, et al. Regulation of the versican promoter by the beta-catenin-T-cell factor complex in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1 de abril de 2005;280(13):13019-28.
453. Nakashima A, Katagiri T, Tamura M. Cross-talk between Wnt and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) signaling in differentiation pathway of C2C12 myoblasts. *J Biol Chem.* 11 de noviembre de 2005;280(45):37660-8.

454. Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PVN, Komm BS, et al. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem.* 30 de septiembre de 2005;280(39):33132-40.
455. Kamiya N, Kobayashi T, Mochida Y, Yu PB, Yamauchi M, Kronenberg HM, et al. Wnt inhibitors Dkk1 and Sost are downstream targets of BMP signaling through the type IA receptor (BMPRIA) in osteoblasts. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* febrero de 2010;25(2):200-10.
456. Lee J-H, Kim B-G, Ahn J-M, Park H-J, Park S-K, Yoo J-S, et al. Role of PI3K on the regulation of BMP2-induced beta-Catenin activation in human bone marrow stem cells. *Bone.* junio de 2010;46(6):1522-32.
457. Rawadi G, Vayssière B, Dunn F, Baron R, Roman-Roman S. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* octubre de 2003;18(10):1842-53.
458. Rodríguez-Carballo E, Ulsamer A, Susperregui ARG, Manzanares-Céspedes C, Sánchez-García E, Bartrons R, et al. Conserved regulatory motifs in osteogenic gene promoters integrate cooperative effects of canonical Wnt and BMP pathways. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* abril de 2011;26(4):718-29.
459. Soshnikova N, Zechner D, Huelsken J, Mishina Y, Behringer RR, Taketo MM, et al. Genetic interaction between Wnt/ β -catenin and BMP receptor signaling during formation of the AER and the dorsal-ventral axis in the limb. *Genes Dev.* 15 de agosto de 2003;17(16):1963-8.
460. Feigenson K, Reid M, See J, Crenshaw III EB, Grinspan JB. Canonical Wnt signalling requires the BMP pathway to inhibit oligodendrocyte maturation. *ASN Neuro.* 2011;3(3):e00061.
461. Tang D-Z, Hou W, Zhou Q, Zhang M, Holz J, Sheu T-J, et al. Osthole Stimulates Osteoblast Differentiation and Bone Formation by Activation of β -Catenin-BMP Signaling. *J Bone Miner Res.* junio de 2010;25(6):1234-45.
462. Ling L, Nurcombe V, Cool SM. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. *Gene.* 15 de marzo de 2009;433(1-2):1-7.
463. Santos A, Bakker AD, de Blicke-Hogervorst JMA, Klein-Nulend J. WNT5A induces osteogenic differentiation of human adipose stem cells via rho-associated kinase ROCK. *Cytotherapy.* noviembre de 2010;12(7):924-32.
464. Bas A, Lopez I, Perez J, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E. Reversibility of calcitriol-induced medial artery calcification in rats with intact renal function. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* marzo de 2006;21(3):484-90.

465. Henley C, Colloton M, Cattley RC, Shatzen E, Towler DA, Lacey D, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 but not cinacalcet HCl (Sensipar/Mimpara) treatment mediates aortic calcification in a rat model of secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* julio de 2005;20(7):1370-7.
466. Lopez I, Aguilera-Tejero E, Mendoza FJ, Almaden Y, Perez J, Martin D, et al. Calcimimetic R-568 decreases extraosseous calcifications in uremic rats treated with calcitriol. *J Am Soc Nephrol JASN.* marzo de 2006;17(3):795-804.
467. Zebger-Gong H, Müller D, Diercke M, Haffner D, Hocher B, Verberckmoes S, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3-induced aortic calcifications in experimental uremia: up-regulation of osteoblast markers, calcium-transporting proteins and osterix. *J Hypertens.* febrero de 2011;29(2):339-48.
468. Aoshima Y, Mizobuchi M, Ogata H, Kumata C, Nakazawa A, Kondo F, et al. Vitamin D receptor activators inhibit vascular smooth muscle cell mineralization induced by phosphate and TNF- α . *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* mayo de 2012;27(5):1800-6.
469. Canalejo A, Almadén Y, Torregrosa V, Gomez-Villamandos JC, Ramos B, Campistol JM, et al. The In Vitro Effect of Calcitriol on Parathyroid Cell Proliferation and Apoptosis. *J Am Soc Nephrol.* 10 de enero de 2000;11(10):1865-72.
470. Alvarez-Hernández D, Naves M, Santamaría I, Menárguez J, Torregrosa V, Cannata J. Response of parathyroid glands to calcitriol in culture: Is this response mediated by the genetic polymorphisms in vitamin D receptor? *Kidney Int Suppl.* junio de 2003;(85):S19-22.
471. Makita N, Suzuki M, Asami S, Takahata R, Kohzaki D, Kobayashi S, et al. Two of four alternatively spliced isoforms of RUNX2 control osteocalcin gene expression in human osteoblast cells. *Gene.* 30 de abril de 2008;413(1-2):8-17.
472. Pike JW, Meyer MB. The Vitamin D Receptor: New Paradigms for the Regulation of Gene Expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D3. *Endocrinol Metab Clin North Am.* junio de 2010;39(2):255-69.
473. Issa LL, Leong GM, Sutherland RL, Eisman JA. Vitamin D analogue-specific recruitment of vitamin D receptor coactivators. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* mayo de 2002;17(5):879-90.
474. Larriba MJ, Ordóñez-Morán P, Chicote I, Martín-Fernández G, Puig I, Muñoz A, et al. Vitamin D Receptor Deficiency Enhances Wnt/ β -Catenin Signaling and Tumor Burden in Colon Cancer. *PLoS ONE.* 15 de agosto de 2011;6(8):e23524.
475. Pendás-Franco N, Aguilera O, Pereira F, González-Sancho JM, Muñoz A. Vitamin D and Wnt/beta-catenin pathway in colon cancer: role and regulation of DICKKOPF genes. *Anticancer Res.* octubre de 2008;28(5A):2613-23.

476. Fretz JA, Zella LA, Kim S, Shevde NK, Pike JW. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the expression of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 via deoxyribonucleic acid sequence elements located downstream of the start site of transcription. *Mol Endocrinol Baltim Md.* septiembre de 2006;20(9):2215-30.
477. Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH-J, Glass DA, et al. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol.* 15 de abril de 2002;157(2):303-14.
478. Rajamannan NM. The role of Lrp5/6 in cardiac valve disease: Experimental hypercholesterolemia in the ApoE^{-/-}/Lrp5^{-/-} mice. *J Cell Biochem.* 1 de octubre de 2011;112(10):2987-91.
479. Sheng R, Kim H, Lee H, Xin Y, Chen Y, Tian W, et al. Cholesterol selectively activates canonical Wnt signalling over non-canonical Wnt signalling. *Nat Commun [Internet].* 15 de julio de 2014 [citado 21 de octubre de 2014];5. Recuperado a partir de: <http://www.nature.com/ncomms/2014/140715/ncomms5393/full/ncomms5393.html>
480. Pálmer HG, Anjos-Afonso F, Carmeliet G, Takeda H, Watt FM. The Vitamin D Receptor Is a Wnt Effector that Controls Hair Follicle Differentiation and Specifies Tumor Type in Adult Epidermis. *PLoS ONE.* 23 de enero de 2008;3(1):e1483.
481. Boström K. Proinflammatory Vascular Calcification. *Circ Res.* 24 de junio de 2005;96(12):1219-20.
482. Shao J-S, Cheng S-L, Sadhu J, Towler DA. Inflammation and the Osteogenic Regulation of Vascular Calcification: A Review & Perspective. *Hypertension.* marzo de 2010;55(3):579-92.
483. Dalfino G, Simone S, Porreca S, Cosola C, Balestra C, Manno C, et al. Bone morphogenetic protein-2 may represent the molecular link between oxidative stress and vascular stiffness in chronic kidney disease. *Atherosclerosis.* agosto de 2010;211(2):418-23.
484. Finch JL, Suarez EB, Husain K, Ferder L, Cardema MC, Glenn DJ, et al. Effect of combining an ACE inhibitor and a VDR activator on glomerulosclerosis, proteinuria, and renal oxidative stress in uremic rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 1 de enero de 2012;302(1):F141-9.
485. Aikawa E, Nahrendorf M, Figueiredo J-L, Swirski FK, Shtatland T, Kohler RH, et al. Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation.* 11 de diciembre de 2007;116(24):2841-50.
486. Jeziorska M, McCollum C, Woolley DE. Calcification in atherosclerotic plaque of human carotid arteries: associations with mast cells and macrophages. *J Pathol.* mayo de 1998;185(1):10-7.

487. Nadra I, Bocaccini AR, Philippidis P, Whelan LC, McCarthy GM, Haskard DO, et al. Effect of particle size on hydroxyapatite crystal-induced tumor necrosis factor alpha secretion by macrophages. *Atherosclerosis*. enero de 2008;196(1):98-105.
488. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev*. abril de 2006;86(2):515-81.
489. Zampetaki A, Zhang Z, Hu Y, Xu Q. Biomechanical stress induces IL-6 expression in smooth muscle cells via Ras/Rac1-p38 MAPK-NF-kappaB signaling pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. junio de 2005;288(6):H2946-54.
490. Yang X, Coriolan D, Murthy V, Schultz K, Golenbock DT, Beasley D. Proinflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells: role of efficient Toll-like receptor 4 signaling. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol*. 1 de septiembre de 2005;289(3):H1069-76.
491. Kiyan Y, Tkachuk S, Hilfiker-Kleiner D, Haller H, Fuhrman B, Dumler I. oxLDL induces inflammatory responses in vascular smooth muscle cells via urokinase receptor association with CD36 and TLR4. *J Mol Cell Cardiol*. enero de 2014;66:72-82.
492. Goodman WG. The consequences of uncontrolled secondary hyperparathyroidism and its treatment in chronic kidney disease. *Semin Dial*. junio de 2004;17(3):209-16.
493. Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol*. septiembre de 2008;8(9):685-98.
494. Aranow C. Vitamin D and the Immune System. *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res*. agosto de 2011;59(6):881-6.
495. Krishnan AV, Feldman D. Molecular pathways mediating the anti-inflammatory effects of calcitriol: implications for prostate cancer chemoprevention and treatment. *Endocr Relat Cancer*. marzo de 2010;17(1):R19-38.
496. Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer*. mayo de 2014;14(5):342-57.
497. Alkharfy KM, Al-Daghri NM, Yakout SM, Ahmed M. Calcitriol attenuates weight-related systemic inflammation and ultrastructural changes in the liver in a rodent model. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. enero de 2013;112(1):42-9.
498. Vojinovic J. Vitamin D receptor agonists' anti-inflammatory properties. *Ann N Y Acad Sci*. mayo de 2014;1317:47-56.

499. Li X, Speer MY, Yang H, Bergen J, Giachelli CM. Vitamin D receptor activators induce an anticalcific paracrine program in macrophages: requirement of osteopontin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* febrero de 2010;30(2):321-6.
500. Sun J, Kong J, Duan Y, Szeto FL, Liao A, Madara JL, et al. Increased NF-kappaB activity in fibroblasts lacking the vitamin D receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* agosto de 2006;291(2):E315-22.
501. Szeto FL, Sun J, Kong J, Duan Y, Liao A, Madara JL, et al. Involvement of the vitamin D receptor in the regulation of NF-kappaB activity in fibroblasts. *J Steroid Biochem Mol Biol.* marzo de 2007;103(3-5):563-6.
502. Wu S, Xia Y, Liu X, Sun J. Vitamin D receptor deletion leads to reduced level of IkappaBalpha protein through protein translation, protein-protein interaction, and post-translational modification. *Int J Biochem Cell Biol.* febrero de 2010;42(2):329-36.
503. Tukaj S, Trzonkowski P, Tukaj C. Regulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on vascular smooth muscle cells. *Acta Biochim Pol.* 2012;59(3):395-400.
504. Sun X, Zemel MB. Calcitriol and calcium regulate cytokine production and adipocyte-macrophage cross-talk. *J Nutr Biochem.* junio de 2008;19(6):392-9.
505. Rigby WF, Shen L, Ball ED, Guyre PM, Fanger MW. Differentiation of a human monocytic cell line by 1,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol): a morphologic, phenotypic, and functional analysis. *Blood.* noviembre de 1984;64(5):1110-5.
506. Olsson I, Gullberg U, Ivhed I, Nilsson K. Induction of differentiation of the human histiocytic lymphoma cell line U-937 by 1 alpha,25-dihydroxycholecalciferol. *Cancer Res.* diciembre de 1983;43(12 Pt 1):5862-7.
507. Overbergh L, Decallonne B, Valckx D, Verstuyf A, Depovere J, Laureys J, et al. Identification and immune regulation of 25-hydroxyvitamin D-1-alpha-hydroxylase in murine macrophages. *Clin Exp Immunol.* abril de 2000;120(1):139-46.
508. Choi H, Myung K. Calcitriol enhances fat synthesis factors and calpain activity in co-cultured cells. *Cell Biol Int.* agosto de 2014;38(8):910-7.
509. Tan X, Wen X, Liu Y. Paricalcitol Inhibits Renal Inflammation by Promoting Vitamin D Receptor-Mediated Sequestration of NF-kB Signaling. *J Am Soc Nephrol.* 9 de enero de 2008;19(9):1741-52.
510. Park JW, Bae EH, Kim IJ, Ma SK, Choi C, Lee J, et al. Paricalcitol attenuates cyclosporine-induced kidney injury in rats. *Kidney Int.* junio de 2010;77(12):1076-85.

511. Hwang HS, Yang KJ, Park KC, Choi HS, Kim SH, Hong SY, et al. Pretreatment with paricalcitol attenuates inflammation in ischemia-reperfusion injury via the up-regulation of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* mayo de 2013;28(5):1156-66.
512. Himmelfarb J, Hakim RM. Oxidative stress in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* noviembre de 2003;12(6):593-8.
513. Izquierdo MJ, Cavia M, Muñoz P, Francisco AL de, Arias M, Santos J, et al. Paricalcitol reduces oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients. *BMC Nephrol.* 1 de diciembre de 2012;13(1):1-7.
514. Gloire G, Piette J. Redox regulation of nuclear post-translational modifications during NF-kappaB activation. *Antioxid Redox Signal.* septiembre de 2009;11(9):2209-22.
515. Sung C-C, Hsu Y-C, Chen C-C, Lin Y-F, Wu C-C. Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:301982.
516. Ward RA, McLeish KR. Polymorphonuclear leukocyte oxidative burst is enhanced in patients with chronic renal insufficiency. *J Am Soc Nephrol JASN.* marzo de 1995;5(9):1697-702.
517. Anrather J, Racchumi G, Iadecola C. NF-kappaB regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox. *J Biol Chem.* 3 de marzo de 2006;281(9):5657-67.
518. Kretz-Remy C, Mehlen P, Mirault ME, Arrigo AP. Inhibition of I kappa B-alpha phosphorylation and degradation and subsequent NF-kappa B activation by glutathione peroxidase overexpression. *J Cell Biol.* 6 de enero de 1996;133(5):1083-93.
519. Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med.* 15 de agosto de 2001;31(4):509-19.
520. Byon CH, Javed A, Dai Q, Kappes JC, Clemens TL, Darley-Usmar VM, et al. Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *J Biol Chem.* 30 de mayo de 2008;283(22):15319-27.
521. Liberman M, Johnson RC, Handy DE, Loscalzo J, Leopold JA. Bone morphogenetic protein-2 activates NADPH oxidase to increase endoplasmic reticulum stress and human coronary artery smooth muscle cell calcification. *Biochem Biophys Res Commun.* 30 de septiembre de 2011;413(3):436-41.
522. Dong J, Wong SL, Lau CW, Lee HK, Ng CF, Zhang L, et al. Calcitriol protects renovascular function in hypertension by down-regulating angiotensin II type 1 receptors and reducing oxidative stress. *Eur Heart J.* diciembre de 2012;33(23):2980-90.

523. Sun X, Zemel MB. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 modulation of adipocyte reactive oxygen species production. *Obes Silver Spring Md.* agosto de 2007;15(8):1944-53.
524. Sun X, Zemel MB. Calcium and 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulation of adipokine expression. *Obes Silver Spring Md.* febrero de 2007;15(2):340-8.
525. Ari E, Kedrah AE, Alahdab Y, Bulut G, Eren Z, Baytekin O, et al. Antioxidant and renoprotective effects of paricalcitol on experimental contrast-induced nephropathy model. *Br J Radiol.* agosto de 2012;85(1016):1038-43.
526. Husain K, Ferder L, Mizobuchi M, Finch J, Slatopolsky E. Combination Therapy with Paricalcitol and Enalapril Ameliorates Cardiac Oxidative Injury in Uremic Rats. *Am J Nephrol.* 2009;29(5):465-72.
527. Shroff R, Egerton M, Bridel M, Shah V, Donald AE, Cole TJ, et al. A bimodal association of vitamin D levels and vascular disease in children on dialysis. *J Am Soc Nephrol JASN.* junio de 2008;19(6):1239-46.
528. Mellenthin L, Wallaschofski H, Grotevendt A, Völzke H, Nauck M, Hannemann A. Association between serum vitamin D concentrations and inflammatory markers in the general adult population. *Metabolism.* agosto de 2014;63(8):1056-62.

In vascular smooth muscle cells paricalcitol prevents phosphate-induced Wnt/ β -catenin activation

Julio M. Martínez-Moreno,¹ Juan R. Muñoz-Castañeda,¹ Carmen Herencia,¹ Addy Montes de Oca,² Jose C. Estepa,² Rocio Canalejo,¹ Maria E. Rodríguez-Ortiz,¹ Pablo Perez-Martinez,³ Escolástico Aguilera-Tejero,² Antonio Canalejo,⁴ Mariano Rodríguez,¹ and Yolanda Almadén³

¹Servicio de Nefrología, Red in Ren, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba, (IMIBIC) Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, Spain; ²Department of Medicina y Cirugía Animal, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain; ³Lipid and Atherosclerosis Unit, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Reina Sofía University Hospital/University of Córdoba, and Centro de Investigación Biomédica en Red de la Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Instituto de Salud Carlos III, Córdoba, Spain; and ⁴Department of Biología Ambiental y Salud Pública, Universidad de Huelva, Huelva, Spain

Submitted 20 December 2011; accepted in final form 2 August 2012

Martínez-Moreno JM, Muñoz-Castañeda JR, Herencia C, Montes de Oca A, Estepa JC, Canalejo R, Rodríguez-Ortiz ME, Perez-Martinez P, Aguilera-Tejero E, Canalejo A, Rodríguez M, Almadén Y. In vascular smooth muscle cells paricalcitol prevents phosphate-induced Wnt/ β -catenin activation. *Am J Physiol Renal Physiol* 303: F1136–F1144, 2012. First published August 8, 2012; doi:10.1152/ajprenal.00684.2011.—The present study investigates the differential effect of two vitamin D receptor agonists, calcitriol and paricalcitol, on human aortic smooth muscle cells calcification in vitro. Human vascular smooth muscle cells were incubated in a high phosphate (HP) medium alone or supplemented with either calcitriol 10^{-8} M (HP + CTR) or paricalcitol $3 \cdot 10^{-8}$ M (HP + PC). HP medium induced calcification, which was associated with the upregulation of mRNA expression of osteogenic factors such as bone morphogenetic protein 2 (BMP2), Runx2/Cbfa1, Msx2, and osteocalcin. In these cells, activation of Wnt/ β -catenin signaling was evidenced by the translocation of β -catenin into the nucleus and the increase in the expression of direct target genes as cyclin D1, axin 2, and VCAN/versican. Addition of calcitriol to HP medium (HP + CTR) further increased calcification and also enhanced the expression of osteogenic factors together with a significant elevation of nuclear β -catenin levels and the expression of cyclin D1, axin 2, and VCAN. By contrast, the addition of paricalcitol (HP + PC) not only reduced calcification but also downregulated the expression of BMP2 and other osteoblastic phenotype markers as well as the levels of nuclear β -catenin and the expression of its target genes. The role of Wnt/ β -catenin on phosphate- and calcitriol-induced calcification was further demonstrated by the inhibition of calcification after addition of Dickkopf-related protein 1 (DKK-1), a specific natural antagonist of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. In conclusion, the differential effect of calcitriol and paricalcitol on vascular calcification appears to be mediated by a distinct regulation of the BMP and Wnt/ β -catenin signaling pathways.

vascular calcification; calcitriol; paricalcitol; VSMCs; Wnt/ β -catenin

UREMIC PATIENTS FREQUENTLY present vascular calcifications (VC), which contributes to the high rate of cardiovascular morbidity and mortality observed in these patients (61). The generation of VC in uremic patients is multifactorial, and the mechanisms are partially understood (35). Abnormal mineral metabolism, and particularly the accumulation of phosphate,

plays a central role in the generation of VC (3, 25). Chronic inflammation has also been proposed as an important factor in the process of VC (34, 50).

Calcitriol [$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$], the most active metabolite of vitamin D, is a key regulator of mineral metabolism through its direct effect on intestine, kidney, bone, and parathyroid glands. Chronic kidney disease (CKD) patients, often develop secondary hyperparathyroidism (2°HPT) because of the retention of phosphate and the deficiency of calcitriol synthesis, both due to the reduction of functional renal mass, which eventually lead to hypocalcemia. Thus, in the last decades, therapeutic strategies to control 2°HPT incorporated high doses of vitamin D, mainly as calcitriol, that may contribute to the development of VCs (13). The vitamin D analog 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ (paricalcitol) is now commonly used to treat 2°HPT in CKD patients because it effectively suppress parathyroid hormone but is less calcemic and phosphatemic than calcitriol (29, 53).

The administration of calcitriol to CKD patients may cause VC by increasing the serum levels of calcium and phosphate. Other studies (45) have suggested that calcitriol and other vitamin D receptor (VDR) activators such as paricalcitol may have a direct effect on VC that is independent of calcium and phosphorus. Paricalcitol seems to produce less calcification than calcitriol (4, 28, 33). However, the cellular mechanisms driving the differential effects of calcitriol and paricalcitol on VC have not been elucidated. We hypothesized that factors regulating osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) may respond differently to calcitriol and paricalcitol.

Bone morphogenetic proteins (BMPs) and proteins of the Wnt family are extremely potent anabolic regulators of bone formation, and both have been implicated in the regulation of VC (7, 17, 31, 49, 51, 57). BMP2 upregulates transcription factors as the runt-related transcript factor 2 (Runx2/Cbfa1) and the Msh homeobox 2 (Msx2), master regulators of osteogenesis (30). Furthermore, Wnt signaling, which is essential for the commitment of pluripotent mesenchymal cells, has also been shown to be activated during the development of VC in vivo and in vitro (5, 8, 23, 31, 51). Wnt proteins (revised in 26) are a large family of secreted signaling molecules that signal through binding to a coreceptor complex formed by the proteins of the frizzled (Fzd) family and the lipoprotein receptor-related 5/6 proteins (Lrp5/6). The activation of the canonical

Address for reprint requests and other correspondence: Y. A. Peña, Unidad de Investigación, IMIBIC, Hospital Reina Sofía, Avda. Menéndez Pidal s/n, 14004 Córdoba, Spain (e-mail: yolandaalmaden@yahoo.es).

Wnt pathway results in the inactivation of a destruction complex that phosphorylates β -catenin and targets it for ubiquitin-proteasome-mediated degradation; thus β -catenin is able to translocate to the nucleus and regulates the expression of target genes.

The aim of the present study was to investigate possible differences between the effect of calcitriol and paricalcitol on osteogenic signals, mainly the Wnt/ β -catenin signaling, in human aortic smooth muscle cells (HASMCs) *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture. HASMCs were obtained from Clonetics (Lonza, Walkersville, MD). Cells were cultured in DMEM supplemented with 15% heat-inactivated FBS (BioWhittaker), Na piruvate (1 mmol/l), glutamine (4.5 g/l), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/ml), and HEPES (20 mmol/l) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. HASMCs of passage 5–8 were used in the experiments. To induce calcification, after reaching 80% confluence, HASMCs were incubated for 9 days in a high phosphate medium (calcification medium) that contained Na₂HPO₄³⁻ and NaH₂PO₄³⁻ salts in 1:2 proportion (Sigma Aldrich) to obtain a final phosphate concentration of 3.3 mmol/l. The medium was replaced with fresh medium every 2–3 days. Depending on the experiments, calcification medium was supplemented with calcitriol 10⁻⁸M, paricalcitol 3·10⁻⁸M, or other drugs such as Dickkopf-related protein 1 (DKK-1; ref 5439-DK-010; R&D Systems; 100 ng/ml; a secreted, endogenous extracellular Wnt/ β -catenin inhibitory gene product that is commercially available). Cells that were incubated in normal phosphate (0.9 mmol/l) medium were used as controls.

Assessment of calcium deposition. After 9 days of incubation, calcification was quantified. Cells were decalcified with HCl (0.6 mol/l) for 24 h. The calcium content of the supernatants was determined by spectrophotometer at 612 nm by a kit containing phenol-sulphonphthalein dye (no. DICA008, QuantiChrom calcium assay kit; BioAssay Systems). Then, the cells were washed three times with PBS (Sigma Aldrich) and solubilized in 0.1 mol/l NaOH/0.1% SDS. The protein content was measured using the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany), and the calcium content was normalized for total protein.

Real-time RT-PCR. Total RNA was isolated from each sample of HASMCs using 500 μ l Trizol (Sigma) by processing according to the manufacturer's recommendation. Real-time RT-PCR was performed in duplicate with QuantiTect SYBR Green one-step RT-PCR Kit (ref. no. 204243; Qiagen) in a final volume of 20 μ l from 30 ng of total RNA. All PCR amplifications were carried out using Lightcycler 480 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). The expression of target genes was normalized to the expression of GAPDH. The primers for PCR amplification are indicated in Table 1.

Protein extracts and Western blot. Proteins were isolated from HASMCs using lysis buffer containing HEPES (10 mmol/l), KCl (10 mmol/l), EDTA (0.1 mmol/l), EGTA (0.1 mmol/l), dithiothreitol (1 mmol/l), PMSF (0.5 mmol/l), protease inhibitor cocktail (70 mg/ml; Sigma Aldrich), and Igepal CA-630 (0.6%) at pH 7.9. The suspension

was centrifuged, and the supernatant (cytosolic extract) was stored. Nuclear extracts were obtained by incubating the pellet separated from the cytosolic extract in a lysis buffer containing HEPES (20 mmol/l), NaCl (0.4 mmol/l), EDTA (1 mmol/l), EGTA (1 mmol/l), dithiothreitol (1 mmol/l), PMSF (1 mmol/l), and protease inhibitor cocktail (46 mg/ml) at pH 7.9. Protein concentration was determined with the Bradford method (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany). For Western blot, equal amounts of protein were electrophoresed in 10% SDS-polyacrylamide gel (Invitrogen, Carlsbad, CA) and subsequently transferred to a nitrocellulose membrane (Invitrogen). The membranes were blocked with 5% nonfat dried milk for 1 h at room temperature and then incubated with primary antibody for 2 h at room temperature. Primary antibodies used included rabbit polyclonal β -catenin antibody (ref. no. L9562; Cell Signaling) and rabbit polyclonal TFIIB antibody (ref. no. SC-225; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Blots were immunolabeled using a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and developed on autoradiographic film using the ECL Plus Western blotting detection system (Amersham Biosciences, Little Chalfont, England). Specific bands were quantified by densitometric analyses with Quantity One 4.4.0 software (Bio-Rad Laboratories) and were normalized to TFIIB levels.

Confocal microscopy. Cells were seeded on coverslips, and after reaching 90% confluence, they received the different treatments for 24 h. Then, they were rinsed in PBS and fixed and permeated in cold 50% methanol for 2 min, cold 100% methanol for 20 min, and cold 50% methanol for 2 min. The specimens were subsequently washed once in PBS (3 \times 5 min) and incubated for 2 h with anti- β -catenin antibody (1:50; BD Pharmigen, Franklin Lakes, NJ) in blocking solution (1% BSA) at room temperature. After being washed with PBS (3 \times 5 min), specimens were incubated for 1 h with Alexa Fluor 488 F(ab')₂ fragment of rabbit anti-mouse IgG (1:500; ref. no. A-21204; Invitrogen) in PBS containing 1% BSA. After a final wash with PBS (3 \times 5 min), the specimens were counterstained with DAPI for nuclear stain. Cells were mounted on slides to examine fluorescence using a LSM 5 Exciter Carl Zeiss confocal microscope. Pictures were obtained at \times 40 in Axio Observer Z1 inverted confocal microscope (LSM5 Exciter Zeiss). ImageJ software (National Institutes of Health) was used to analyze confocal immunofluorescence staining. Mander's coefficient M2 plugin (DAPI vs. green) was used to analyze nuclear translocation of β -catenin. Mander's coefficient M2 is the percentage of above-background pixels in blue color (DAPI) that overlap above-background pixels in green color (β -catenin).

Statistical analysis. Results are expressed as means \pm SE. The difference between means for three or more groups was assessed by one-way ANOVA followed by post hoc Duncan analysis. The difference between means for two different groups was determined by *t*-test. A *P* value <0.05 was considered significant. These analyses were performed with the assistance of a computer program (SPSS 15.0, Chicago, IL).

RESULTS

Effect of calcitriol and paricalcitol on VSMC calcification. Incubation of HASMCs in a high phosphate (3.3 mmol/l) medium for 9 days (HP) induced calcification compared with

Table 1. Primers used for quantitative real-time RT-PCR

Gene	Sense Primer	Antisense Primer
GAPDH	5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3'	5'-TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT-3'
Cyclin D1	5'-CCGAGGAGCTGCTGCAATGGA-3'	5'-ATGGAGGGCGGATTGGAATGAAC-3'
BMP2	5'-AGGAGGCAAGAAAAGGAACGGAC-3'	5'-GGAAGCAGCAACGCTAGAAGACAG-3'
Msx2	5'-AAATTCAGAAGATGGAGCGCGGTG-3'	5'-CTGGGATGTGGTAAAGGGCGTGGC-3'
Runx2	5'-CCGAGTGGACGAGGCAAGAGTT-3'	5'-AGCTTCTGTCTGTCCCTTCTGGG-3'
Osteocalcin	5'-GCAGAGTCCAGCAAAGGTGCAGCC-3'	5'-GCCTCCTGAAAGCCGATGTGGTCA-3'

BMP2, bone morphogenetic protein 2.

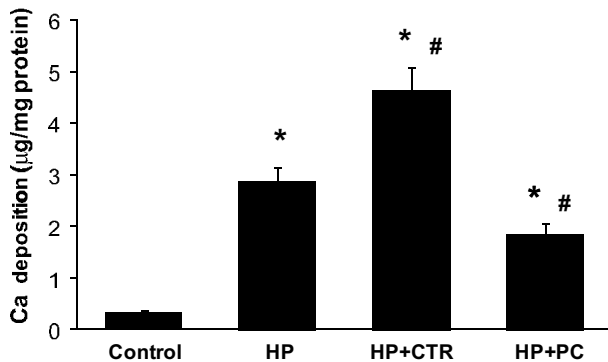


Fig. 1. Effect of calcitriol and paricalcitol on human aortic smooth muscle cell (HASMC) calcification. HASMCs are incubated for 9 days in a high (3.3 mmol/l) phosphate (HP) medium (calcification medium) alone or supplemented with either calcitriol 10^{-8} M (HP + CTR) or paricalcitol $3 \cdot 10^{-8}$ M (HP + PC). Cells incubated in normal phosphate (0.9 mmol/l) medium are used as controls. Calcium content is determined with the phenolsulphonephthalein dye. Bars are means \pm SE (5 independent experiments; 6 repetitions in each experiment). * $P < 0.05$ vs. control. # $P < 0.05$ vs. HP.

cells maintained in a medium with 0.9 mmol/l phosphate (control; $P < 0.05$; Fig. 1). The addition of calcitriol (10^{-8} M) to cells in HP medium (HP + CTR) further increased the degree of calcification observed with HP alone ($P < 0.05$). Conversely, the addition of paricalcitol ($3 \cdot 10^{-8}$ M; HP + PC) produced a significant reduction in calcification relative to the observed in cells in HP medium ($P < 0.05$). Nevertheless, in the HP + PC cells the calcium content remained higher than in control cells cultured in 0.9 mmol/L P ($P < 0.05$).

Osteoblast phenotype. The levels of BMP2 mRNA were greater in cells incubated in HP medium than in controls ($P < 0.05$; Fig. 2A). The addition of calcitriol further increased the expression of BMP2 mRNA compared with the HP cells ($P <$

0.05). In cells treated with paricalcitol, the levels of BMP2 mRNA were not different from control cells.

The gene expression of the osteoblastic-specific marker Runx2 was significantly increased in cells on HP compared with controls ($P < 0.05$; Fig. 2B). Again calcitriol caused additional increase of Runx2 expression ($P < 0.05$ vs. HP cells), whereas paricalcitol failed to increase the expression of Runx2 mRNA beyond the values observed in HP cells.

Similarly to that observed with Runx2, the expression of Msx2 mRNA was increased in HP and further increased by addition of calcitriol (Fig. 2C). The addition of paricalcitol decreased the Msx2 mRNA levels to control values. The expression of *Bglap*/osteocalcin (OC) was not increased by HP but it increased when calcitriol was added to the HP medium (Fig. 2D). By contrast, paricalcitol did not modify the OC expression.

Role of the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway. Activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway results in nuclear translocation of β -catenin. The presence of β -catenin in the nucleus was assessed by Western blotting of nuclear extracts. The incubation of cells in HP induced a significant increase of the expression of nuclear β -catenin compared with controls ($P < 0.05$). The addition of calcitriol to HP medium increased the nuclear content of β -catenin; however, the addition of paricalcitol caused a reduction in the levels of nuclear β -catenin to a level similar to that observed in control cells (Fig. 3A). Intracellular localization of β -catenin was visualized by immunofluorescence using confocal microscopy (Fig. 3B). Control cells showed immunofluorescence staining of β -catenin only in the cytoplasm, whereas cells cultured in HP showed marked expression of β -catenin at the nuclear level. HP + CTR cells also exhibited marked staining for nuclear β -catenin. By contrast, in HP + PC, β -catenin expression was mainly restricted to the cytoplasm. Quantification by the Mander's

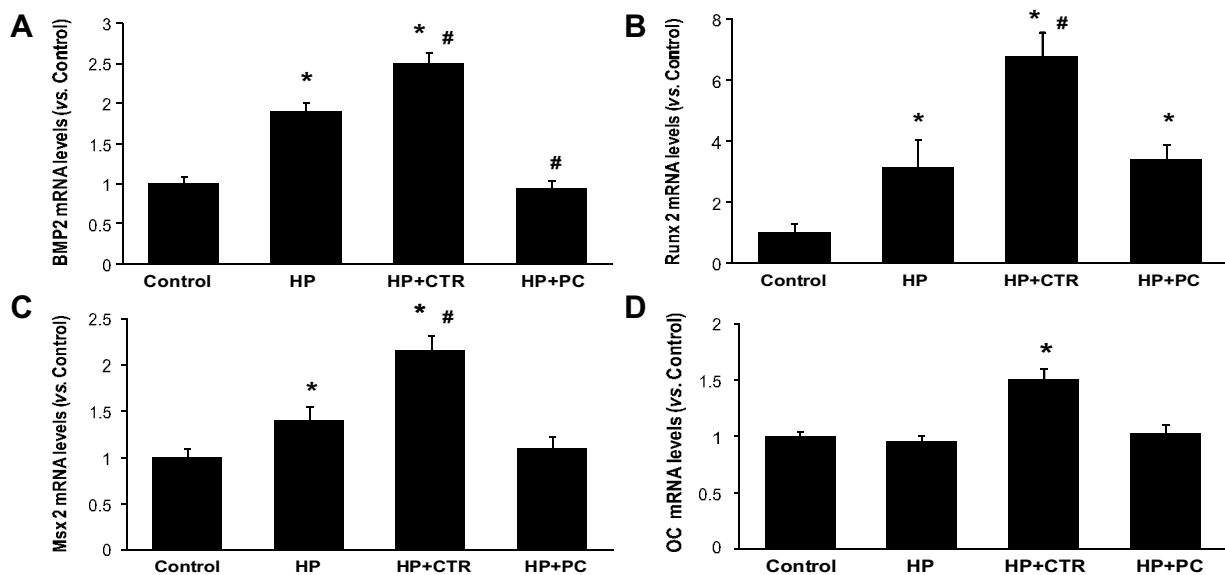


Fig. 2. Effect of calcitriol and paricalcitol on the expression of markers of osteoblastic phenotype during HASMC calcification. HASMCs are incubated for 9 days in a high (3.3 mmol/l) phosphate (HP) medium (calcification medium) alone or supplemented with either calcitriol 10^{-8} M (HP + CTR) or paricalcitol $3 \cdot 10^{-8}$ M (HP + PC). Cells incubated in normal phosphate (0.9 mmol/l) medium are used as controls. mRNA levels are analyzed by real-time RT-PCR technique. Expression of target genes are normalized to the expression of GAPDH. A: bone morphogenetic protein 2 (BMP2) mRNA expression. B: Runx2/Cbfa1 mRNA expression. C: Msx2 mRNA expression. D: osteocalcin/*Bglap* mRNA expression. Bars are means \pm SE (3 independent experiments; 6 repetitions in each experiment). OC, osteocalcin. * $P < 0.05$ vs. control. # $P < 0.05$ vs. HP.

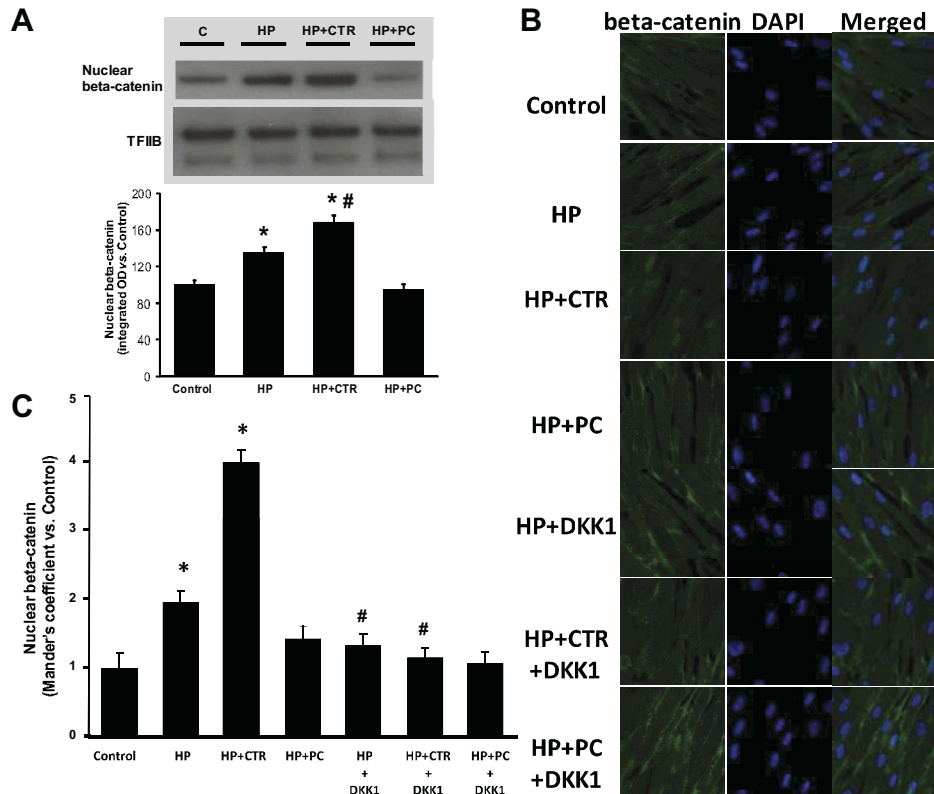


Fig. 3. Effect of calcitriol and paricalcitol on the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway during HASMC calcification. HASMCs are incubated for 24 h in a high (3.3 mmol/l) phosphate (HP) medium (calcification medium) alone or supplemented with either calcitriol 10^{-8} M (HP + CTR) or paricalcitol $3 \cdot 10^{-8}$ M (HP + PC). Cells incubated in normal phosphate (0.9 mmol/l) medium are used as controls. **A**: levels of nuclear β -catenin is assessed by western blotting of nuclear extracts. Image represents 3 different experiments. Quantification is performed by measurement of the integrated optical density (OD) and normalized to TFIIB levels. Data are means \pm SE of the 3 independent experiments. * $P < 0.05$ vs. control. # $P < 0.05$ vs. HP. **B**: HASMCs are incubated for 24 h in a high (3.3 mmol/l) phosphate (HP) medium (calcification medium) alone or supplemented with either calcitriol 10^{-8} M (HP + CTR) or paricalcitol $3 \cdot 10^{-8}$ M (HP + PC) alone or with the addition to culture medium (100 ng/ml) of commercially available Dickkopf-related protein 1 (DKK-1), a specific endogenous extracellular antagonist of the Wnt signaling. Intracellular localization of β -catenin is visualized by immunofluorescence using confocal microscopy. For each treatment, β -catenin staining (green immunofluorescence) is shown at left; at middle, the same sample is counterstained with DAPI (blue) for nuclear stain; the merged image is shown at right. Images represent 3 different experiments. **C**: quantification of nuclear β -catenin staining is performed by the Mander's coefficient (M2 plugin: DAPI vs. green). * $P < 0.05$ vs. control. # $P < 0.05$ vs. the same treatment without DKK-1.

coefficient M2 plugin (DAPI vs. green), confirmed the significance of differences in the levels of β -catenin fluorescence in HP and HP + CTR compared with control cells ($P < 0.05$ and $P < 0.05$, respectively; Fig. 3C).

The relevance of Wnt/ β -catenin signaling activation in calcification was tested by addition to culture medium (100 ng/ml) of DKK-1, a commercially available specific endogenous extracellular antagonist of the Wnt signaling (1, 26). As shown in Fig. 4, the addition of DKK-1 reduced the level of calcification induced by high phosphate ($P < 0.05$ vs. HP cells) and prevented the increase in calcification induced by calcitriol ($P < 0.05$ vs. HP + CTR cells); a trend toward a decreased calcification, although not significant, was also observed after addition of DKK-1 to HP + PC cells. The effect of DKK-1 on β -catenin translocation was also evaluated by confocal immunofluorescence (Fig. 3, B and C). The increase of nuclear β -catenin expression in HP and HP + CTR cells was abolished by coinubation with DKK-1 ($P < 0.05$ vs. controls).

Additional direct Wnt/ β -catenin transcriptional targets were examined, including cyclin D1 (an early marker of cells entering the cell cycle), VCAN/versican (a large chondroitin sulfate proteoglycan; a member of the aggrecan/versican proteoglycan

family), and axin 2 (axis inhibition protein 2 or conductin; a member of the Wnt/ β -catenin signaling pathway that regulates the stability of β -catenin). Effects of cotreatment with the inhibitor DKK-1 on the expression of genes were also tested (Fig. 5). The mRNA expression of cyclin D1 was similarly elevated in cells in HP and HP + CTR compared with control cells ($P < 0.05$). In cells treated with HP + PC, the cyclin D1 mRNA level was greater than in control ($P < 0.05$) but lower than in HP and HP + CTR cells ($P < 0.05$). Addition of DKK-1 dramatically reduced cyclin D1 mRNA to a level not different from that of control. VCAN expression was also increased in HP, HP + CTR, and HP + PC cells over control ($P < 0.05$). Cotreatment with DKK-1 significantly reduced VCAN mRNA levels to control values in all the groups. Finally, compared with control, axin 2 mRNA expression was elevated in HP and HP + CTR ($P < 0.05$) but not in HP + PC group; this increase was abolished by DKK-1 ($P < 0.05$).

DISCUSSION

In the present study, we have explored the differential effect of two VDR agonists, calcitriol and paricalcitol, on VSMC

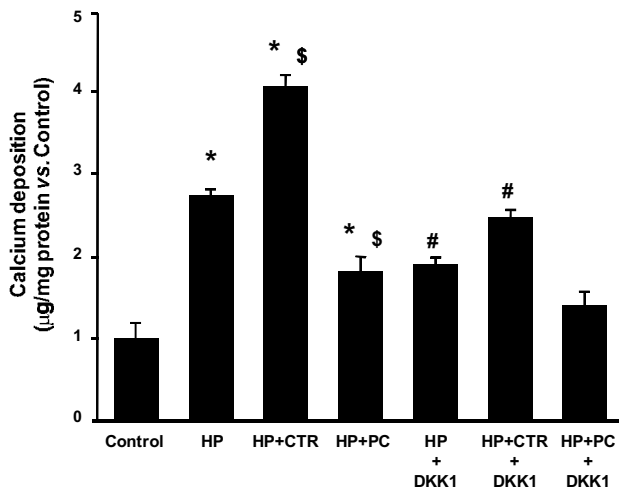


Fig. 4. Effect of the inhibition of the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway by DKK-1 on HASMC. HASMCs are incubated for 24 h in a high (3.3 mmol/l) phosphate (HP) medium (calcification medium) alone or supplemented with either calcitriol 10^{-8} M (HP + CTR) or paricalcitol $3 \cdot 10^{-8}$ M (HP + PC) alone or with the addition to culture medium (100 ng/ml) of commercially available DKK-1, a specific endogenous extracellular antagonist of the Wnt signaling. Cells incubated in normal phosphate (0.9 mmol/l) medium are used as controls. Calcium content is determined with the phenol-sulphonephthalein dye. Bars are means \pm SE (3 independent experiments; 6 repetitions in each experiment). * $P < 0.05$ vs. control. \$ $P < 0.05$ vs. HP. # $P < 0.05$ vs. the same treatment without DKK-1.

calcification in vitro. We found that calcitriol increased calcification, which appeared to be associated with the activation of the Wnt/ β -catenin and BMP2 signaling pathways. By contrast, paricalcitol decreased calcification, which was accompanied by an inhibition of the Wnt/ β -catenin pathway and downregulation of osteoblastic gene expression.

As previously demonstrated by us and other researchers (6, 36, 40, 44, 47, 49, 58), VSMCs cultured in high phosphate undergo osteogenic transformation and calcification. BMPs and Wnt ligands have been implicated in the regulation of both osteoblastic transdifferentiation of aortic VSMCs in vitro and VC (7, 17, 31, 49, 51, 57). In our study, we found that the calcification process was associated with the upregulation of osteogenic factors such as BMP2, the transcription factors Runx2/Cbfa1 and Msx2, and the procalcific protein OC. This is in agreement with previous results (56) showing that the expression of all these markers was significantly induced in calcified vessels. BMP2 is a key factor for osteogenic differentiation of mesenchymal cells that upregulates Runx2 and Msx2 (30). OC is a downstream target gene of Runx2 and Msx2 (16).

In the present study, we also show that calcification of the HASMCs is also associated with a concomitant activation of the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway. This was quantitatively demonstrated both immunocytochemically by the translocation of β -catenin into the nucleus and by the significant increase of the expression of nuclear β -catenin by Western blotting. Furthermore, the addition of DKK-1, a secreted, endogenous extracellular Wnt/ β -catenin inhibitory gene product (1, 26) that is commercially available, inhibited the calcification and the concomitant cellular changes induced by high phosphate.

The activation of β -catenin signaling modulates osteoblast proliferation and differentiation (32, 41). Other authors (22) observed VSMC proliferation in vessels developing calcification. Notably, we demonstrated that the calcification observed in the high phosphate-treated cells was accompanied by a

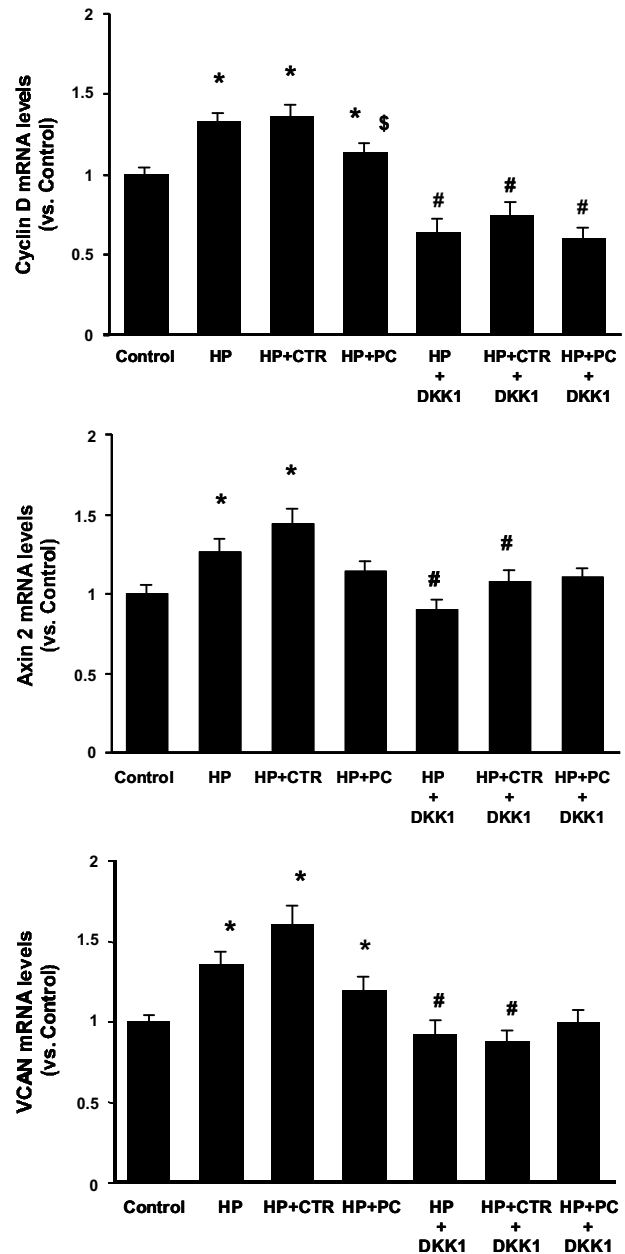


Fig. 5. Effect of calcitriol and paricalcitol on the expression of β -catenin direct transcriptional target genes, cyclin D1, axin 2, and VCAN/versican, during HASMC. HASMCs are incubated for 24 h in a high (3.3 mmol/l) phosphate (HP) medium (calcification medium) alone or supplemented with either calcitriol 10^{-8} M (HP + CTR) or paricalcitol $3 \cdot 10^{-8}$ M (HP + PC) alone or with the addition to culture medium (100 ng/ml) of commercially available DKK-1, a specific endogenous extracellular antagonist of the Wnt signaling. Cells incubated in normal phosphate (0.9 mmol/l) medium are used as controls. mRNA levels are analyzed by real-time RT-PCR technique. Expression of target gene mRNA is normalized to the expression of GAPDH. Bars are means \pm SE (3 independent experiments; 6 repetitions in each experiment). * $P < 0.05$ vs. control. \$ $P < 0.05$ vs. HP. # $P < 0.05$ vs. the same treatment without DKK-1.

significant increase in the expression of cyclin D1, an early marker of cell proliferation. Cyclin D1 has been shown to be a direct target gene of the activation of the canonical Wnt/ β -catenin (52), and it is required for propagation of specific types of osteoprogenitors at various developmental stages (32). Importantly, it has also been shown to be upregulated in VSMCs in response to Wnt signaling (59). Thus the increase of the cyclin D1 mRNA levels that we have observed is in accordance with previous data (5, 41) reporting that in the vasculature nuclear β -catenin signals may drive VSMC proliferation. The upregulation of this and other direct transcriptional target genes as axin 2 (62) and VCAN (42), as well as the abrogation of this effect by DKK-1 that we have observed in this study, is consistent with the activating effect of the Wnt/ β -catenin signaling on VC of HASMCs.

The role of BMP and Wnt signaling on VC remains to be elucidated (31). Both contribute to the regulation of bone mass by promoting osteogenesis through the direct stimulation of Runx2 gene expression (12). However, the molecular interactions between these pathways in osteoblast differentiation and bone formation are not totally defined (20). Most studies have suggested that BMP acts upstream of Wnt signaling (20). The study by Rawadi et al. (43) showed that the capacity of BMP2 and Shh (Sonic hedgehog homolog gene) to induce alkaline phosphatase relies on Wnt expression and the effects of BMP2 on extracellular matrix mineralization by osteoblasts are mediated by the induction of a canonical Wnt/ β catenin autocrine loop. In a recent study, Rodriguez-Carballo et al. (46) investigated the cooperative effects of BMP and the Wnt canonical pathway on the expression of the early osteogenic master genes *Dlx5*, *Msx2*, and *Runx2* in osteoblast differentiation. They found that induction of these genes is mediated by the formation of both protein-protein interactions between them and cooperative transcriptional complexes of BMP-dependent-activated Smads and TCF4/ β -catenin that bind to DNA-binding sites. BMPs and Wnt ligands have also been implicated in the regulation of osteoblastic transdifferentiation of VSMCs (31). The studies of Towler and colleagues (5, 34, 51) with different *in vivo* and *in vitro* models described the involvement of a BMP-Wnt/ β -catenin axis in the osteogenic regulation of VC. Nonetheless, canonical Wnt/ β -catenin signaling acting upstream of BMP signaling has been also reported. This is the case for the regulation of dorsoventral polarity in the limb (54) or the inhibition of oligodendrocyte maturation (9) during development. We are aware of one single study (55) on this Wnt-BMP hierarchy in osteoblast differentiation, which shows that osthole, a coumarin-like derivative extracted from Chinese herbs, stimulated osteoblast differentiation through a Wnt/ β -catenin dependent induction of BMP2 expression.

On the other hand, the relative contribution of canonical and noncanonical Wnts in the regulation of VC has to be explored further (51). Indeed, the role of Wnt signaling in osteogenic differentiation during bone development is still controversial. Canonical Wnt signaling may suppress osteogenic differentiation or activate osteogenesis under certain cellular conditions. Lack of uniformity in the literature may have resulted from differences in baseline cellular conditions, species employed, or even in the experimental conditions and stimuli applied (26). The effect of noncanonical Wnt activation through Wnt5a in osteogenesis has been demonstrated in adult stem cells (48) and MC3T3E1 (preosteoblasts) cells (11). The specific Wnt

milieu regulating VC is unknown; 19 murine Wnt genes exist and both canonical agonists (Wnt3a, Wnt7) and noncanonical ligands (Wnt5) that inhibit canonical Wnt actions were upregulated in an *Msx2*-dependent cardiovascular calcification model *in vivo* (51). Whether phosphate could be a new stimulator of noncanonical Wnt pathways is presently unknown.

Many *in vivo* studies (2, 4, 14, 15, 27, 33) have reported that the treatment of uremic animals with vitamin D produces an increase in VC. Koleganova et al. (22) showed that a moderate dose of calcitriol produced VC in both sham and uremic rats. This effect was observed despite no changes in serum levels of calcium and phosphate, suggesting that calcitriol may directly affect VC. Interestingly, in a model of uremic rats, the induction of aortic calcifications by calcitriol was partially reversible after discontinuation of calcitriol administration (2). *In vitro* studies were performed to evaluate a direct effect of calcitriol on VSMCs calcification. Jono et al. (19) showed that in VSMCs cultured with high phosphate, the addition of an increasing concentration of calcitriol produced a dose-dependent increase in calcification. Recently, Zebger and Gong (63) observed that a high-dose calcitriol treatment induced transformation of VSMCs into osteoblastic phenotype both in uremic rats and *in vitro*; this was associated with upregulation of proteins regulating mineralization and the osteogenic transcription factor Osterix.

In the present study, we assessed the effect of calcitriol and paricalcitol at concentrations usually tested in *in vitro* studies with VSMCs (4, 18, 49), which are in accordance with their therapeutic dosages *in vivo*. The results show that cells exposed to calcitriol exhibited a significant increase in calcification; by contrast, the addition of paricalcitol to the medium resulted in a significant decrease of calcification. Previous experimental studies (4, 28, 33) have shown that paricalcitol produced less calcification than calcitriol. Thus here we confirm that paricalcitol also exerts beneficial effects on the development of VCs. Importantly, paricalcitol tended to suppress the calcification induced by phosphate; this is in marked contrast with calcitriol that worsens the calcification induced by phosphate.

To better understand the molecular mechanisms supporting the opposed effects of calcitriol and paricalcitol on calcification, we examined the expression of the BMP2 signaling genes that appeared to be upregulated in the VSMCs exposed to high phosphate. Whereas calcitriol increased BMP2 mRNA level, paricalcitol decreased it. Consistent with this was the upregulation of *Runx2* and *Msx2* in cells treated with calcitriol and the downregulation of *Runx2* and *Msx2* in cells exposed to paricalcitol. The expression of OC was also increased by calcitriol, but no change was observed in cells exposed to paricalcitol. In addition, calcitriol did not change the upregulation of cyclin D1 induced by the high phosphate medium whereas paricalcitol tended to reduce it. Collectively, these results indicate that calcitriol and paricalcitol induced a different phenotype profile driving human aortic VSMCs toward the stimulation and the inhibition of the calcification process respectively. This is in line with previous results showing an increased expression of *Runx2* in the aorta of calcitriol-treated animals (22), while both *Runx2* expression and OC expression were upregulated in the aorta by calcitriol and doxercalciferol but not by paricalcitol (33).

Following ligand activation, the VDR binds directly to specific sequences located near promoters and recruits a variety of coregulatory complexes that perform the additional functions required to modify transcriptional output (39). Thus different cell events after activation of the same VDR may explain why some vitamin D analogs may not promote VC. It has been demonstrated that the activation of the VDR by paricalcitol or 22-oxacalcitriol recruits coactivators that are different from those recruited by calcitriol (18). Additionally, the differential effect on the calcification process that we have observed could be explained by a differential modulation of intracellular signaling pathways. As indicated above, we have demonstrated in human aortic VSMCs the involvement of Wnt/ β -catenin activation in the calcification induced by high phosphate. Thus we then explored the effect of calcitriol and paricalcitol on the Wnt/ β -catenin pathway. The increase in calcification induced by calcitriol was accompanied with a concomitant activation of the Wnt/ β -catenin with the nuclear translocation of β -catenin. This is in agreement with previous data showing that Wnt signaling proteins are implicated in bovine artery smooth muscle cell calcification in the presence of phosphate and vitamin D sterols (49). In addition, we further verified the implication of Wnt/ β -catenin activation on calcitriol-induced calcification by demonstrating a reduction on calcification after inhibition of Wnt/ β -catenin by coincubation with the specific Wnt antagonist DKK-1. The effect of paricalcitol on the Wnt/ β -catenin pathway was the opposed from that seen with calcitriol. The inhibition of calcification by paricalcitol was accompanied by a reduction in nuclear β -catenin expression to levels even lower than those observed with high phosphate in the medium. Thus our data clearly demonstrate a differential effect of calcitriol and paricalcitol on the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Of note, it has been reported that the VDR can interact with β -catenin via a noncanonical signaling to control different cell responses (38, 24). Of interest, Pálmer et al. (37) showed that a number of genes induced by β -catenin are regulated through VDR elements. Thus combined activation of VDR and Wnt signaling promoted formation of TCF/Lef- β -catenin and VDR/ β -catenin complexes that together induced genes involved in hair follicle differentiation in adult epidermis; furthermore, the vitamin D analog EB1089 synergized with β -catenin to stimulate hair differentiation. A functional interaction between the Wnt and 1,25(OH) $_2$ D $_3$ pathways has also been proposed in osteoblasts. Interestingly, VDR activation by 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ caused upregulation of low-density lipoprotein receptor-related protein 5, a Wnt coreceptor that plays an important role in bone formation (10, 21), through its binding to a VDR element (10). It is tentative to hypothesize that VDR/ β -catenin interactions have a role in the development of VC and therefore it may be affected by calcitriol or paricalcitol. The regulatory role of Wnt signaling in VCs emerges the possibility of their therapeutic intervention by targeting this pathway. Indeed, Wnt inhibitors have shown early promise; however, given the central role of the Wnt pathway in regulating growth and development in many tissues, considerable work will be needed to ensure the safety of these new therapies (60).

In summary, our results suggest differential effects of calcitriol and paricalcitol on VC that appears to be mediated by a distinct regulation of the BMP and Wnt/ β -catenin signaling pathways. Calcitriol increased the calcification, which ap-

peared to be associated with the upregulation of the expression of osteoblastic gene markers as BMP2, Runx2, Msx2, and OC and the activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. By contrast, paricalcitol decreased calcification, which was accompanied by a downregulation of the expression of these osteoblastic gene markers and the Wnt/ β -catenin signaling.

ACKNOWLEDGMENTS

The technical assistance in confocal microscopy of M. Esther Peralbo (Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba) is gratefully acknowledged.

GRANTS

This study was supported by Instituto de Salud Carlos III (FIS 10/1311, FIS 11/02055), Consejería de Salud (JA 0127/2008), a UE Grant from Framework Programme 7 Syskid (FP7-241544) and Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (CTS-5205) of Junta de Andalucía. Y. Almadén is a senior researcher supported by the Fundación Progreso y Salud, Consejería de Salud (Junta de Andalucía).

DISCLOSURES

M. Rodríguez has received research grants from Amgen and Fresenius and lecture fees from the following companies: Amgen, Abbott, Shire, and Fresenius.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: J.M.M.-M., A.C., M.R., and Y.A. conception and design of research; J.M.M.-M., J.R.M.-C., C.H., A.M.d.O., J.-C.E., R.C., M.E.R.-O., P.P.-M., A.C., and Y.A. performed experiments; J.M.M.-M., J.R.M.-C., P.P.-M., A.C., M.R., and Y.A. analyzed data; J.M.M.-M., J.R.M.-C., E.A.-T., A.C., M.R., and Y.A. interpreted results of experiments; J.M.M.-M., A.C., and Y.A. prepared figures; J.M.M.-M., A.C., M.R., and Y.A. drafted manuscript; J.M.M.-M., J.R.M.-C., J.-C.E., E.A.-T., A.C., M.R., and Y.A. edited and revised manuscript; J.M.M.-M., J.R.M.-C., C.H., A.M.d.O., J.-C.E., R.C., M.E.R.-O., P.P.-M., E.A.-T., A.C., M.R., and Y.A. approved final version of manuscript.

REFERENCES

1. **Bafico A, Liu G, Yaniv A, Gazit A, Aaronson SA.** Novel mechanism of Wnt signaling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol* 3: 683–686, 2001.
2. **Bas A, Lopez I, Perez J, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E.** Reversibility of calcitriol-induced medial artery calcification in rats with intact renal function. *J Bone Miner Res* 21: 484–490, 2006.
3. **Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK.** Association of serum phosphorus and calcium phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. *Am J Kidney Dis* 31: 607–617, 1998.
4. **Cardús A, Panizo S, Parisi E, Fernandez E, Valdivielso JM.** Differential effects of vitamin D analogs on vascular calcification. *J Bone Miner Res* 22: 860–866, 2007.
5. **Cheng SL, Shao JS, Halstead LR, Distelhorst K, Sierra O, Towler DA.** Activation of vascular smooth muscle parathyroid hormone receptor inhibits Wnt/ β -catenin signaling and aortic fibrosis in diabetic arteriosclerosis. *Circ Res* 107: 271–282, 2010.
6. **Ciceri P, Volpi E, Brenna I, Arnaboldi L, Neri L, Brancaccio D, Cozzolino M.** Combined effects of ascorbic acid and phosphate on rat VSMC osteoblastic differentiation. *Nephrol Dial Transplant* 27: 122–127, 2012.
7. **Demer LL, Tintut Y.** Vascular calcification: pathobiology of multifaceted disease. *Circulation* 117: 2938–2948, 2008.
8. **Faverman L, Mikhaylova L, Malmquist J, Nurminskaya M.** Extracellular transglutaminase 2 activates β -catenin signaling in calcifying vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 582: 1552–1557, 2008.
9. **Feigenson K, Reid M, See J, Crenshaw EB III, Grinspan JB.** Canonical Wnt signalling requires the BMP pathway to inhibit oligodendrocyte maturation. *ASN Neuro* 3: e00061, 2011.
10. **Fretz JA, Zella LA, Kim S, Shevde NK, Pike JW.** 1,25-Dihydroxyvitamin D $_3$ regulates the expression of low density lipoprotein receptor-related protein 5 via deoxyribonucleic acid sequence elements located

- downstream of the start site of transcription. *Mol Endocrinol* 20: 2215–2230, 2006.
11. Friedman MS, Oyserman SM, Hankenson KD. Wnt1 promotes osteoblast maturation and mineralization through R-spondin 2. *J Biol Chem* 284: 14117–14125, 2009.
 12. Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bha RA, Bodine PV, Komm BS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem* 280: 33132–33140, 2005.
 13. Goodman WG. The consequences of uncontrolled secondary hyperparathyroidism and its treatment in chronic kidney disease. *Semin Dial* 17: 209–216, 2004.
 14. Henley C, Colloton M, Cattley RC, Shatzken E, Towler DA, Lacey D, Martin D. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 but not cinacalcet HCl (Sensipar/Mimpara) treatment mediates aortic calcification in a rat model of secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant* 20: 1370–1377, 2005.
 15. Hirata M, Katsumata K, Endo K, Fukushima N, Ohkawa H, Fukagawa M. In subtotaly nephrectomized rats 22-oxacalcitriol suppresses parathyroid hormone with less risk of cardiovascular calcification or deterioration of residual renal function than 1,25(OH)₂ vitamin D3. *Nephrol Dial Transplant* 18: 1770–1776, 2003.
 16. Hopyan S, Gokgoz N, Bell RS, Andrulis IL, Alman BA, Wunder JS. Expression of osteocalcin and its transcriptional regulators core-binding factor alpha 1 and MSX2 in osteoid-forming tumours. *J Orthop Res* 17: 633–638, 1999.
 17. Hruska KA, Mathew S, Saab G. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circulation* 97: 105–114, 2005.
 18. Issa LL, Leong GM, Sutherland RL, Eisman JA. Vitamin D analogue-specific recruitment of vitamin D receptor coactivators. *J Bone Miner Res* 17: 879–890, 2002.
 19. Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, Morii H. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide. *Circulation* 98: 1302–1306, 1998.
 20. Kamiya N, Kobayashi T, Mochida Y, Yu PB, Yamauchi M, Kronenberg HM, Mishina Y. Wnt inhibitors Dkk1 and Sost are downstream targets of BMP signaling through the type IA receptor (BMPRIA) in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 25: 200–210, 2010.
 21. Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH, Glass DA, 2nd Hartmann C, Li L, Hwang TH, Brayton CF, Lang RA, Karsenty G, Chan L. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol* 157: 303–314, 2002.
 22. Koleganova N, Piecha G, Ritz E, Schmitt CP, Gross ML. A calcimimetic (R-568), but not calcitriol, prevents vascular remodeling in uremia. *Kidney Int* 75: 60–71, 2009.
 23. Komori T. Signaling networks in RUNX2-dependent bone development. *J Cell Biochem* 112: 750–755, 2011.
 24. Larriba MJ, Ordóñez-Morán P, Chicote I, Martín-Fernández G, Puig I, Muñoz A, Palmer HG. Vitamin D receptor deficiency enhances Wnt/ β -catenin signaling and tumor burden in colon cancer. *PLoS One* 6(8): e23524, 2011.
 25. Lau WL, Festing MH, Giachelli CM. Phosphate and vascular calcification: emerging role of the sodium-dependent phosphate cotransporter PiT-1. *Thromb Haemostasis* 104: 464–470, 2010.
 26. Ling L, Nurcombe V, Cool SM. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. *Gene* 433: 1–7, 2009.
 27. Lopez I, Aguilera-Tejero E, Mendoza FJ, Almaden Y, Perez J, Martin D, Rodriguez M. Calcimimetic R-568 decreases extraosseous calcifications in uremic rats treated with calcitriol. *J Am Soc Nephrol* 17: 795–804, 2006.
 28. Lopez I, Mendoza FJ, Aguilera-Tejero E, Perez J, Guerrero F, Martin D, Rodriguez M. The effect of calcitriol, paricalcitol, and a calcimimetic on extraosseous calcifications in uremic rats. *Kidney Int* 73: 300–307, 2008.
 29. Martin KJ, González EA, Gellens M, Hamm LL, Abboud H, Lindberg J. 19-nor-1,25-dihydroxyvitamin D2 safely and effectively reduces the levels of intact parathyroid hormone in patients on hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 9: 1427–1432, 1998.
 30. Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, Aburatani H, Nishimura R, Yoneda TB. BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 283: 29119–29125, 2008.
 31. Mikhaylova L, Malmquist J, Nurminskaya M. Regulation of in vitro vascular calcification by BMP4, VEGF and Wnt3a. *Calcif Tissue Int* 81: 372–381, 2007.
 32. Miranda AJ, Maruyama T, Fu J, Yu HM, Hsu W. β -catenin/cyclin D1 mediated development of suture mesenchyme in calvarial morphogenesis. *BMC Dev Biol* 10: 116, 2010.
 33. Mizobuchi M, Finch JL, Martin DR, Slatopolsky E. Differential effects of vitamin D receptor activators on vascular calcification in uremic rats. *Kidney Int* 72: 709–715, 2007.
 34. Mizobuchi M, Towler D, Slatopolsky E. Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 20: 1453–1464, 2009.
 35. Moe SM, Chen NX. Mechanisms of vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 19: 213–216, 2008.
 36. Montes de Oca A, Madueño JA, Martínez-Moreno JM, Guerrero F, Muñoz-Castañeda J, Rodríguez-Ortiz ME, Mendoza FJ, Almaden Y, Lopez I, Rodríguez M, Aguilera-Tejero E. High-phosphate-induced calcification is related to SM22 α promoter methylation in vascular smooth muscle cells. *J Bone Miner Res* 25: 1996–2005, 2010.
 37. Palmer HG, Anjos-Afonso F, Carmeliet G, Takeda H, Watt FM. The vitamin D receptor is a Wnt effector that controls hair follicle differentiation and specifies tumor type in adult epidermis. *PLoS One* 23: e1483, 2008.
 38. Pendás-Franco N, Aguilera O, Pereira F, González-Sancho JM, Muñoz A. Vitamin D and Wnt/ β -catenin pathway in colon cancer: role and regulation of DICKKOPF genes. *Anticancer Res* 28: 2613–2623, 2008.
 39. Pike JW, Meyer MB. The vitamin D receptor: new paradigms for the regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Rheum Dis Clin North Am* 38: 13–27, 2012.
 40. Prosdocimo DA, Wyler SC, Romani AM, O'Neill WC, DUBYAK GR. Regulation of vascular smooth muscle cell calcification by extracellular pyrophosphate homeostasis: synergistic modulation by cyclic AMP and hyperphosphatemia. *Am J Physiol Cell Physiol* 298: C702–C713, 2010.
 41. Quasnicka H, Slater SC, Beeching CA, Boehm M, Sala-Newby GB, George SJ. Regulation of smooth muscle cell proliferation by β -catenin/T-cell factor signaling involves modulation of cyclin D1 and p21 expression. *Circ Res* 99: 1329–1337, 2006.
 42. Rahmani M, Read JT, Carthy JM, McDonald PC, Wong BW, Esfandiari M, Si X, Luo Z, Luo H, Rennie PS, McManus BM. Regulation of the versican promoter by the β -catenin-T-cell factor complex in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 280: 13019–13028, 2005.
 43. Rawadi G, Vayssière B, Dunn F, Baron R, Roman-Roman S. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res* 18: 1842–1853, 2003.
 44. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, Mc-Nair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, Jahnen-Dechent W, Weissberg PL, Shanahan CM. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 15: 2857–2867, 2004.
 45. Rodriguez M, Martínez-Moreno JM, Rodríguez-Ortiz ME, Muñoz-Castañeda JR, Almaden Y. Vitamin D and vascular calcification in chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res* 34: 261–268, 2011.
 46. Rodríguez-Carballo E, Ulsamer A, Susperregui AR, Manzaneres-Céspedes C, Sánchez-García E, Bartrons R, Rosa JL, Ventura F. Conserved regulatory motifs in osteogenic gene promoters integrate cooperative effects of canonical Wnt and BMP pathways. *J Bone Miner Res* 26: 718–729, 2011.
 47. Sage AP, Lu J, Tintut Y, Demer LL. Hyperphosphatemia-induced nanocrystals upregulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteopontin genes in mouse smooth muscle cells in vitro. *Kidney Int* 79: 414–422, 2011.
 48. Santos A, Bakker AD, de Bleeck-Hogervorst JM, Klein-Nulend J. WNT5A induces osteogenic differentiation of human adipose stem cells via rho-associated kinase ROCK. *Cytotherapy* 12: 924–932, 2010.
 49. Shalhoub V, Shatzken E, Henley C, Boedigheimer M, McNinch J, Manoukian R, Damore M, Fitzpatrick D, Haas K, Twomey B, Kiaei P, Ward S, Lacey DL, Martin D. Calcification inhibitors and Wnt signaling proteins are implicated in bovine artery smooth muscle cell calcification in the presence of phosphate and vitamin D sterols. *Calcif Tissue Int* 79: 431–442, 2006.
 50. Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circ Res* 109: 697–711, 2011.

51. Shao JS, Pingsterhaus JM, Cheng SL, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *J Clin Invest* 115: 1210–1220, 2005.
52. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A. The cyclin D1 gene is a target of the β -catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5522–5527, 1999.
53. Slatopolsky E, Finch J, Ritter C, Takahashi F. Effect of 19-nor-1,25(OH)₂D₂, a new analogue of calcitriol on secondary hyperparathyroidism in uremic rats. *Am J Kidney Dis* 32: S40–S47, 1998.
54. Soshnikova N, Zechner D, Huelsken J, Mishina Y, Behringer RR, Taketo MM. Crenshaw Genetic interaction between Wnt/ β -catenin, and BMP receptor signaling during formation of the AER and the dorsal-ventral axis in the limb. *Genes Dev* 17: 1963–1968, 2003.
55. Tang DZ, Hou W, Zhou Q, Zhang M, Holz J, Sheu TJ, Li TF, Cheng SD, Shi Q, Harris SE, Chen D, Wang YJ. Osthole Stimulates Osteoblast Differentiation and Bone Formation by Activation of β -Catenin-BMP Signaling. *J Bone Miner Res* 25: 1234–1245, 2010.
56. Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM. Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 489–494, 2003.
57. Van Gijn ME, Daemen MJ, Smits JF, Blankesteyn WM. The wnt-frizzled cascade in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 55: 16–24, 2006.
58. Villa-Bellosta R, Millan A, Sorribas V. Role of calcium-phosphate deposition in vascular smooth muscle cell calcification. *Am J Physiol Cell Physiol* 300: C210–C220, 2011.
59. Wang X, Xiao Y, Mou Y, Zhao Y, Blankesteyn WM, Hall JL. A role for the β -catenin/T-cell factor signaling cascade in vascular remodeling. *Circ Res* 90: 340–347, 2002.
60. Williams BO, Insogna KL. Where Wnts went: the exploding field of Lrp5 and Lrp6 signaling in bone. *J Bone Miner Res* 24: 171–178, 2009.
61. Wilson PWF, Kauppila LI, O'Donnell CJ, Kiel DP, Hannan M, Polak JM, Cupples LA. Abdominal aortic calcific deposits are an important predictor of vascular morbidity and mortality. *Circulation* 103: 1529–1534, 2001.
62. Yan D, Wiesmann M, Rohan M, Chan V, Jefferson AB, Guo L, Sakamoto D, Caothien RH, Fuller JH, Reinhard C, Garcia PD, Randazzo FM, Escobedo J, Fantl WJ, Williams LT. Elevated expression of axin2 and hnk4 mRNA provides evidence that Wnt/ β -catenin signaling is activated in human colon tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 14973–14978, 2001.
63. Zebger-Gong H, Müller D, Diercke M, Haffner D, Hoher B, Verberckmoes S, Schmidt S, D'Haese PC, Querfeld U. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-induced aortic calcifications in experimental uremia: upregulation of osteoblast markers, calcium-transporting proteins and osterix. *J Hypertens* 29: 339–348, 2011.



