



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

Unidad de Investigación Hospital Reina Sofía  
Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba



Departamento de Medicina y Cirugía Animal

**TESIS DOCTORAL**

**MODELOS ANIMALES DE CALCIFICACIÓN VASCULAR:  
VITAMINA E Y MAGNESIO COMO ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS**

ALAN ENRIQUE PERALTA RAMÍREZ  
CÓRDOBA, 2014

TITULO: *Modelos animales de calcificación vascular: vitamina E y magnesio como estrategias terapéuticas*

AUTOR: *Alan Enrique Peralta Ramírez*

---

© Edita: UCOPress. 2016  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---



## UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Unidad de Investigación Hospital Reina Sofía  
Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba



Departamento de Medicina y Cirugía Animal

### MODELOS ANIMALES DE CALCIFICACIÓN VASCULAR: VITAMINA E Y MAGNESIO COMO ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL presentada por ALAN ENRIQUE PERALTA  
RAMÍREZ, Licenciado en Veterinaria, para optar al grado  
de DOCTOR

**Los directores,**

**Dr. IGNACIO LÓPEZ VILLALBA**  
Profesor Titular  
Dpto. de Medicina y Cirugía Animal  
Facultad de Veterinaria  
Universidad de Córdoba

**Dr. ESCOLÁSTICO AGUILERA TEJERO**  
Catedrático  
Dpto. de Medicina y Cirugía Animal  
Facultad de Veterinaria  
Universidad de Córdoba



**D. IGNACIO LÓPEZ VILLALBA**, DOCTOR EN VETERINARIA POR LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA,

INFORMA:

Que D. ALAN ENRIQUE PERALTA RAMÍREZ, Licenciado en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección en el Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Córdoba, el trabajo titulado: **“Modelos animales de calcificación vascular: vitamina E y magnesio como estrategias terapéuticas”**, y que a mi criterio dicho trabajo reúne los méritos suficientes para optar al Grado de Doctor en Veterinaria.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente informe en Córdoba, a once de diciembre de dos mil catorce.

A handwritten signature in blue ink, reading "Ignacio López Villalba". The signature is stylized and cursive, with a long horizontal stroke at the end.



**D. ESCOLÁSTICO AGUILERA TEJERO**, DOCTOR EN VETERINARIA POR LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA,

INFORMA:

Que D. ALAN ENRIQUE PERALTA RAMÍREZ, Licenciado en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección en el Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Córdoba, el trabajo titulado: **“Modelos animales de calcificación vascular: vitamina E y magnesio como estrategias terapéuticas”**, y que a mi criterio dicho trabajo reúne los méritos suficientes para optar al Grado de Doctor en Veterinaria.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente informe en Córdoba, a once de diciembre de dos mil catorce

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Alan Peralta', enclosed in a thin black rectangular border.







**TÍTULO DE LA TESIS:** MODELOS ANIMALES DE CALCIFICACIÓN  
VASCULAR: VITAMINA E Y MAGNESIO COMO ESTRATEGIAS  
TERAPÉUTICAS

**DOCTORANDO:** ALAN ENRIQUE PERALTA RAMÍREZ

**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 doctorando Alan Enrique Peralta Ramírez está colaborando activamente con nuestro grupo de investigación desde el año 2010. Dicha colaboración se inició con su incorporación al Máster en Medicina, Sanidad y Mejora Animal de la Universidad de Córdoba durante el curso 2007-2008. Durante este periodo inició una labor investigadora que junto con la Licenciatura en Veterinaria encontró su continuación académica en los estudios de Doctorado. Su proyecto de Tesis Doctoral está encuadrado en el Programa de Doctorado de la Universidad de Córdoba correspondiente al área de Biociencias y Ciencias Agroalimentarias (P.D. con mención de calidad), estando a su vez adscrito a la línea de investigación Fisiopatología del Metabolismo Mineral.

La presente Tesis Doctoral, llevada a cabo bajo nuestra supervisión y dirección, se ha desarrollado durante el periodo comprendido entre 2010 y 2014. Durante dicho periodo el doctorando ha mostrado una gran dedicación e interés en las tareas de investigación asignadas. De igual modo, ha sido capaz de realizar una labor de investigación con gran validez científica, fruto de la cual dicha Tesis Doctoral ha originado publicaciones en revistas de alto interés científico dentro del ámbito de la biociencias.

El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral ha generado la siguiente producción científica:

a) Publicaciones en revistas científicas:

**PERALTA-RAMÍREZ A**, Montes de Oca A, Raya A, Pineda C, López I, Guerrero F, Díez E, Muñoz-Castañeda J, Martínez J, Almadén Y, Rodríguez M, Aguilera-Tejero E. Vitamin E protection of obesity enhanced vascular calcification in uremic rats. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2014 Feb 15; 306 (4):F422-9.

**PERALTA-RAMÍREZ A**, Raya AI, Pineda C, Rodríguez M, Aguilera-Tejero E, López I. Acid-base balance in uremic rats with vascular calcification. *Nephron Extra*. 2014. Jul 2; 4 (2):89-94.

b) Comunicaciones científicas en Congresos Internacionales:

**PERALTA-RAMÍREZ A**, Pineda C, Guerrero F, Rodríguez Ortiz ME, Díez de Castro E, Montes de Oca A, Almadén Y, Rodríguez M, Aguilera-Tejero E, López I. Vitamin E Decreases Vascular Calcification in Obese (Zucker *fa/fa*) Uremic Rats. *Kidney Week 2011. American Society of Nephrology Congress*. November 8-13, 2011. Philadelphia, PA, USA. SA-PO2249. *J Am Soc Nephrol* 22: 2011.

**PERALTA RAMÍREZ A**, Muñoz-Castañeda J, Rodríguez ME, Herencia C, Pineda C, Martínez J, Montes de Oca A, Guerrero F, Pérez Delgado S, Acevedo L, Peter ME, Steppan S, Passlick-Deetjen J, López I, Aguilera-Tejero E, Almadén Y, Rodríguez M. Magnesium reduces vascular calcification in uremic rats. *Kidney Week 2012. American Society of Nephrology, Congress*. San Diego, CA. EEUU. *J Am Soc Nephrol* 23, 2012.

b) Comunicaciones científicas en Congresos Nacionales:

**PERALTA RAMÍREZ A**, Muñoz-Castañeda J, Rodríguez ME, Herencia C, Pineda C, Martínez J, Montes de Oca A, Guerrero F, Pérez Delgado S, Acevedo L, Peter ME, Steppan S, Passlick Deetjen J, López I, Aguilera-Tejero E, Almadén Y, Rodríguez M. El Magnesio disminuye la calcificación vascular en ratas urémicas. IXLII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología y VII Congreso Iberoamericano de Nefrología. 6 al 9 de octubre del 2012. Maspalomas, Gran Canaria. España. Ref. Póster 172. Nefrología, Vol. 32. Supl. 3. 2012, pág. 45.

Además de trabajar en el desarrollo y progreso de su trabajo de Tesis Doctoral, el doctorando ha participado activamente en los diversos proyectos de investigación que llevamos a cabo en nuestra unidad, figurando entre los autores de numerosas comunicaciones y artículos científicos.

Por todo lo anteriormente expuesto, se autoriza la presentación de la Tesis Doctoral.

Córdoba, 11 de diciembre de 2014

Firma del/de los director/es



Fdo.: Dr. IGNACIO LÓPEZ VILLALBA

Fdo.: Dr. ESCOLÁSTICO AGUILERA TEJERO



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Córdoba en colaboración con la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Reina Sofía/Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), bajo la dirección de los Dres. Ignacio López Villalba y Escolástico Aguilera Tejero. Dicho trabajo ha sido financiado por subvención del Gobierno de España (PI11/00098) a través del Instituto de Salud Carlos III, por la Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo de la Junta de Andalucía (CVI-7925), por Fundación Carolina, Fondos Europeos (Syskid) y Fresenius Medical Care.



## **Agradecimientos**

A lo largo de estos años de elaboración de la presente Tesis Doctoral muchas personas han contribuido a que esta labor pudiese llegar a buen término. Quisiera agradecer en estas líneas a todos aquellos que de alguna u otra manera formaron parte de este camino recorrido.

Al Dr. Ignacio López Villalba, por brindarme la oportunidad de poder trabajar bajo su dirección. Por los consejos, por compartir experiencias, su ejemplo de empeño y dedicación al trabajo que han sido claves para lograr concluir esta Tesis Doctoral. También agradecerle por los ratos buenos y muy buenos, y sobre todo por su amistad.

Al Dr. Escolástico Aguilera Tejero, por su ejemplo de responsabilidad, por incentivarme a buscar soluciones a los problemas, por su dedicación, paciencia y extraordinaria labor como director de la presente Tesis Doctoral.

Al Dr. Mariano Rodríguez Portillo por darme la oportunidad de trabajar en la Unidad de Investigación del Hospital Reina Sofía, por sus consejos y orientaciones para lograr concluir esta labor.

*Al paratiroides team:* Yolanda Almadén, Juan Muñoz, Marién Rodríguez, Addy Montes de Oca, Juan Díaz, Carmen Herencia, Carmen Pineda, Ana Raya, Luz Marina Acevedo, de manera especial a Julio Martínez y Cristina Cruz. Las horas de trabajo con ustedes han sido simplemente inolvidables. Gracias por sus consejos y amistad, por los ratos de parafinos, carromanes y por hacerme sentir que Córdoba es mi segundo hogar.

A mis compañeros del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Córdoba y del Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC).

A mis compañeros, amigos, y maestros de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, UNAN-León.





*A Sayda y Alan René,*

*a mi familia*



“Sire de ojos azules, gracias: por los laureles  
de cien bravos vestidos de honor; por los claveles  
de la tierra andaluza y la Alhambra del moro;  
por la sangre solar de una raza de oro;  
por la armadura antigua y el yelmo de la gesta;  
por las lanzas que fueron una vasta floresta...

...por el país sagrado en que Herakles afianza  
sus macizas columnas de fuerza y esperanza,...

Mientras el mundo aliente, mientras la esfera gire,  
mientras la onda cordial aliente un ensueño,  
mientras haya una viva pasión, un noble empeño,  
un buscado imposible, una imposible hazaña,...

....Gracias sire”

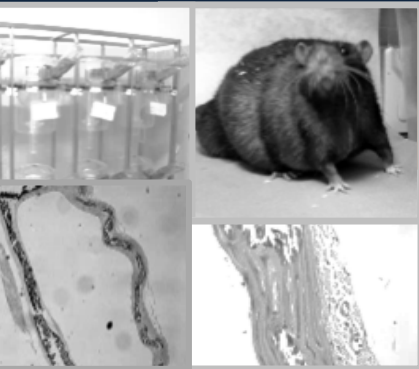
Rubén Darío

Fragmento de: “*Al rey Óscar*”  
Cantos de Vida y Esperanza. 1905



# MODELOS ANIMALES DE CALCIFICACIÓN VASCULAR:

## VITAMINA E Y MAGNESIO COMO ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS



Tesis Doctoral

Alan Enrique Peralta Ramírez

Córdoba, 2014

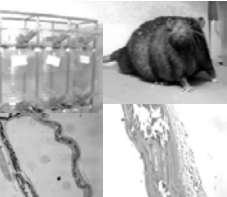


# ÍNDICE

<b>1.INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	5
<b>2.1. Metabolismo Mineral</b>	7
2.1.1. Homeostasis del Calcio, Fósforo y Magnesio	7
2.1.2. Perturbaciones del Metabolismo Mineral en la Enfermedad Renal Crónica	26
<b>2.2. Estrés Oxidativo, Enfermedad Renal Crónica y Síndrome Metabólico</b>	32
2.2.1. Estrés Oxidativo	32
2.2.1.1. <i>Procesos oxidantes y antioxidantes</i>	32
2.2.1.2. <i>Vitamina E</i>	38
2.2.2. Estrés Oxidativo en la Enfermedad Renal Crónica	50
2.2.3. Síndrome Metabólico	54
2.2.3.1. <i>Características y fisiopatología</i>	54
2.2.3.2. <i>Síndrome Metabólico y Enfermedad Renal</i>	64
<b>2.3. Calcificación Vascular</b>	70
2.3.1. Clasificación de Calcificación Vascular	70
2.3.2. Fisiopatología de la Calcificación Vascular en la Enfermedad Renal Crónica	75
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	99
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	105
<b>5. RESULTADOS</b>	123
<b>6. DISCUSIÓN</b>	155
<b>7. CONCLUSIONES</b>	175
<b>8. RESUMEN</b>	179
<b>9. SUMMARY</b>	185
<b>10. REFERENCIAS</b>	187







# 1. INTRODUCCIÓN



Las calcificaciones vasculares (CV) son procesos patológicos de alta prevalencia en la enfermedad renal crónica (ERC). La mineralización de los tejidos vasculares tiene naturaleza progresiva y está asociada con un aumento de la mortalidad en los pacientes con ERC.<sup>40,186</sup> Los mecanismos implicados en el desarrollo de CV son de dos tipos: pasivos, precipitación de fosfato cálcico; y activos, transdiferenciación de células de músculo liso vascular (CMLV) a células con fenotipo osteogénico. Estos cambios incluyen apoptosis y expresión de proteínas asociadas a hueso y reguladoras de la mineralización.<sup>98,370</sup> En la ERC, desequilibrios en el metabolismo del calcio y del fósforo, sobre todo la hiperfosfatemia, constituyen la principal causa de CV.<sup>332, 333,334,484</sup>

Actualmente la obesidad es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, cobrando especial relevancia en los países desarrollados, donde llega a alcanzar proporciones epidémicas. Los trastornos metabólicos que acompañan a la obesidad se agrupan dentro del síndrome metabólico (SM). Este síndrome se caracteriza por obesidad, dislipemia, hipertensión, resistencia a la insulina, estrés oxidativo e inflamación sistémica. Muchas de estas alteraciones del SM también están presentes en la ERC y, por lo tanto, podrían darse efectos sinérgicos en el deterioro de función renal y en la progresión de CV.<sup>487</sup> Sin embargo, hasta ahora no existen estudios experimentales en modelos animales que evalúen el efecto de ambas patologías sobre el desarrollo de calcificaciones extraesqueléticas.

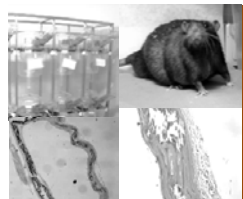
Las terapias orientadas a corregir los trastornos minerales y prevenir o reducir el desarrollo de CV en enfermos con ERC incluyen el uso de quelantes de fósforo, análogos de la vitamina D, calcimiméticos y paratiroidectomía. Los resultados de estudios *in vitro*, estudios en modelos animales y ensayos clínicos sugieren que el

estrés oxidativo podría participar en los mecanismos implicados en el desarrollo de CV.<sup>175,300,366, 385, 578</sup> Es necesario ampliar la información sobre este tema y, más aún, evaluar la eficacia de agentes antioxidantes, como por ejemplo la vitamina E, en la prevención y el tratamiento de CV.<sup>525,575,578</sup>

Aunque se han realizado diversos estudios en animales de experimentación y en pacientes humanos para valorar el efecto de las modificaciones del pH del medio interno sobre el desarrollo y progresión de calcificaciones vasculares,<sup>8,116,215,280,355</sup> los cambios que la CV produce sobre el estado ácido-base no se conocen con exactitud. Obviamente, aclarar este punto es esencial para abordar cualquier modificación del estado ácido-base con fines terapéuticos en procesos de CV.

Como se ha citado anteriormente, la hiperfosfatemia es uno de los principales factores asociados a CV en la ERC. Por ello, el tratamiento con quelantes de fósforo constituye una de las medidas más importantes para frenar el desarrollo de CV. En los últimos años se ha extendido el uso de quelantes de fósforo que contienen magnesio (Mg), los cuales han demostrado gran efectividad para controlar los niveles plasmáticos de fósforo en modelos animales y en pacientes con ERC.<sup>115</sup> Sin embargo, las implicaciones del Mg tanto en el control del hiperparatiroidismo secundario como en el desarrollo de CV no se conocen con exactitud.

Este trabajo de Tesis Doctoral se ha diseñado para profundizar en el conocimiento de la CV asociada a la ERC, evaluando distintos factores etiopatogénicos (obesidad, estrés oxidativo, alteraciones ácido-base) y terapéuticos (vitamina E y magnesio).



## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



## 2.1. METABOLISMO MINERAL

### 2.1.1. HOMEOSTASIS DEL CALCIO, FÓSFORO Y MAGNESIO

Calcio, fósforo y magnesio son minerales necesarios para funciones vitales de las células y el organismo en los mamíferos. La regulación de su metabolismo se lleva a cabo por una interacción compleja entre factores hormonales y órganos diana que mantienen las concentraciones séricas de estos minerales dentro de unos límites muy estrechos.

De manera general, el sistema está conformado por:

- Los iones calcio, magnesio y fosfato.
- Un componente sensor: Su función es detectar las pequeñas variaciones que se producen en las concentraciones iónicas de calcio y desencadenar respuestas adecuadas. Dentro del componente sensor se encuentran las células paratiroides, las células de los túbulos renales proximales y las células C del tiroides.<sup>25, 52, 56, 58</sup>
- Tejidos de absorción, reabsorción y almacenamiento, principalmente: riñón, intestino y esqueleto.
- Hormonas que modulan el transporte y la movilización de los minerales. Estas hormonas son: la parathormona, secretada por las glándulas paratiroides; la 1,25 -dihidroxitamina D<sub>3</sub> o calcitriol, sintetizada por el riñón; la fosfatona factor de crecimiento de fibroblastos-23 (FGF23) producido en el hueso por osteocitos y osteoblastos; y, finalmente, la calcitonina, hormona secretada por las células C del tiroides.

## ➤ Componentes Del Sistema Homeostático

- **Calcio**

El calcio (Ca) es uno de los elementos más abundantes en la naturaleza. En los vertebrados es importante para funciones diversas entre las que se incluyen: participación en la contracción muscular, secreción de hormonas, activación enzimática, división celular, estabilidad de membrana celular, excitabilidad neuromuscular y coagulación sanguínea.<sup>440</sup> El calcio también es responsable de regular procesos que conllevan daño y muerte celular como la producción de radicales libres, liberación de citoquinas, activación de proteasas, vasoconstricción y apoptosis.

El 99% del calcio de todo el cuerpo se encuentra en el esqueleto en forma de cristales amorfos de fosfato de calcio e hidróxidos de calcio y fosfato (hidroxiapatita). Estas reservas de calcio pueden intercambiarse entre el hueso y el líquido extracelular gracias a la acción de osteoblastos y osteoclastos. El proceso de intercambio, denominado remodelado óseo, ocurre por coordinación de funciones entre ambos grupos celulares, de tal manera que continuamente se moviliza calcio hacia y desde el hueso mediante mecanismos de formación y resorción ósea.<sup>173</sup>

El calcio restante se encuentra en membranas celulares, mitocondrias, retículo endoplasmático (0,9 %) y en el fluido extracelular (0,1%). En el plasma sanguíneo, dentro del calcio total se diferencian 3 fracciones: a) libre o ionizada ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (50% a 55%) que es el calcio biológicamente activo, b) unido a proteínas (40% a 45 %) y c) formando complejos con aniones como el citrato, bicarbonato,



fosfato y lactato (5% a 10%). La afinidad del Ca por sitios aniónicos para formar complejos es dependiente del pH.<sup>440, 484</sup>

La única manera por la que los iones de Ca pueden ingresar al cuerpo es por ingestión y absorción a partir de la dieta. El Ca se absorbe en el intestino delgado por mecanismos de difusión pasiva y por transporte activo. El transporte activo sucede en el duodeno y está coordinado por la acción de canales de potencial transitorio vaniloide tipo 6 (TRPV6), calbindina- D y por la bomba de Ca-ATPasa, PMCA1b.

A nivel renal, el 98% del Ca filtrado es reabsorbido por procesos paracelulares y por transporte activo a través de canales TRPV5, calbindina-D e intercambiadores de Na-Ca, NCX1 y PMCA1b.<sup>443</sup>

- ***Fósforo***

El fósforo, principalmente en la forma de fósforo inorgánico (P), es un componente importante de la homeostasis celular y sistémica. Es necesario para la generación de ATP, para la señalización intracelular y para la regulación del pH, además de formar parte del tejido óseo, fosfolípidos y ácidos nucleicos. El 85% se encuentra en hueso, mientras que el 14% se encuentra intracelular y sólo el 1% se localiza en el fluido extracelular.<sup>304</sup>

La mayoría del P ingerido es absorbido en el tracto gastrointestinal por vías paracelulares o por cotransportadores de P dependientes de sodio, NaPi-IIb.<sup>102</sup>

En condiciones normales, el 80-90% del P filtrado por el riñón se reabsorbe en el túbulo proximal principalmente por vía activa del NaPi-IIa. Además, el hueso

sirve también como una reserva de P que puede contribuir a la regulación sérica a través de la formación o resorción ósea.<sup>230</sup>

- **Magnesio**

El magnesio (Mg) participa como cofactor en diversas reacciones que incluyen la síntesis de proteínas, la estabilidad de ácidos nucleicos, la excitabilidad neuromuscular y la fosforilación oxidativa; es necesario para la secreción de hormona paratiroidea, actúa como vasodilatador e influye en la presión sanguínea, en parte, por regular la resistencia y reactividad periférica vascular.<sup>534</sup>

Los niveles plasmáticos de Mg se regulan por el intestino, el cual determina el ingreso del Mg, por el hueso, que lo almacena, y por el riñón, que regula su excreción. Al igual que el Ca y el P, el Mg se almacena en el hueso. Aproximadamente el 50% del Mg corporal se almacena en este tejido.<sup>136</sup> Este Mg almacenado en el hueso se moviliza de una manera similar al Ca y la depleción crónica de Mg puede afectar la resorción y formación ósea. La reducción de Mg en la dieta disminuye el contenido óseo de Mg en ratas.<sup>10</sup> En el líquido extracelular, el contenido de Mg apenas representa el 1%. En el plasma, el Mg se encuentra en forma ionizada,  $Mg^{2+}$ , (55%), formando complejos (13%) o unido a proteínas (32%).

El Mg puede ser absorbido a nivel intestinal mediante transporte pasivo y activo. La mayor parte se absorbe en el intestino delgado y en menor medida en el colon.<sup>158</sup> En condiciones de ingesta de dieta altas en Mg predomina la ruta paracelular, mientras que la ruta transcelular predomina cuando las concentraciones de Mg en el intestino son bajas.<sup>360</sup> La absorción activa de Mg ocurre principalmente en el colon, pero puede darse en el intestino delgado.<sup>266</sup> El

flujo transcelular de Mg está mediado por TRPM6, el canal de Mg localizado en la membrana apical del enterocito. El mecanismo que regula la concentración intracelular de Mg en el enterocito y la secreción de este ion en la membrana basolateral es desconocido.<sup>129</sup>

A nivel renal, la reabsorción de Mg depende, principalmente, de mecanismos de transporte pasivo paracelulares en el túbulo proximal y en el segmento grueso del asa de Henle. Además, una pequeña porción se reabsorbe por mecanismos activos en el túbulo contorneado distal.<sup>548</sup>

- ***Receptor Sensor de calcio***

El receptor sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  (RSCa) es el único mecanismo sensor que se conoce involucrado en la respuesta a fluctuaciones sistémicas y locales de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Diversas investigaciones han puesto de manifiesto que el RSCa desempeña un rol central en la homeostasis de iones divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ), en el metabolismo del fósforo y en la reabsorción tubular de agua. La estrecha relación entre la homeostasis del  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  ha sido reportada en humanos y en diversos modelos animales. Además, enfermedades genéticas del RSCa sugieren que el  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  son agonistas fisiológicos de RSCa in vivo.

El RSCa pertenece a la familia C de la superfamilia de los receptores acoplados a proteína G en los que se incluyen los receptores para los neurotransmisores glutamato y ácido  $\gamma$ -aminobutírico. El RSCa está formado por un dominio extracelular de 612 aminoácidos, un dominio transmembrana de 250 aminoácidos de 7 hélices y una cola C-carboxiterminal. En la membrana plasmática, el RSCa se ubica como un dímero de puentes de disulfato. La presencia de dos o más sitios

de unión para el  $\text{Ca}^{2+}$  en cada monómero resulta en un cooperación positiva que permite al receptor responder a un rango limitado de concentraciones del ligando. Los iones  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ , y compuestos orgánicos con elevada carga positiva, como: poliaminas, antibióticos aminoglucósidos, protamina y poliarginina también tienen capacidad para activar al receptor aún en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos agonistas policatiónicos son denominados agonistas Tipo 1. Por el contrario, los agonistas Tipo 2, también llamados calcimiméticos, requieren de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  para activar al RSCa e incluyen a los ácidos L-amino y otros compuestos que actúan como activadores alostéricos del receptor.<sup>157</sup>

Tras la unión del agonista, los cambios conformacionales en los dominios transmembrana e intracelular desencadenan una serie de rutas de señalización. Una característica particular de la activación de RSCa es la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por vía de la activación de la fosfolipasa C. Esto conduce a la modulación de la actividad por muchos canales y receptores, secreción de hormonas (ej., PTH, calcitonina, hormona del crecimiento, hormona adrenocorticotropa, gastrina e insulina), y a la regulación de actividades intracelulares tales como: proliferación, diferenciación, apoptosis, y expresión de genes.<sup>356,406</sup>

Se ha planteado la existencia de otras variantes funcionales de RSCa o mecanismos alternativos sensores de  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>214</sup>

- ***Hormona paratiroidea***

La parathormona u hormona paratiroidea (PTH) es una proteína monocatenaria compuesta por 84 aminoácidos, cuyo peso molecular es de 9.600 Daltons, que se sintetiza en las glándulas paratiroides. Posee dos fragmentos: un fragmento 1-34 o

N-terminal y otro 53-84 o C-terminal. Ambos fragmentos poseen estructura helicoidal y se encuentran unidos por la región intermedia, comprendida entre los residuos 35-52. Este segmento está enrollado al azar y es susceptible a la escisión proteolítica en tejidos periféricos cuando la molécula se administra a animales.<sup>423</sup>

Para que el efecto biológico de la PTH tenga lugar, la hormona interacciona con el receptor PTH/PTHrP tipo 1 (PTH-R1) que se encuentra en la superficie celular acoplado a una proteína G. Este receptor reconoce el dominio N-terminal de la proteína. Además del receptor PTH-R1, estudios realizados en ratas sugieren la existencia de un receptor específico que reconoce fragmentos C-terminales (PTH-R2) que se expresa en células de hueso y cartílago.<sup>403</sup> Al parecer el fragmento C-terminal ejerce efectos biológicos opuestos al N-terminal.<sup>108</sup>

Los elementos reguladores fundamentales de la función paratiroidea son el  $\text{Ca}^{2+}$ , el calcitriol y el P. Aunque también existen otros factores implicados en esta regulación, como el  $\text{Mg}^{2+}$ , el pH, las catecolaminas y la histamina.<sup>331,335,433</sup> De todos ellos el principal estímulo para la secreción de PTH es un descenso en los niveles extracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ .

La PTH secretada actúa a varios niveles: al ser detectada por los receptores de PTH localizados en el tejido óseo desencadena un incremento en la salida de Ca y P desde el hueso al medio extracelular. A nivel renal, la acción de la PTH supone un incremento en la reabsorción de Ca y en la eliminación de P.<sup>122</sup> Además, la PTH estimula a la enzima  $1\alpha$ -hidroxilasa, responsable de la conversión del 25-hidroxicolecalciferol en 1,25-dihidroxicolecalciferol o calcitriol. Todas estas acciones van encauzadas a incrementar la calcemia y mantener la fosfatemia.<sup>60</sup>

El calcitriol promueve la absorción de Ca dietético en el intestino delgado y la liberación de Ca mineralizado en los huesos. Como mecanismo de retroalimentación, el calcitriol suprime la transcripción de PTH<sup>465</sup> y puede tener un efecto indirecto sobre la liberación de PTH a través del incremento en la expresión del RSCa.<sup>72</sup>

Además del Ca<sup>2+</sup> y el calcitriol, el P tiene efectos sobre la función paratiroidea a través de mecanismos directos e indirectos. El incremento en los niveles plasmáticos de P conlleva a una reducción de la síntesis de calcitriol por inhibición de la enzima 1 $\alpha$ -hidroxilasa renal. La hiperfosfatemia también induce un descenso en la calcemia, por precipitación del Ca, y reduce la respuesta ósea a la PTH.<sup>49,51,397</sup> Estudios realizados *in vitro* e *in vivo* han permitido demostrar que el P elevado ejerce una acción directa a nivel paratiroideo estimulando la secreción de PTH.<sup>12,141,404,500</sup>

- **Vitamina D**

A nivel cutáneo, y tras la exposición a radiación ultravioleta, el 7-dehidrocolesterol es transformado a colecalciferol o vitamina D<sub>3</sub>. El colecalciferol también puede ser absorbido a partir de la dieta a nivel intestinal. Después de la ingestión o síntesis, la vitamina D es hidroxilada en el hígado a la forma 25 hidroxivitamina D (25 (OH) D<sub>3</sub>) siendo esta la forma circulante que predomina pero con poca actividad biológica. Posteriormente, la 25 hidroxivitamina D es nuevamente hidroxilada en el riñón por la enzima 1 $\alpha$  hidroxilasa, para formar 1,25 dihidroxivitamina D o calcitriol. El calcitriol es el metabolito de vitamina D que posee mayor actividad biológica y ejerce su acción a través del receptor nuclear de vitamina D (VDR).<sup>228</sup>

El calcitriol incrementa el Ca sérico al favorecer la absorción intestinal y disminuir la excreción renal de Ca, además incrementa la resorción ósea al promover la función de los osteoclastos.

Debido a que diversos tejidos expresan el receptor de vitamina D y  $1\alpha$  hidroxilasa, se ha sugerido la producción local y efectos paracrinos de la vitamina D.<sup>318</sup> Entre los tejidos en los cuales existe producción local de calcitriol, destaca las glándulas paratiroides, en las cuales calcitriol suprime la secreción de PTH e inhibe la proliferación celular.

- ***Factor de crecimiento fibroblástico 23***

El factor de crecimiento fibroblástico FGF23 es una proteína de 32-kDa (251 aminoácidos) producida por osteocitos y osteoblastos que se secreta en respuesta a la vitamina D y a incrementos en el P extracelular.<sup>346,528</sup> FGF23 actúa sobre el receptor, Klotho/FGFR1 en el riñón produciendo fosfaturia. Además, FGF23 disminuye la síntesis e incrementa la degradación de calcitriol.<sup>428,492</sup> El P circulante, la PTH y el calcitriol regulan positivamente la liberación de FGF23 desde el hueso,<sup>285,336,417</sup> mientras que niveles bajos  $\text{Ca}^{2+}$  en plasma reducen las concentraciones circulantes de FGF23. Por su parte, FGF23 suprime al calcitriol y la PTH.<sup>455</sup>

- ***Klotho***

Klotho es una proteína producida por el riñón que actúa como cofactor de FGF23 y contribuye al mantenimiento de los niveles de Ca sérico por estimulación de la reabsorción de calcio mediada por TRPV5 a nivel renal.<sup>82</sup> Klotho, que fue identificado primeramente como un supresor del envejecimiento,<sup>294</sup> se expresa

principalmente en riñón y paratiroides, como una proteína simple transmembrana, pero también es secretado a sangre y orina.

- ***Calcitonina***

La calcitonina es una hormona producida por las células C de la glándula tiroides. Los osteoclastos son las células diana primarias de la calcitonina, sin embargo su receptor también ha sido descrito en riñón, osteocitos, cerebro, testículos, placenta y pulmones.<sup>189</sup>

Las células C expresan RSCa en su membrana y por tanto son sensibles a pequeños cambios en las concentraciones de calcio del líquido extracelular, de tal manera que los incrementos de la concentración de calcio extracelular inducen la secreción de calcitonina. El efecto de la calcitonina es la disminución del Ca sérico por disminución de la resorción ósea.<sup>170</sup>



➤ **Respuestas del sistema homeostático a las variaciones de calcio, fósforo y magnesio**

El mantenimiento de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , P y  $\text{Mg}^{2+}$  en un rango muy estrecho requiere la acción coordinada de riñón, intestino y hueso, y el control hormonal.

• ***Respuestas a las variaciones de calcio y magnesio***

El RSCa paratiroideo controla la homeostasis periférica de  $\text{Ca}^{2+}$  en el riñón, hueso e intestino por modulación de la secreción de hormona paratiroidea (PTH) en respuesta a niveles bajos de  $\text{Ca}^{2+}$  en plasma. En otros tejidos la activación local de RSCa desencadena respuestas adaptativas frente a variaciones microambientales de los niveles de Ca iónico.<sup>157</sup> En respuesta a la hipocalcemia, la unión reducida de  $\text{Ca}^{2+}$  a RSCa induce una rápida liberación de PTH desde los gránulos secretores, retarda la degradación de PTH y eventualmente conllevará a la hiperplasia glandular.

El incremento en los niveles circulantes de PTH, en condiciones normales, restaura los valores plasmáticos normales de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de:

- Aumento de resorción ósea.
- Incremento en la reabsorción de  $\text{Ca}^{2+}$  en el segmento distal de la nefrona por vía de los canales del receptor de potencial transitorio vanilloide 5 (TRPV5).
- Estimulo de la síntesis de calcitriol en las células del túbulo proximal en el riñón.

El RSCa renal es un componente de los mecanismos que regulan localmente la reabsorción de agua y minerales dependiente de PTH. En el riñón, el RSCa se expresa a lo largo de toda la nefrona y presenta polarización celular en segmentos específicos. El RSCa afecta muchas moléculas involucradas en la reabsorción paracelular y transcelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  en el riñón.<sup>447</sup>

En el túbulo proximal, el RSCa se localiza apicalmente y su expresión está modulada por calcitriol,<sup>55,72</sup> y por el fósforo en la dieta.<sup>448</sup> En este segmento, el RSCa controla la excreción de P dependiente de PTH y puede afectar la síntesis de calcitriol mediante la  $1\alpha$ -hidroxilasa renal.<sup>30,42</sup> La mayor reabsorción de  $\text{Ca}^{2+}$  y de  $\text{Mg}^{2+}$  ocurre en el túbulo proximal y en la rama ascendente gruesa del asa de Henle mediante transporte paracelular pasivo mediado por claudina-16 y claudina-19. Ambas proteínas forman canales permeables a cationes y cuando están mutadas son causa de hipomagnesemia familiar con hipercalciuria y nefrocalcinosis. Agonistas de RSCa (tales como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) pueden inducir degradación lisosomal de claudina-16 *in vitro*. En el riñón, esto podría conducir a pérdida de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  en la orina.<sup>241</sup>

En el segmento grueso ascendente del asa de Henle, el cotransportador apical de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  (NKCC2) y el canal de potasio medular externo renal (ROMK) generan un gradiente de potencial transepitelial positivo en el lumen, el cual conduce a la reabsorción de cationes (principalmente  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , pero también  $\text{Na}^+$ ) a través de una ruta paracelular.<sup>193</sup> Durante la hipercalcemia la activación basolateral de RSCa inhibe ROMK y NKCC2, lo cual provoca la disipación de las fuerzas necesarias para el transporte paracelular, resultando en la pérdida de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ .<sup>237</sup>

En el túbulo contorneado distal, la reabsorción de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  requiere procesos activos transcelulares. El primer segmento del túbulo contorneado distal determina la concentración final de  $\text{Mg}^{2+}$  en la orina mediante reabsorción del 5-10% del  $\text{Mg}^{2+}$  filtrado por vía del receptor de potencial transitorio melastatina 6 (TRPM6).<sup>475,553</sup> A este nivel, la actividad de RSCa reduce la expresión en la superficie celular del canal basolateral de  $\text{K}^+$ , Kir4.1.<sup>80</sup> Este canal provee iones  $\text{K}^+$  para la NaK-ATPasa, la cual mantiene un potencial de membrana local negativo necesario para la reabsorción transcelular de  $\text{Mg}^{2+}$  en el túbulo contorneado distal. En el segmento terminal del túbulo contorneado distal y en los túbulos colectores, el RSCa es necesario para controlar la reabsorción de  $\text{Ca}^{2+}$  modulando la entrada apical de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de TRPV5 y/o flujo basolateral de  $\text{Ca}^{2+}$  mediados por el intercambiador de  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  (NCX1) y la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa (PMCA1B).<sup>224,533</sup> En condiciones de hipocalcemia, las hormonas calcitropas, incluyendo calcitriol y PTH, incrementan la expresión y/o permiten la apertura de canales de TRPV5.<sup>113,225</sup> En modelos animales de hipercalcemia (ratones con delección TRPV5<sup>-/-</sup>) se ha observado que el incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  activa el RSCa, promoviendo la actividad de la bomba de protones  $\text{H}^+$ -ATPasa y la regulación a la baja de los canales de aquaporina 2. El descenso en el pH y la poliuria resultante se consideran mecanismos de protección contra el riesgo de desarrollar depósitos minerales.<sup>444</sup>

En el hueso, el RSCa se transcribe en preosteoblastos, osteoblastos, en células precursoras de osteoclastos y en osteoclastos maduros. Las fluctuaciones en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular *in vitro* controlan el destino de las células precursoras a través de vías que involucran la activación de RSCa.<sup>84,356</sup>

En el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en el hueso están involucrados los canales TRP: TRPV4, TRPV5 y TRPV6.<sup>226,348,547</sup> En el límite rugoso de la membrana de osteoclastos, los canales TRPV5 altamente selectivos a  $\text{Ca}^{2+}$  participan en la remoción del mineral de la matriz ósea mineralizada,<sup>226,546</sup> mientras que TRPV4 regula las concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , tanto en osteoblastos como en osteoclastos.<sup>348</sup> TRPV6 también se expresa en el hueso, principalmente en la región luminal de los osteoblastos y osteoclastos, aunque van der Eerden *et al.*, 2011 reportan que, al menos en el ratón, no es necesario para la mineralización.<sup>547</sup>

Aunque el  $\text{Mg}^{2+}$  que se almacena en hueso es el mejor indicador del  $\text{Mg}^{2+}$  total del cuerpo, el rol del  $\text{Mg}^{2+}$  en la fisiopatología de la movilización mineral no se comprende en su totalidad. La hipomagnesemia generalmente se asocia con densidad mineral ósea reducida, tanto en ratas como en humanos,<sup>45</sup> mientras que la hipermagnesemia es un factor de riesgo para desarrollar enfermedad ósea adinámica, una condición caracterizada por un bajo remodelado óseo.<sup>393</sup> En personas con función renal no comprometida, las dietas deficientes en  $\text{Mg}^{2+}$  se han relacionado con osteoporosis;<sup>1,463</sup> y podrían ser importantes en el desarrollo de osteoporosis postmenopáusica.<sup>193</sup> Además, el uso de fármacos inhibidores de bombas de protones (PPIs) está asociado con hipomagnesemia e incremento en el riesgo de fracturas.<sup>105,353</sup>

A nivel intestinal, el RSCa se expresa tanto en el lumen como en la membrana basolateral de las células epiteliales en el intestino delgado y grueso. Aquí, el receptor desempeña un papel en el crecimiento celular y en la diferenciación, en el transporte de fluidos y en sensar nutrientes.<sup>179</sup> La absorción de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  en el intestino se realiza mediante vías para- y transcelulares, siendo el transporte paracelular la ruta predominante en condiciones de elevado  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  en la

dieta.<sup>545</sup> El transporte paracelular ocurre en varios segmentos del intestino delgado, mientras que la absorción transcelular activa de  $\text{Ca}^{2+}$  tiene lugar principalmente en el duodeno, por vía del TRPV6. La mayor parte del  $\text{Mg}^{2+}$  se absorbe en el intestino delgado por ruta paracelular y en menor medida en el colon por transporte transcelular<sup>158</sup> por vía del TRPM6.<sup>475</sup>

Enfermedades genéticas del RSCa sugieren que el  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  son agonistas fisiológicos de RSCa *in vivo*.<sup>420,421</sup> El  $\text{Mg}^{2+}$  puede modular la secreción de PTH de manera similar al  $\text{Ca}^{2+}$ ; <sup>58,153, 245</sup> ya que incrementos en los niveles séricos de  $\text{Mg}^{2+}$  inhiben la liberación de PTH<sup>206</sup> y reducen la acumulación de AMPc estimulado por agonistas en las paratiroides.<sup>59</sup>

Se ha propuesto que en las paratiroides los efectos de niveles elevados de  $\text{Mg}^{2+}$  sobre RSCa mimetizan los del  $\text{Ca}^{2+}$ , de tal manera que el  $\text{Mg}^{2+}$  puede modular la secreción de PTH. Además, diversos estudios en pacientes en hemodiálisis o en diálisis peritoneal han reportado una relación inversa entre los niveles plasmáticos de PTH y el contenido de  $\text{Mg}^{2+}$  en el líquido dializado.<sup>394,395</sup> Sin embargo el  $\text{Ca}^{2+}$  es el estimulador más potente para la secreción de PTH.<sup>83,153,206</sup>

La reducción en la secreción de PTH inducida por el  $\text{Mg}^{2+}$  ocurre, principalmente, a concentraciones moderadamente bajas de  $\text{Ca}^{2+}$ . Además, el  $\text{Mg}^{2+}$  también modula la función de las glándulas paratiroides a través de la regulación al alza de receptores celulares claves como RSCa, VRD y el sistema FGF23/Klotho.<sup>454</sup>

El factor de crecimiento epidérmico<sup>194</sup> y los estrógenos<sup>193</sup> son hormonas que afectan directamente el metabolismo del  $\text{Mg}^{2+}$ .

Las deficiencias de  $Mg^{2+}$  alteran el metabolismo del  $Ca^{2+}$  significativamente, tanto en animales como en humanos.<sup>15,475,553</sup> Particularmente, en pacientes con hipomagnesemia es común observar hipocalcemia secundaria.

En las glándulas paratiroides, la hipomagnesemia incrementa la secreción de PTH.<sup>58,153,245</sup> Sin embargo, la deficiencia crónica de  $Mg^{2+}$  puede causar supresión en la liberación de PTH.<sup>11,16,255</sup> Probablemente, la prolongada hipomagnesemia cause depleción intracelular de  $Mg^{2+}$  que es responsable de: activación constitutiva de la señalización de RSCa, bloqueo de la secreción de PTH, y finalmente, hipocalcemia secundaria, debida a disminución en la reabsorción de  $Ca^{2+}$  por el riñón.<sup>436</sup>

- ***Respuestas a las variaciones de fósforo***

El P tiene un efecto directo sobre la síntesis y secreción de PTH, aunque no se ha identificado, todavía, en un sensor celular específico de P.

Tanto la PTH como el FGF23 promueven la pérdida de P por estimulación de la internalización e inactivación del transportador NaPi-IIa a nivel renal. Por su parte, la PTH también promueve el remodelado óseo, por tanto, moviliza P desde el hueso.<sup>230</sup> Por su parte, Klotho es un cofactor necesario para las acciones de FGF23 pero también promueve fosfaturia de manera independiente por inactivación de los cotransportadores NaPi-IIa.<sup>235,236</sup> El calcitriol promueve la absorción intestinal de P por incremento de los cotransportadores NaPi-IIb. Normalmente, este sistema actúa para mantener los niveles de P séricos en un rango normal.<sup>27</sup>

La unión del FGF23 secretado al complejo Klotho/FGFR1 (Receptor 1 de FGF) suprime la reabsorción renal de P y la síntesis de calcitriol en el riñón,<sup>491</sup> a la vez que disminuye la secreción de PTH en las paratiroides.<sup>287</sup> La fosfaturia inducida por FGF23 se debe a que éste provoca supresión de la expresión de los cotransportadores NaPi, IIa y IIc en los túbulos renales proximales. FGF23 disminuye la síntesis de calcitriol por dos mecanismos: por inhibición de la  $1\alpha$ -hidroxilasa y por aumento de la actividad de la 24-hidroxilasa. La  $1\alpha$ -hidroxilasa, produce  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (calcitriol) a partir de  $25(\text{OH})\text{D}_3$ . Mientras que la 24-hidroxilasa inactiva a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .<sup>491,494</sup> Por tanto, la deficiencia de FGF23 causa hiperfosfatemia y niveles elevados de calcitriol, situación que favorece el desarrollo calcificaciones extraóseas.<sup>518</sup>

Las acciones endocrinas de FGF23 son dependientes de su unión a Klotho y posterior activación del complejo Klotho-FGF23, de tal manera que la ausencia de Klotho (ratón Klotho<sup>-/-</sup>) produce un fenotipo similar al ratón FGF23<sup>-/-</sup>, caracterizado por elevación en los niveles de fósforo y calcitriol junto con calcificaciones extraóseas.

La ingesta de dietas altas en fósforo,<sup>155</sup> el calcitriol<sup>322</sup> y los estrógenos estimulan la producción de FGF23,<sup>76</sup> mientras que la deficiencia de calcio reduce los niveles circulantes de FGF23.<sup>455</sup> Además de inducir fosfaturia, FGF23 inhibe la producción de calcitriol.

Las glándulas paratiroides expresan Klotho<sup>244</sup> y receptor de FGF23. En estas glándulas, FGF23 es capaz de disminuir tanto la expresión de ARNm de PTH como la secreción de PTH.<sup>35,73,287</sup> Por su parte, la PTH ejerce efectos directos e indirectos sobre la secreción de FGF23, estos últimos por variaciones en las

concentraciones de calcitriol.<sup>336</sup> Así el incremento en los niveles circulantes de PTH provoca un aumento de FGF23.

FGF23 también incrementa la expresión génica y los niveles de proteínas de los receptores sensores de calcio y de vitamina D, y disminuye la proliferación de células paratiroides.<sup>73</sup> La administración de FGF23 produce regulación al alza de *Klotho* en paratiroides<sup>35</sup> y niveles elevados de Ca extracelular pueden ser capaces de incrementar la expresión de *Klotho* y del receptor FGF en glándulas paratiroides normales.<sup>73</sup>

*Klotho* intacto y circulante ejerce múltiples acciones biológicas en el metabolismo del fósforo y del calcio. En los túbulos contorneados distales del riñón, *Klotho* tiene un efecto estimulante sobre la actividad de TRPV5,<sup>82</sup> mientras que en las glándulas paratiroides permite la expresión en la superficie de la bomba NaK-ATPasa para generar la energía necesaria para la secreción de PTH.<sup>244</sup> Además, *Klotho* trabaja como correceptor para FGF23.<sup>295,544</sup> La expresión de *Klotho* es inducida por calcitriol y suprimida por FGF23.<sup>345</sup>

Una de las funciones atribuidas a *Klotho* es de protección renal.<sup>216,519</sup> Con la progresión de la ERC, los niveles de *Klotho* declinan<sup>234,283</sup> causando resistencia a FGF23, incremento significativo de FGF23, liberación de PTH, hipovitaminosis D, e hiperfosfatemia. La delección del gen *Klotho* (*Klotho*<sup>-/-</sup>) o *FGF23* (*FGF23*<sup>-/-</sup>) en un modelo de ratón conduce a hiperfosfatemia, calcificación vascular y osteopenia, un fenotipo similar a las alteraciones minerales y óseas observadas en la ERC.<sup>294,492</sup> Además, el estrés oxidativo y la inflamación, características del estado urémico, causan disminución en la expresión de *Klotho*.<sup>387,409</sup> Estudios experimentales han demostrado que las toxinas urémicas, sulfato de indoxil y



p- cresilsulfato pueden inhibir la expresión génica de Klotho relacionada con hipermetilación génica, sugiriendo que la regulación epigenética de las toxinas urémicas sobre genes específicos puede ser un mecanismo patológico de enfermedad.<sup>4,520</sup>

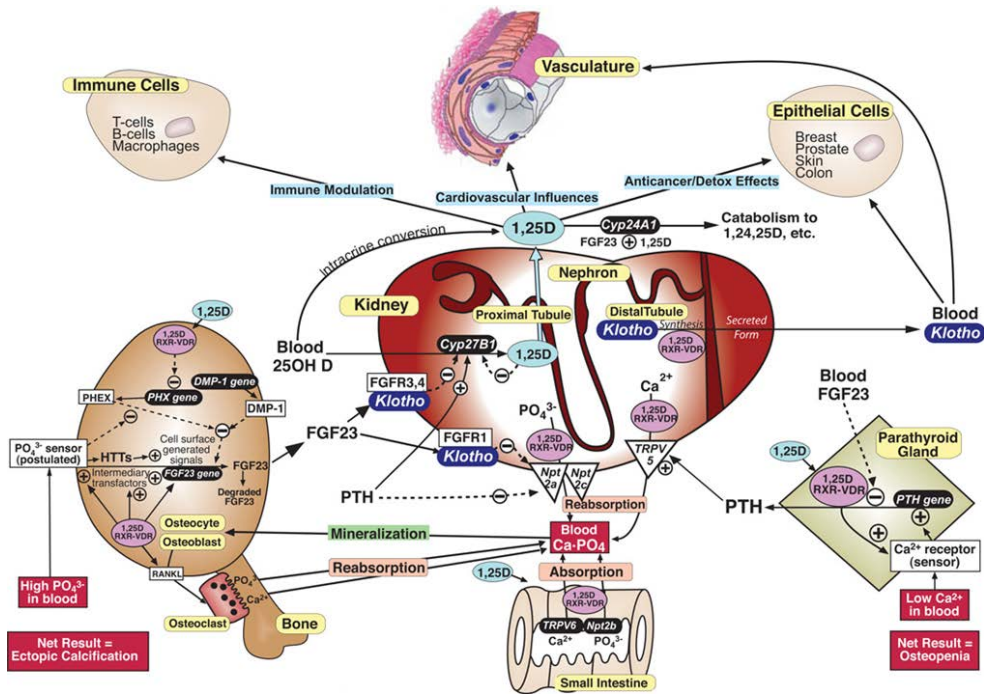
Por otro lado, la sobreexpresión de Klotho en ratones transgénicos previene el desarrollo de calcificaciones vasculares a través de una inhibición directa del ingreso P en las células de musculo liso vascular, además de inducir fosfaturia y mejorar el filtrado glomerular.<sup>234</sup>

### **2.1.2. PERTURBACIONES DEL METABOLISMO MINERAL EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA**

En humanos, la enfermedad renal crónica se asocia con anormalidades del metabolismo óseo mineral que tienen numerosas manifestaciones clínicas. Desde estadios muy tempranos, la enfermedad renal crónica se acompaña de alteraciones en los mecanismos de control del calcio, fósforo y de la vitamina D. Estas alteraciones se agravan con el deterioro progresivo de la función renal. Los pacientes típicamente desarrollan hiperparatiroidismo secundario y alteraciones óseas, razón por la cual la condición clínica asociada se denominó “osteodistrofia renal”. Actualmente se sabe que el hiperparatiroidismo secundario y la osteodistrofia asociada a enfermedad renal crónica constituyen componentes de un síndrome clínico más extenso con complicaciones sistémicas. Por consiguiente el término Enfermedad Renal Crónica- Alteraciones del Metabolismo Óseo-Mineral, ERC-AOM o CKD-MBD por su abreviatura en inglés, es de mayor aceptación y ha sido adoptado por el comité de expertos en nefrología a nivel mundial y agrupado en el consorcio KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes).

Los componentes del síndrome CKD-MBD son:

- Anormalidades en calcio, fósforo, magnesio, hormona paratiroidea, FGF23, y metabolismo de la vitamina D.
- Anormalidades óseas que afectan el remodelado, la mineralización, el volumen, y el crecimiento óseo.
- Calcificación de tejidos blandos y vasculares.



**Figura 2.1** Función endocrina del hueso, riñón y paratiroides en la regulación del metabolismo del calcio y fósforo para prevenir trastornos óseos y calcificaciones extraesqueléticas. Haussler *et al.*, *Rev Endocr Metab Disord.* 2012; 13(1): 57–69.

Las perturbaciones en el metabolismo mineral, principalmente la hiperfosfatemia, son frecuentes durante la enfermedad renal crónica (ERC), y se acompañan clásicamente por hiperparatiroidismo secundario, alteraciones óseas, y calcificaciones ectópicas de tejidos blandos. Bajo condiciones fisiológicas, como hemos descrito anteriormente, el eje paratiroides-riñón-hueso controla la homeostasis de P y  $\text{Ca}^{2+}$  mediante un sistema que incluye al factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23), Klotho, calcitriol y PTH (**Figura 2.1**). Durante la ERC, el deterioro de la función renal conlleva dificultad para la excreción de P y disminución de los niveles de Klotho, sin embargo los niveles de P inicialmente se mantienen en un rango normal por regulación al alza de FGF23 y PTH.<sup>250,283,311</sup> Desafortunadamente, estos mecanismos de defensa resultan insuficientes a

medida que declina la función renal. Debido a que la tasa de filtrado glomerular disminuye en la ERC avanzada, la excreción urinaria de P se torna ineficiente, lo cual, junto con alteraciones en el remodelado óseo y la ingestión de P continuada, resulta en hiperfosfatemia. Además, durante la ERC se produce una deficiencia de calcitriol debido a la actividad disminuida de la 1- $\alpha$  hidroxilasa renal.<sup>282</sup> La hiperfosfatemia da lugar a un incremento en los niveles séricos de FGF23 (inhibidor directo de la actividad de la 1- $\alpha$  hidroxilasa). Los niveles bajos de calcitriol derivan en hipocalcemia y promueven la secreción de PTH y el desarrollo de hiperparatiroidismo secundario.

Los trastornos minerales en la enfermedad renal crónica provocan diversas alteraciones esqueléticas que incluyen: osteítis fibrosa, osteomalacia, osteoporosis y enfermedad ósea adinámica.

Durante las etapas iniciales de la ERC los niveles séricos de FGF23 están elevados a pesar de no haber incrementos significativos de PTH y de P. Se sabe que la acumulación de fósforo y la deficiencia de vitamina D son factores claves en el desarrollo de hiperparatiroidismo secundario.<sup>106</sup> El incremento en los niveles séricos de PTH en los pacientes con ERC promueve la excreción urinaria de P, mantiene los niveles séricos de Ca y estimula al riñón para que produzca 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>. El incremento de la producción de FGF23 en pacientes con ERC se debe principalmente al aumento de la carga de fósforo que no siempre se acompaña de hiperfosfatemia.<sup>456</sup> Como resultado, FGF23 induce fosfaturia, lo cual explicaría por qué los niveles de P se mantienen normales en los estadios iniciales de la ERC. No obstante, FGF23 disminuye la producción de calcitriol y acelera su metabolismo por aumentar la actividad de la 24 hidroxilasa. Por tanto la disminución de calcitriol que se observa en los inicios de la ERC puede ser

debida, además de la disminución en la masa renal funcional, a un incremento en el FGF23.<sup>217</sup> En este sentido, se ha demostrado que en pacientes con filtrado glomerular reducido y con niveles séricos normales de P, Ca y PTH, los niveles de FGF23 están elevados mientras que los de calcitriol están reducidos.<sup>249</sup> El avance en el daño renal podría provocar que el FGF23 y la PTH sean incapaces de mantener el equilibrio homeostático y, por tanto, que se incrementen las concentraciones de P sérico.<sup>456</sup>

Así pues, en estadios avanzados de ERC un aumento en los niveles séricos de FGF23 indicaría un control inadecuado del P. Esto se pone de manifiesto en pacientes con ERC en los cuales un control de la hiperfosfatemia está asociado con una disminución en FGF23.<sup>185</sup> Por consiguiente, el FGF23 podría ser útil para reflejar periodos prolongados de balance de P positivo.<sup>456</sup>

Niveles elevados de FGF23 son predictores independientes de mortalidad,<sup>203,262</sup> progresión de enfermedad renal,<sup>161,531</sup> hipertrofia ventricular izquierda<sup>202,232</sup> y disfunción vascular.<sup>362</sup> Recientemente se ha demostrado que FGF23 induce la reabsorción de Na<sup>+</sup> a nivel renal al regular la expresión del cotransportador Na<sup>+</sup>: Cl<sup>-</sup>, NCC, en la membrana de las células de los túbulos distales. Los autores sugieren que este mecanismo podría explicar la asociación entre FGF23, hipertensión y riesgo cardiovascular en pacientes con ERC.<sup>17</sup>

Así, en pacientes en diálisis, los niveles séricos de FGF23 están marcadamente incrementados y se correlacionan positivamente con los de PTH y de P.<sup>243</sup> En condiciones normales el FGF23 inhibe la secreción de PTH; sin embargo, estudios experimentales en ratas sugieren que durante el hiperparatiroidismo secundario las glándulas paratiroides hiperplásicas no responden a los efectos inhibitorios de

FGF23, probablemente debido a que en estas condiciones las glándulas paratiroides presentan menor expresión de Klotho y receptor FGF.<sup>73,172</sup>

Además, estudios en glándulas paratiroides humanas de pacientes con hiperparatiroidismo secundario avanzado han demostrado que la expresión de Klotho y FGFR1c disminuye significativamente.<sup>286, 288, 291</sup>

Después del trasplante renal, muchos enfermos continúan teniendo niveles elevados de FGF23 que podrían ser responsables de la hipofosfatemia con deficiencia relativa de vitamina D observada en estos pacientes.<sup>38,145,146</sup> En la actualidad no se ha clarificado por qué la secreción de FGF23 se mantiene a pesar de la hipofosfatemia.<sup>456</sup>

La terapia actual para trastornos óseos y minerales en la ERC incluye: el uso de análogos de calcitriol, calcimiméticos, control del P a través de restricción en la dieta y quelantes de P orales, paratiroidectomía y ajustes en la composición mineral del dializado. La deficiencia de vitamina D y el hiperparatiroidismo secundario a la ERC se tratan con agonistas de los receptores de vitamina D (VDRAs) que, en ocasiones, han sido asociados con episodios de hipercalcemia. Además, los quelantes de fósforo que contienen Ca son utilizados comúnmente para tratar la hiperfosfatemia, lo cual incrementa el Ca en estos individuos susceptibles.<sup>275</sup> Junto con alteraciones del remodelado óseo, estos factores contribuyen a la desregulación de la homeostasis del Ca en la ERC.<sup>484</sup>

Como se ha comentado anteriormente, una opción terapéutica en pacientes con ERC se basa en administrar derivados de la vitamina D. Los esteroides de 1,25

$(\text{OH})_2\text{D}_3$  disminuyen los niveles de PTH y minimizan la hiperfosfatemia por estimulación de la secreción ósea de FGF23.

A medida que la función renal se deteriora, el control de la hiperfosfatemia en pacientes con ERC se basa en el uso de agentes quelantes de P que actúan en el lumen intestinal para limitar la absorción de P. Dentro de los quelantes P, los de mayor uso son: hidróxido de aluminio, compuestos a base de  $\text{Ca}^{2+}$ , sales de  $\text{Mg}^{2+}$ , y quelantes que no contienen  $\text{Ca}^{2+}$  ni aluminio. Los quelantes de P basados en  $\text{Mg}^{2+}$  pueden contribuir a disminuir los niveles de PTH por un efecto calcimimético del  $\text{Mg}^{2+}$  sobre RSCa en la paratiroides y al mismo tiempo pueden tener un efecto benéfico a nivel cardiovascular por modulación local del RSCa.<sup>112</sup>

Debido a que los vasos mineralizados y el hueso están compuestos principalmente de cristales de calcio y fósforo, identificar las diferencias en los transportadores de iones y los mecanismos sensores involucrados en la calcificación vascular y la formación de tejido óseo es esencial para el desarrollo de terapias específicas.<sup>401</sup>

## 2.2. ESTRÉS OXIDATIVO, ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA Y SÍNDROME METABÓLICO

### 2.2.1. ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo está implicado en la patogenia de diversas enfermedades y estados proinflamatorios en humanos y animales, entre las que se incluyen: obesidad/síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), enfermedades cardiovasculares y enfermedad renal.<sup>101,118,190,204,392,560</sup> La característica principal del estrés oxidativo es la producción elevada de sustancias prooxidantes y la disminución en la expresión y/o actividad de los mecanismos de defensa antioxidante.<sup>503</sup>

#### 2.2.1.1. Procesos oxidantes y antioxidantes

Las principales sustancias prooxidantes implicadas en el estrés oxidativo son los denominados radicales libres, las especies reactivas de oxígeno (EROS) y las especies reactivas de nitrógeno (ERNS) (**Tabla 2.1**). Estas moléculas son capaces de reaccionar con componentes de la pared celular y moléculas orgánicas provocando daño celular, necrosis y apoptosis a través de la oxidación de lípidos, proteínas y ADN.<sup>135,211</sup> También pueden originar disfunción endotelial así como infiltración y activación de células inflamatorias.<sup>239</sup>



**Tabla 2.1.** Nomenclatura de las principales especies reactivas del oxígeno (EROS) y del nitrógeno (ERNS). Adaptado de Halliwell *et al.*, 1989.<sup>212</sup>

Radicales		No radicales	
Hidroxilo	OH•	Peróxidos orgánicos	ROOH
Alcoxilo	RO•	Oxígeno singlete	O <sub>2</sub>
Hidroperoxilo	HOO•	Peróxido de hidrógeno	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Superóxido	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Ácido hipocloroso	HOCl <sup>-</sup>
Peroxilo	ROO•	Ácido nitroso	HN <sub>2</sub>
Óxido nítrico	NO•	Catión Nitrito	NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>
Dióxido de nitrógeno	NO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Peroxinitrito	ONOO <sup>-</sup>
		Ácido peroxinitroso	ONOOH
		Alquil peroxinitritos	RONOO
		Ozono	O <sub>3</sub>
		Ácido hipobromoso	HBrO

Entre estas sustancias prooxidantes, está demostrado que las EROS tienen un papel determinante en el desarrollo del estrés oxidativo. Las principales EROS y ERNS son: anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ácido hipocloroso (HOCl<sup>-</sup>), radical hidroxilo (OH•), óxido nítrico (NO•), y peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). La principal fuente de EROS y la primera estructura sujeta a daños oxidativos es la mitocondria, no obstante las EROS se pueden producir a distintos niveles celulares (por ejemplo, retículo endoplasmático o membrana celular).<sup>128,450, 483</sup>

Las EROS desempeñan un papel fisiológico importante en la señalización, proliferación y diferenciación celular;<sup>39,114</sup> además se consideran productos normales del metabolismo y sus niveles se mantienen en un rango fisiológico estrecho gracias a los sistemas antioxidantes. Cuando la producción de las sustancias oxidantes es elevada o cuando los mecanismos antioxidantes son insuficientes, las células sufren daño oxidativo.

➤ **Reacciones que ocasionan daño oxidativo en las que participan radicales libres**

Las EROs pueden reaccionar con otras moléculas que no son radicales libres y a su vez los radicales libres pueden reaccionar entre sí generando en algunas de estas reacciones radicales con mayor potencia oxidante. A continuación se describen estas reacciones.

- ***Reacciones entre radicales y no radicales***

Cuando un radical libre reacciona con una molécula considerada no radical, el no radical pierde un electrón y es transformado en un nuevo radical libre, creando una reacción en cadena. La tendencia a producir reacciones en cadena es una de las características principales de las reacciones de radicales libres. Estas reacciones conllevan al daño celular, necrosis y apoptosis a través de la oxidación de lípidos, proteínas y ADN;<sup>135</sup> también provocan disfunción endotelial e infiltración y activación de células inflamatorias en el endotelio.<sup>239</sup>

- ***Peroxidación lipídica***

La degradación oxidativa de ácidos grasos polinsaturados (AGPIs) o peroxidación lipídica es responsable del daño oxidativo de las membranas lipídicas.<sup>344</sup>

La peroxidación de los lípidos de membranas (**Figura 2.2**) se inicia por la acción de un oxidante potente como el radical hidroxilo, el cual elimina un átomo de hidrógeno de uno de los átomos de carbono en un AGPI. Esto crea un radical de carbono central ( $C^\bullet$ ), el cual, luego, es transformado en un radical peroxilo de  $O_2$  central ( $COO^\bullet$ ) que puede eliminar un átomo de hidrógeno de un ácido graso adyacente e inicia una serie de reacciones nuevas. La reacción de propagación

final crea una reacción en cadena que continuará hasta que el sustrato (ej., ácido graso) se degrade o hasta que algo interfiera con la reacción. Esto último es la base de la acción antioxidante de la vitamina E.

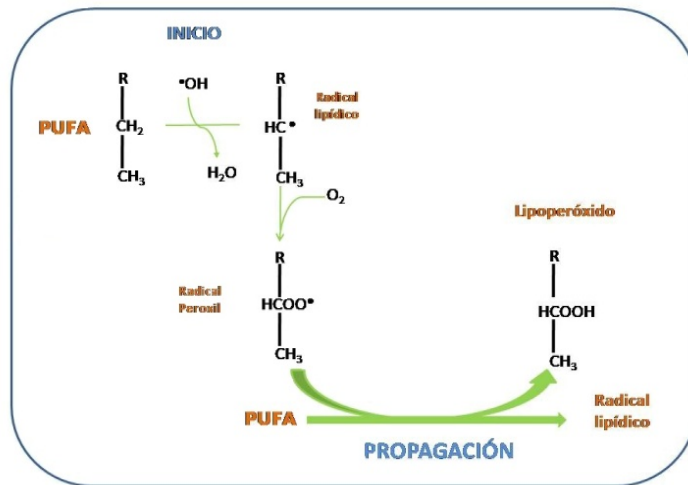


Figura 2.2 Secuencia de reacción de peroxidación de ácidos grasos polinsaturados

- **Reacciones entre radicales**

Dos radicales pueden reaccionar para compartir electrones y formar un enlace covalente. Esto elimina la existencia de radicales libres, pero no elimina el riesgo puesto que, en algunos casos, el producto de una reacción radical-radical es mucho más destructivo que ambos radicales.<sup>344</sup>

- **Transformación del óxido nítrico**

El óxido nítrico es un radical libre que tiene acciones beneficiosas como vasodilatador, neurotransmisor, y agente bactericida.<sup>138</sup> Sin embargo, el óxido nítrico puede llegar a ser un problema en presencia de superóxido. La reacción del superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) con óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) genera un poderoso oxidante denominado peroxinitrito.<sup>166</sup>



El peroxinitrito puede causar daño tisular directo, o descomponerse para formar radicales hidroxilos y dióxido de nitrógeno, los cuales pueden producir daño a los tejidos. Esta transformación negativa que experimenta el óxido nítrico, de un radical libre benéfico a una fuente de daño oxidativo demuestra cómo los metabolitos del  $\text{O}_2$  (en este caso  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) pueden promover daño oxidativo indirectamente, por cambios en las características del ambiente químico.

#### ➤ **Sistemas de defensa frente al estrés oxidativo**

Los mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo incluyen tanto mecanismos enzimáticos como no enzimáticos. Una característica de los estados de estrés oxidativo es que se produce un descenso en los niveles plasmáticos de las enzimas antioxidantes y una elevación de marcadores de daño oxidativo.<sup>86</sup> Esta condición puede ser modificada al aumentar la ingesta de antioxidantes,<sup>301,358</sup> de tal manera que su uso para la prevención de enfermedades y como complemento nutricional es aceptada por la mayoría de la población y está respaldada por evidencia científica.

Cualquier especie química que pueda reducir o retardar la oxidación de un sustrato es considerado un antioxidante.<sup>212</sup> La capacidad antioxidante celular viene dada por mecanismos a través de los cuales la célula anula la reactividad y/o inhibe la generación de radicales libres.<sup>191,413,530</sup> Estos mecanismos están asociados tanto a componentes enzimáticos como no enzimáticos.

Dentro de los compuestos antioxidantes endógenos no enzimáticos se incluyen: urato, glutatión, ubiquinona (Coenzima Q), tiorredoxina y algunas proteínas (ferritina, transferrina, lactoferrina y ceruplasmina). Actúan como un sistema antioxidante puesto que se fijan y secuestran metales de transición que pueden iniciar reacciones oxidativas. Las principales enzimas antioxidantes son: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa, glutatión *S*-transferasa, catalasa, tiorredoxina reductasa, peroxirredoxinas (Prx), NAD(P)H: ubiquinona oxidoreductasa (NQO1) y paraoxonasa (PON).<sup>473</sup> Selenio, vitamina C y vitamina E también son importantes en el sistema de defensa antioxidante.<sup>221,223,343,357,470</sup>

Las enzimas antioxidantes representan la primera línea de defensa contra las EROs y el estrés oxidativo.<sup>349</sup> Las variaciones en la actividad de estas enzimas en situaciones de estrés oxidativo puede depender de la edad de los individuos, del tejido que sufre el daño, de los hábitos alimentarios y de variaciones genéticas individuales.<sup>100,580</sup>

A continuación nos centraremos en revisar la función de uno de los principales antioxidantes naturales, la vitamina E.

### 2.2.1.2. Vitamina E

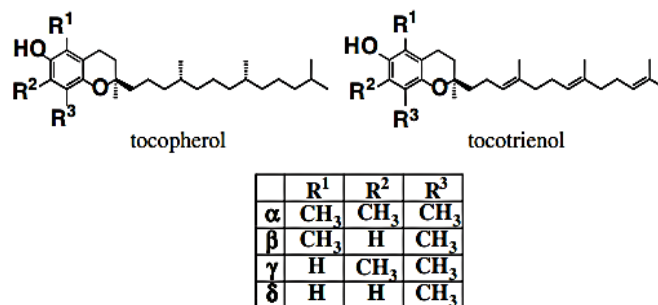
#### ➤ Química de la vitamina E

La vitamina E o tocoferol es una vitamina liposoluble capaz de interrumpir la peroxidación lipídica.<sup>357</sup> Debido a que se localiza en la membrana celular está sujeta a procesos de oxidación por radicales libres. Esta reacción forma radicales de vitamina E poco reactivos y, como consecuencia, la reacción en cadena de peroxidación se interrumpe.<sup>65</sup>

Los tocoferoles son aceites de color amarillo a temperatura ambiente, insolubles en agua y solubles en solventes no polares. Son buenos neutralizadores de radicales libres y funcionan como antioxidantes. Son fácilmente oxidados y pueden ser destruidos por peróxidos, ozono y permanganato en un proceso catalizado por la luz y acelerado por ácidos grasos polinsaturados y sales metálicas. También son muy resistentes a los ácidos y, bajo condiciones anaeróbicas, a bases.

La estructura química de la vitamina E consiste en una cadena lateral derivada de un núcleo 6-cromano metilado o hidrocromano unido a una cadena de fitilo.

El término vitamina E se refiere a todos los derivados del tocol o tocotrieno que muestran, cualitativamente, la actividad biológica del  $\alpha$ -tocoferol.



**Figura 2.3** Estructura química de la vitamina E. Takada y Suzuki, 2010.<sup>522</sup>

El término tocol es la designación para el derivado con una cadena lateral compuesta por tres unidades de isopentilo completamente saturadas; tocoferol denota genéricamente el mono-, di-, y trimetil tocoles. Mientras que el término tocotrienol es la designación de los derivados 6-cromano con una cadena lateral similar conteniendo tres dobles enlaces. Los tocoferoles y los tocotrienoles individuales se nombran de acuerdo a la posición y número de los grupos metilos en su anillo cromanol <sup>522</sup> (Fig 2.3).

Aunque son posibles ocho estereoisómeros de vitamina E, sólo existe una forma natural de esta vitamina: la forma *R, R, R*-. Sin embargo, la síntesis química de vitamina E produce mezclas de otros estereoisómeros, dependiendo de la materia prima a partir de la que se produzcan.

El *dl-α-tocoferol* se comercializó a principios de los años 70s, (llamado primeramente *2RS-α-tocoferol*) en forma de acetato de éster y fue adoptado como el estándar internacional sobre el cuál otras formas de vitamina E se basan actualmente.

Las moléculas con actividad biológica similar a las vitaminas se denominan vitámeros. Los vitámeros de E varían en potencia según las posiciones y número de sus grupos de núcleos metilos, siendo los de mayor biopotencia las formas trimetiladas.<sup>522</sup>

- **Fuentes de vitamina E**

La vitamina E es sintetizada solamente por plantas y por tanto se encuentra principalmente en productos de origen vegetal, las fuentes más abundantes son los aceites vegetales. Todas las plantas superiores contienen  $\alpha$ -tocoferol en sus hojas y en otras partes verdes. Debido a que el  $\alpha$ -tocoferol se encuentra principalmente en los cloroplastos de las células vegetales (mientras que los vitámeros  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ - se encuentran, usualmente, fuera de estas partículas), las plantas verdes tienden a contener más vitamina E que las amarillas. Los aceites de girasol y de semillas de trigo contienen principalmente  $\alpha$ -(RRR)-tocoferol, mientras que el aceite de soja y el de maíz contienen  $\gamma$ -(RRR)-tocoferol. Los animales, por su parte, almacenan principalmente  $\alpha$ -tocoferol.<sup>538</sup>

- **Formas sintéticas de vitamina E**

Las preparaciones sintéticas de vitamina E son mezclas de los ocho diesteroisómeros que son los vitámeros: 2RS, 4'RS, 8'RS designados comúnmente con el prefijo all-*rac*- tanto en las formas no esterificadas (all- *rac*- $\alpha$ -tocoferol) y las esterificadas (all- *rac*-  $\alpha$ -tocoferil acetato). Otras formas utilizadas comercialmente incluyen: all-*rac*-  $\alpha$ -tocoferil succinato y all-*rac*- $\alpha$ -tocoferil polientilenglicol-succinato.<sup>95</sup>



➤ **Expresión de la actividad de la vitamina E**

La actividad de la vitamina E se observa en varios isómeros de cadena lateral y análogos metilados de tocoferol y tocotrienol. Estos derivados metilos: mono- (d-tocoferol), di- ( $\beta$ - y  $\gamma$ -tocoferol) y tri- ( $\alpha$ -tocoferol), difieren en actividad de vitamina E. La configuración epimérica en la posición-2 es la más importante para determinar la actividad biológica. El R,R,R- $\alpha$ -tocoferol es utilizado en la actualidad como estándar internacional. Este sistema sólo distingue los análogos metilados y no los diestereoisómeros particulares.

Algunos de los vitámeros E comunes en los alimentos ( $\beta$ - y  $\gamma$ -tocoferol, los tocotrienoles) tienen poca actividad biológica. El vitámero más biopotente, el de mayor interés en nutrición, es el  $\alpha$ -tocoferol, el cual se encuentra naturalmente como el estereoisomero *RRR* [(*RRR*)-  $\alpha$ -tocoferol]. Este vitámero es el único reconocido con elevada selectividad por la proteína hepática de transferencia de  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TTP) que desencadena su asociación con lipoproteínas y la secreción de vitamina E al torrente sanguíneo.<sup>382,537</sup> Como consecuencia, el isómero  $\alpha$ -tocoferol es el principal vitámero de vitamina E presente en plasma y tejidos.

Debido a que todas las formas de tocoferol presentan propiedades antioxidantes similares, se ha planteado que la adaptación de los organismos para seleccionar el  $\alpha$ -tocoferol puede estar relacionada con algunas propiedades no antioxidantes específicas (incluyendo la modulación de actividad enzimática, regulación de la expresión génica y estabilización de membrana).<sup>54</sup>

Otra isoforma natural de vitamina E, tocoferol fosfato, ha sido implicada en la modulación de la proliferación celular y en la regulación de la expresión génica en procesos como inflamación y aterosclerosis.<sup>384</sup>

➤ **Metabolismo de la vitamina E**

El metabolismo de la vitamina E es limitado, la mayoría de los tocoferoles que son absorbidos y retenidos son transportados sin transformación a los tejidos. La excreción de  $\alpha$ -tocoferol no metabolizado ocurre solamente a dosis altas, cuando se excede la capacidad de unión a la  $\alpha$ -TTP. El metabolismo de los tocoferoles involucra la oxidación de los grupos del anillo y la cadena lateral.

• ***Oxidación del anillo cromanol***

La oxidación del anillo de cromanol es la base de la función antioxidante *in vivo* de la vitamina. Esta involucra la oxidación, primariamente a tocoferilquinona, la cual procede del radical intermediario semiestable tocoferoxil. La oxidación monovalente de tocoferol al radical tocoferoxil es una reacción reversible (al menos *in vitro*). La oxidación del radical intermediario es unidireccional. Debido a que la tocoferilquinona no tiene actividad de vitamina E, su producción representa el catabolismo y pérdida de vitamina desde el sistema. La tocoferilquinona puede ser potencialmente reducida a  $\alpha$ - tocoferilquinona, la cual puede ser conjugada con el ácido glucurónico, ser secretada por la bilis, y de esta manera ser excretada con las heces. Bajo condiciones de ingesta de niveles normales de vitamina E, menos del 1% de la vitamina absorbida es excretada por orina.

- ***Oxidación de la cadena lateral fitilo***

La vitamina E es catabolizada a metabolitos solubles en agua a través de procesos mediados por citocromo P450 e iniciados por la  $\beta$ -oxidación de un grupo metilo de la cadena lateral de fitilo. Este paso de hidroxilación, el cual es catalizado por una isoforma P540 (CYP3A) que está involucrada en la  $\beta$ -hidroxilación de leucotrienos, es seguido por la deshidrogenación del 13'-cromanol, y la subsecuente ruptura en la cadena lateral de fitilo a través de la remoción de los fragmentos de carbono 2- y 3-. Los productos resultantes, que incluyen el ácido tocoferónico y la tocoferonolactona, son excretados en la orina, generalmente como conjugados glucuronil. Esta vía cataboliza preferentemente  $\gamma$ -tocoferol, contribuyendo al remodelado más rápido del vitámero formado. Sin embargo, el proceso parece ser regulado al alza por altas dosis de  $\alpha$ -tocoferol, sugiriendo que también es importante para el aclarado de ese vitámero a través de la conversión a  $\alpha$ -carboximetilcromanol, el cual es excretado rápidamente.

- ***Otras reacciones***

La detección de pequeñas cantidades de  $\alpha$ -tocoferil fosfato en tejidos de animales alimentados con vitamina E sugiere que la vitamina puede ser fosforilada. La importancia metabólica de este metabolito no se comprende aún, y las quinasas implicadas no han sido identificadas. La vitamina E puede ser nitrada *in vivo*.

➤ **Reciclaje de vitamina E**

Una porción significativa de vitamina E puede ser reciclada *in vivo* por reducción del radical tocoferilo a tocoferol. Diversos hallazgos sugieren esta hipótesis: el intercambio muy bajo de  $\alpha$ -tocoferol, la tasa baja de depleción en animales deprivados de vitamina E y el ratio molar relativamente bajo de vitamina E con

respecto a PUFA (1:850) en la mayoría de las membranas biológicas. Diversos mecanismos han sido propuestos para la reducción *in vivo* de tocoferilo por varios reductores intracelulares. Estudios *in vitro* han demostrado que esto puede ocurrir en liposomas por el ácido ascórbico, en suspensiones microsomales por el NAD (P) H, y en suspensiones mitocondriales por el NADH y el succinato, mostrando estos dos últimos sistemas sinergismo con la glutatión reducida (GSH) o ubiquinonas. Además, se ha sugerido una actividad tocoferil reductasa unida a membrana. Es posible que el reciclaje del tocoferol pueda estar acoplado al transporte de electrones entre uno o más donantes en la fase soluble de la célula y el radical intermediario en la membrana, resultando en la reducción de este último.

De acuerdo con este modelo, la vitamina E podría ser retenida a través de reciclaje hasta que los sistemas reductores, tanto en la fase acuosa y en el dominio de membrana, sean limitantes. En ese momento la vitamina podría perderse por conversión irreversible del radical tocoferoxilo a tocoferilquinona, y la lipoperoxidación y la oxidación de proteínas podrían incrementarse. Sin embargo, existe poca evidencia directa de este fenómeno *in vivo*.

### ➤ **Propiedades y mecanismos de acción de la vitamina E**

La vitamina E tiene un rol fundamental en el metabolismo normal de todas las células. Por tanto, su deficiencia puede afectar diversos órganos. Su función está relacionada con la de otros nutrientes y factores endógenos que, colectivamente, integran un sistema múltiple que brinda protección contra los daños potenciales de especies reactivas de oxígeno formadas durante el metabolismo o que son encontradas en el ambiente. Por tanto, las manifestaciones de deficiencia y de

necesidades de vitamina E pueden verse afectadas por las necesidades de otros nutrientes, como selenio y vitamina C, y por exposición a factores prooxidantes. La vitamina E también puede tener funciones no antioxidantes en la regulación de expresión de genes y en la señalización celular.<sup>213</sup>

A diferencia de otras vitaminas, la vitamina E no solamente es esencialmente no tóxica, también parece tener efectos positivos a dosis apreciablemente mayores que aquellas que se requieren para prevenir síntomas clínicos de deficiencia. Más notablemente, los niveles supranutricionales de vitamina han sido útiles para reducir la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL)<sup>499</sup> y por tanto reducir el riesgo de aterosclerosis.

- ***La vitamina E como un antioxidante biológico***

La principal función nutricional de la vitamina E es ser un antioxidante biológico. Un agente antioxidante inhibe la oxidación y por tanto previene reacciones de oxidación tales como la conversión de ácidos grasos poliinsaturados a lipoperóxidos o la conversión de proteínas libres o unidas a sulfidrilos en disulfitos. La vitamina E tiene una importancia funcional básica en el mantenimiento de la integridad de la membrana celular en todas las células del organismo. Su función antioxidante implica la reducción de radicales libres,<sup>92</sup> además de tener un efecto estabilizante sobre la membrana celular formando complejos con los componentes lipídicos de la membrana.<sup>54</sup>

- ***Funciones no antioxidantes de la vitamina E***

Existen enzimas que pueden ser reguladas por el  $\alpha$ -tocoferol. Estas enzimas se encuentran asociadas con lípidos de membrana, y la vitamina E puede modificar

las interacciones proteína-lípidos y proteína-proteína de estas enzimas y así modular sus funciones.<sup>462</sup>

De tal manera que las funciones distintas de la actividad antioxidante de la vitamina E incluyen la participación en mecanismos de regulación transcripcional y en diversas vías de señalización celular. A continuación se describen estas dos funciones.

*a) Regulación transcripcional*

La vitamina E es capaz de regular varios genes involucrados en: la absorción/metabolismo de tocoferol (TTP, CYP3A), absorción de lípidos (receptores scavenger CD36, SR-BI, y SR – AI/II), expresión de proteínas extracelulares ( $\alpha$ -tropomiosina, colágeno- $\alpha$ 1, metaloproteinas de matriz-1 y 19, y factor de crecimiento de tejido conectivo), inflamación y adhesión celular (E-selectinas, ICAM-1, integrinas, glicoproteínas IIb, interleuquinas -2, -4 y  $-\beta$ ), señalización celular y regulación del ciclo celular (PPAR- $\gamma$ , ciclinas D1 y E, Bcl12-L1, p27 y CD95). Los mecanismos que subyacen a estos efectos pueden involucrar elementos de respuesta antioxidante (ARE) o el elemento de respuesta al factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ -RE). Además se ha identificado un factor de transcripción dependiente de tocoferol.<sup>54</sup>

*b) Transducción de señales intracelulares*

La vía en la que participa la vitamina E depende del tipo celular. En células de músculo liso vascular el  $\alpha$ -tocoferol inhibe la PKC por inhibición de la fosforilación y por lo tanto su traslocación a la membrana plasmática.<sup>449</sup> También inhibe a las 5-lipoxigenasa,<sup>125</sup> y fosfolipasa A2, y activa la proteína fosfatasa 2A y la diacilglicerol quinasa a través de mecanismos post traslacionales en diversas

células. Además, se ha sugerido que el  $\alpha$ -tocoferol puede regular la actividad Akt/PKB<sup>298</sup> que puede ser inhibida por el  $\alpha$ -tocoferol en células mastocíticas HMC1.<sup>273</sup> Todo esto ocasiona señales antiproliferativas sobre una variedad de células, resultando en la inhibición de la inflamación, de la adhesión celular, de la agregación plaquetaria y de la proliferación de celular.<sup>27,125,499</sup>

### ➤ Usos farmacológicos de la vitamina E

La eficacia de la vitamina E como antioxidante biológico parece depender de la cantidad de vitamina presente en la ubicación celular crítica y de la capacidad de los organismos para mantener su aporte y/o reciclarla. Por tanto, en presencia de otros componentes del sistema de defensa antioxidante celular, la protección antioxidante podría ser incrementada con el aumento en la ingesta de vitamina E. Niveles elevados de vitamina E pueden, por tanto, ser apropiados en casos de estrés oxidativo.

El uso de niveles altos de vitamina E en la suplementación de animales tiene valor potencialmente práctico en relación a la producción de alimento. La suplementación supranutricional de vitamina E en la dieta de aves, cerdos y vacuno ha sido efectiva para incrementar el contenido de  $\alpha$ -tocoferol en muchos tejidos, y los residuos de  $\alpha$ -tocoferol en el músculo sirven para inhibir la producción oxidativa postmortem de sustancias que alteran el sabor y el color.

Debido a que es uno de los principales antioxidantes naturales, existen numerosos estudios que han tratado de evaluar el efecto de la suplementación con vitamina E y el desarrollo de diversas patologías, incluyendo diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y síndrome metabólico en humanos. En el 2008 Devaraj y colaboradores

evaluaron el efecto de suplementación con  $\gamma$  y  $\alpha$  tocoferol a pacientes con síndrome metabólico, encontrando que la vitamina E reduce los niveles circulantes de TNF $\alpha$  y malondialdehído (MDA), sin embargo no se observaron reducciones significativas de IL-1 $\beta$ , IL-6, ni PCR.<sup>126</sup> Otros estudios señalan una relación inversa entre los niveles plasmáticos de vitamina E con el riesgo de desarrollar DMT2<sup>352,469</sup> y una mejora en la sensibilidad a la insulina.<sup>452</sup> En contraste, existen estudios de intervención en pacientes con DMT2 en los cuales la suplementación con vitamina E no tiene efectos sobre los marcadores de estrés oxidativo e inflamación.<sup>321,556,564</sup> Al parecer estas discrepancias podrían deberse a variaciones genéticas que afectan la capacidad de respuesta de los individuos a la vitamina E, a la isoforma utilizada y si, además, se suministra sola o combinada con otro antioxidante.<sup>174</sup>

### ➤ Toxicidad de la vitamina E

La vitamina E es una de las vitaminas menos tóxicas. Tanto los animales como los humanos pueden tolerar niveles muy elevados. En animales, dosis de al menos dos órdenes de magnitud sobre los requerimientos nutricionales no inducen efectos adversos.

A dosis muy altas, sin embargo, la vitamina E puede antagonizar la función de otras vitaminas liposolubles. De esta manera, animales que han recibido dosis muy elevadas han presentado mineralización ósea defectuosa, almacenamiento hepático reducido de vitamina A, y coagulopatías. En cada caso, estos signos podrían ser corregidos con incrementos en la suplementación en la dieta de la vitamina apropiada (por ejemplo, D, A y K, respectivamente), y el antagonismo observado parece estar relacionado con la absorción.



Por tanto, los problemas en la coagulación provocados por el exceso de vitamina E pueden deberse a que el  $\alpha$ -tocoferol inhibe la agregación y adhesión plaquetaria *in vitro* o a que la vitamina E interfiere en la activación de factores de coagulación dependientes de vitamina K.<sup>479</sup> Por otro lado, en estudios observacionales se ha asociado el mayor consumo de vitamina E con la disminución de la tasa de presentación de diversas enfermedades cardiovasculares.<sup>451,513</sup> No obstante, también existen estudios aleatorios controlados que no han conseguido encontrar asociación entre el consumo de vitamina E y la reducción de enfermedades cardiovasculares, e incluso reportan un incremento en el riesgo de accidente cerebrovascular y aumento de la mortalidad.<sup>361,479</sup> Un estudio reciente indica que no existe asociación entre el consumo alto y prolongado de vitamina E y el incremento del riesgo de mortalidad para todas las causas en personas sanas.<sup>107</sup>

### 2.2.2. ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

Durante la ERC el organismo es incapaz de eliminar una serie de sustancias que tienen actividad biológica. Estos compuestos se denominan toxinas urémicas. Se han descrito más de 90 toxinas con efectos negativos sobre diversos órganos y sistemas, principalmente a nivel cardiovascular.<sup>381</sup> Algunas toxinas urémicas como la indoxil sulfato y la *p*-cresilsulfato han sido asociadas con estrés oxidativo e inflamación.<sup>460</sup> Además, la dislipemia, resistencia a la insulina, y el incremento de la angiotensina II contribuyen al estado de estrés oxidativo durante la ERC. Durante la ERC, aunque no todas las enzimas antioxidantes se ven alteradas, se ha observado que el malondialdehído (MDA), un indicador de peroxidación lipídica, se encuentra incrementado.<sup>24</sup>

#### ➤ Uso de antioxidantes en la ERC

Diversos experimentos en modelos animales de enfermedad renal sugieren que los agentes antioxidantes pueden tener efectos positivos, sin embargo los datos procedentes de estudios en humanos no son concluyentes.<sup>458</sup> Existe un estudio realizado por Ramos *et al.*, en pacientes con ERC en estadio 2 y 3 que recibieron 666 UI/ día de una combinación de tocofeles más 600 mg de ácido alfa lipoico (AAL) por vía oral; tras 2 meses de tratamiento no se observaron cambios en los biomarcadores de estrés oxidativo (isoprostano F2 plasmático y proteína tiol), ni en biomarcadores de inflamación (proteína C reactiva e IL-6).<sup>438</sup> Por el contrario, Ahmdi *et al.* observaron en pacientes en hemodiálisis que la suplementación con vitamina E, sola o combinada con el AAL, redujo las concentraciones de IL-6 en

estos pacientes y mejoró el estado de mal nutrición, sugiriendo que podría ser una estrategia para prevenir las complicaciones cardiovasculares durante la ERC<sup>5</sup>.

Dentro de los fármacos con propiedades antioxidantes que han sido evaluados en modelos animales se incluyen: tempol,<sup>435</sup> N-acetil-L cisteína,<sup>574</sup> kallistatina,<sup>488</sup> dietas ricas en antioxidante,<sup>573</sup> pargilina,<sup>81</sup> y bardaxolona. Este último es un fármaco con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes que ha demostrado mejorar los indicadores de daño renal en nefropatía diabética, además de contribuir a la disminución de peso en pacientes con sobrepeso<sup>458</sup> y que actualmente se encuentra bajo investigación clínica en Fase 3 en pacientes con ERC avanzada y diabetes mellitus tipo 2.<sup>117</sup>

En modelos de ratas nefrectomizadas 5/6 destacan el uso de: AST-120,<sup>495</sup> ácidos grasos omega 3<sup>14</sup> y curcumina.<sup>504</sup>

Zhan *et al.* evaluaron en ratas con hipertensión espontánea el efecto de la suplementación prolongada con dietas ricas en antioxidantes ( $\alpha$  tocoferol, vitamina E, zinc y selenio). Los investigadores encontraron que en el grupo tratado los antioxidantes disminuyeron la hipertensión, mejoraron el estrés oxidativo y disminuyeron o revirtieron las anomalías de la expresión de enzimas antioxidantes.<sup>573</sup>

Así mismo, Zhang *et al.* pusieron de manifiesto que en ratas Dahl el estrés oxidativo es responsable de los cambios hipertensivos sistémicos y a nivel renal, además, que la suplementación con N-acetil-L-cisteína es capaz de minimizar estos cambios.<sup>574</sup>

En otro trabajo realizado por Shen *et al.*, evaluaron el efecto de la kallistatina sobre la inflamación y fibrosis inducidas por estrés oxidativo en ratas Dahl y en cultivo de células mesangiales. Los investigadores pusieron de manifiesto la capacidad de la kallistatina para reducir el daño renal, mejorar la función renal, y reducir los parámetros de estrés oxidativo e inflamación.<sup>488</sup>

Shimoishi *et al.* describieron que en ratas urémicas el tratamiento con AST- 120 durante 4 semanas logró reducir los niveles de albúmina oxidizada y de la toxina urémica indoxil sulfato. Por consiguiente, los autores concluyeron que este antioxidante fue capaz de reducir el estrés oxidativo en estas ratas.<sup>495</sup>

Quiroz *et al.* estudiaron un mimético de la enzima superóxido dismutasa, el tempol por vía oral, en modelo de uremia (ratas Nx 5/6). Tras 12 semanas de tratamiento los autores observaron que el tempol redujo los niveles plasmáticos de malondialdehído e incrementó la superóxido dismutación en el riñón, pero fue incapaz de reducir el estrés oxidativo a nivel renal o mejorar la función del tejido renal remanente.<sup>435</sup>

Durante ese mismo año An *et al.* publicaron un trabajo en el que evaluaron el efecto de la suplementación oral durante 12 semanas con ácidos grasos omega-3 en ratas con nefrectomía 5/6. Los investigadores concluyeron que la suplementación a largo plazo logra reducir o revertir la regulación de vías prooxidantes, proinflamatorias y profibróticas en el riñón remanente.<sup>14</sup>

En otro trabajo publicado en el 2011, Chaaya *et al.* observaron que la pargilina consigue reducir el daño renal asociado a isquemia y ciclosporina en un modelo de fibrosis intersticial y atrofia tubular. Los autores reportan en el trabajo que la

pargilina bloqueó la enzima monoaminidasa mitocondrial previniendo la producción a nivel renal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Como resultado, mejoró la función renal y se redujeron los niveles de marcadores de inflamación: TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .<sup>81</sup>

Soetikno *et al.* evaluaron el efecto de la curcumina por vía oral sobre marcadores de estrés oxidativo e inflamación en ratas nefretomizadas 5/6. Los autores señalan que la curcumina consiguió atenuar inflamación, fibrosis y estrés oxidativo por modulación de la vía Nrf2-keap1.<sup>504</sup>

Trabajos de investigación *in vitro* en CMLV también han demostrado que al reducir el estrés oxidativo con antioxidantes agregados al medio de cultivo se consigue reducir la transdiferenciación osteogénica de estas células.<sup>459</sup>

## 2.2.3. SÍNDROME METABÓLICO

### 2.2.3.1. Características y fisiopatología

El Síndrome Metabólico (SM) se ha convertido en los últimos años en un problema de salud pública a nivel mundial. El SM está representado por una serie de anormalidades fisiológicas y antropométricas tales como: obesidad, particularmente obesidad abdominal o visceral,<sup>124</sup> hipertensión, dislipemia, hiperglicemia, inflamación crónica subclínica, microalbuminuria,<sup>164</sup> hiperuricemia,<sup>482</sup> y estrés oxidativo.<sup>86,464</sup> Dentro de los problemas médicos asociados al SM destacan las enfermedades cardiovasculares, la diabetes mellitus tipo 2,<sup>171,196,272</sup> y el desarrollo y progresión de enfermedad renal crónica.<sup>85,293,552</sup>

La hiperglicemia, el incremento de ácidos grasos libres y la hiperinsulinemia están asociadas al incremento de las especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno (ERNs).<sup>61,142,144,148</sup> Tanto las EROs como ERNs activan el factor nuclear *kB* (NF*kB*), un factor de transcripción proinflamatorio, que desencadena una cascada de señalización cuyo resultado es la síntesis continua de especies oxidativas e inflamación crónica de bajo grado.<sup>70,140,143</sup> Bajo esta premisa, se ha postulado que el uso de antioxidantes podría contribuir a mejorar el estado proinflamatorio.<sup>174</sup>

El origen etiopatogénico común de las enfermedades asociadas al SM podría ser la resistencia a la insulina (RI).<sup>23,441</sup> No obstante, no todos los pacientes con obesidad experimentan RI y ésta se puede presentar sin que exista obesidad. En cuanto a la relación entre RI y enfermedad renal crónica, diversas investigaciones sugieren que la RI podría ser un factor de riesgo para ERC.<sup>85,293,296</sup> Tanto el

SM/obesidad, como la RI se consideran factores de riesgo para la progresión de enfermedad renal crónica.<sup>281</sup>

La RI se caracteriza por una respuesta reducida de los tejidos a la acción de la insulina. Los mecanismos que podrían originar resistencia a la insulina en la obesidad incluyen: alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos no esterificados, desregulación en la secreción de adipocinas, e infiltración de macrófagos en el tejido adiposo dando lugar a la producción de mediadores de la inflamación. Esta última es la hipótesis más aceptada sobre el vínculo entre resistencia a la insulina y síndrome metabólico.<sup>89,137,461,517</sup>

A continuación se describen los mecanismos por los cuales podría originarse RI en la obesidad.

➤ **Alteración en el metabolismo de los ácidos grasos no esterificados**

El tejido adiposo, además de almacenar energía en forma de triglicéridos mediante la síntesis o reesterificación de ácidos grasos, es el principal proveedor de ácidos grasos en situaciones de demanda de energía por otros tejidos a través de la lipólisis de los triglicéridos (TGs). La lipólisis origina la liberación al plasma de ácidos grasos libres o no esterificados (NEFAs) y es catalizada por las enzimas triacilglicerol lipasa (ATGL o desnutrina), lipasa sensible a hormonas o diacilglicerolipasa (LSH) y monoacilglicerol lipasa (MGL).

Tanto LSH como ATGL comparten similitudes en su regulación. En el tejido adiposo LSH es inducida por estimulación  $\beta$ -adrenérgica y es inhibida por la insulina. En tejido no adiposo, LSH es activada por fosforilación en respuesta a

epinefrina (activación de PKA mediada por receptores  $\beta$ -adrenérgicos) y por contracción muscular (liberación de calcio desde el retículo sarcoplasmático).

La monoacilglicerol lipasa es considerada la enzima limitante para la hidrólisis de monoglicéridos (MGs) resultantes de las vías lipolíticas intracelulares y extracelulares. La generación extracelular de MGs es el resultado de la acción de lipoproteín lipasa de células endoteliales (LPL) sobre partículas de lipoproteína asociadas a TGs. La hidrólisis intracelular de TGs por ATGL y LSH así como la hidrólisis intracelular de fosfolípidos por la fosfolipasa C (PLC) y las  $\beta$  y  $\alpha$  DG lipasas asociadas a membrana resultan en la generación de sustrato para la MGL.

Las hormonas que incrementan la velocidad de la lipólisis son: adrenalina, noradrenalina, glucagón, hormona adrenocorticotropa (ACTH), hormona estimulante de los melanocitos (MSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), hormona de crecimiento (GH) y vasopresina. Por su parte, la insulina es la única hormona que antagoniza la acción de las hormonas lipolíticas por estimulación del ingreso de glucosa en el tejido adiposo mediante la traslocación a la membrana plasmática de GLUT4 (proteína transportadora de glucosa tipo 4) y por regulación transcripcional a la baja de la expresión de ATGL y HSL. Durante la obesidad ocurre una reducción en la expresión génica de GLUT4 que está asociada directamente al desarrollo de resistencia a la insulina.<sup>178</sup>

Otro mecanismo por el cual se produce resistencia a la insulina durante la obesidad es que el tejido adiposo visceral experimenta mayor lipólisis que el tejido adiposo subcutáneo. Este aumento en la lipólisis podría deberse a que los adipocitos viscerales expresan más receptores  $\beta$ -adrenérgicos y, por consiguiente, poseen una mayor actividad de la lipasa sensible a hormonas; mientras que los



adipocitos subcutáneos presentan más receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos, receptores sobre los cuales la insulina tiene acción preferente.<sup>123,165</sup> De esta manera los adipocitos hipertrofiados durante la obesidad visceral presentan un estado hiperlipolítico que es resistente al efecto antilipolítico de la insulina.<sup>351,364</sup> Como consecuencia, se genera un flujo de NEFAs hacia el hígado (vía portal) y sistémico que puede alterar el metabolismo hepático y conllevar al aumento en la producción hepática de glucosa. El incremento en los niveles plasmáticos de NEFA puede, a su vez, estimular la secreción de insulina<sup>37</sup> e influir en la captación de glucosa a nivel celular y en metabolismo de la glucosa intracelular.<sup>131</sup> Así pues, la elevación de ácidos grasos libres, común en la obesidad, puede conducir a resistencia a la insulina y acumulación local de ácidos grasos y triglicéridos en los tejidos, la cual podría estar implicada en la disfunción celular.<sup>502</sup>

## ➤ Adipoquinas

El tejido adiposo secreta diversos péptidos con función autocrina, paracrina y endocrina. Estos péptidos, denominados adipoquinas, incluyen: leptina, adiponectina, resistina, TNF $\alpha$ , IL-6, angiotensinógeno, ACE y ATII-1R, entre otros. Las adipoquinas influyen tanto en la biología del adipocito como en la regulación de la homeostasis energética, la sensibilidad a la insulina y el metabolismo de lípidos y carbohidratos.<sup>218</sup> Cuando existen alteraciones en la función de las adipoquinas se produce acumulación de lípidos en tejido hepático o musculoesquelético, además se desarrolla lipotoxicidad y resistencia a la insulina.<sup>502</sup>

### • *Leptina*

Es una proteína de 16-kDa secretada, principalmente, por el tejido adiposo. La leptina es importante en la regulación de la grasa corporal a través de acciones sobre la ingesta de alimento y el gasto de energía. Fue identificada por primera vez por Zhang *et al.* en 1994 y es una de las moléculas más estudiadas en endocrinología.<sup>71,429,577</sup>

Los niveles de leptina se incrementan en respuesta al aumento de la deposición de energía en el tejido adiposo. Las acciones de la leptina sobre el apetito y la disipación de energía están mediadas a través de un efecto central sobre el hipotálamo donde existe una gran expresión del receptor de leptina.<sup>302,480,526</sup>

Además del hipotálamo, el receptor de leptina se expresa en diversos tejidos,<sup>526</sup> linfocitos T<sup>337</sup> y células del endotelio vascular, de tal manera que puede influir en numerosas vías fisiológicas involucradas en el control de la temperatura corporal,

regulación energética, regulación de la respuesta inmune, regulación de la función renal, reproductiva y crecimiento.<sup>34,132,133,391</sup>

En términos generales, las concentraciones plasmáticas de leptina son proporcionales a la masa grasa: elevadas cuando existe obesidad y bajas cuando hay pérdida de peso,<sup>219</sup> de tal manera que la obesidad puede generar un estado de resistencia a la leptina.<sup>18,389</sup> La hiperleptinemia resultante puede incrementar la presión arterial a través del sistema nervioso simpático y la retención renal de Na.<sup>391</sup>

La leptina puede tener acciones inmunoregulatoras y proinflamatorias identificadas en la obesidad y en diversas patologías<sup>154</sup> y ha sido asociada con el aumento del riesgo de cardiovascular.<sup>414</sup> Además, la leptina puede inducir diferenciación osteoblástica en células de musculo liso vascular al inhibir la quinasa glucógeno sintetasa (GSK)-3 $\beta$ , una enzima que forma parte de la ruta de señalización de proliferación y apoptosis celular Wnt/ $\beta$ -catenina.<sup>570</sup>

La falta de respuesta a la leptina por mutaciones en el gen que codifica el receptor de leptina, está asociada a resistencia a la insulina y obesidad, siendo estas las características de las ratas Zucker *fa/fa*<sup>182</sup> (**Figura 2.4**).

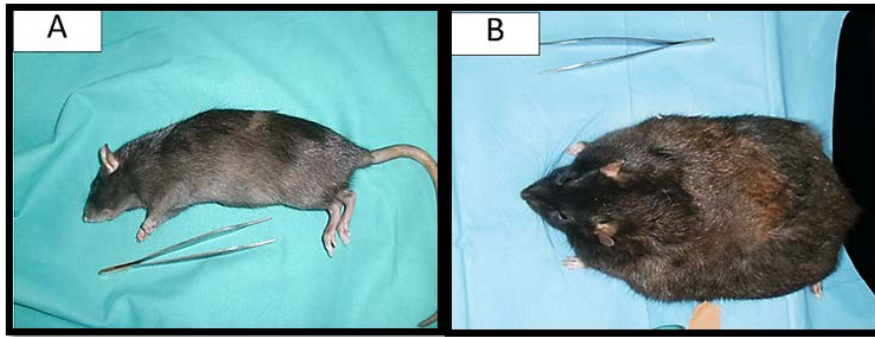


Figura 2.4. Ratas Zucker delgada (A) y obesa de la misma edad (B).

- ***Adiponectina***

La adiponectina es una proteína monomérica de 32 kDa, que sufre procesos postranscripcionales extensos y se ensambla en trímeros de bajo peso molecular, hexámeros de peso molecular medio y en complejos de alto peso molecular antes de ser secretada.<sup>555</sup> Estos últimos son los que tienen mayor actividad biológica.<sup>207</sup>

La adiponectina tiene propiedades antiinflamatorias y antiaterogénicas ya que disminuye la síntesis de moléculas de adhesión endoteliales e inhibe la respuesta inflamatoria, además está involucrada en el metabolismo de carbohidratos y lípidos ya que sensibiliza a los tejidos a la acción de la insulina.<sup>229,233,562</sup>

Otro efecto de la adiponectina es aumentar la acción de la insulina sobre los hepatocitos, favoreciendo la disminución de la producción hepática de glucosa.<sup>474</sup>

Además, estimula la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético lo cual disminuye las concentraciones plasmáticas de glucosa, ácidos grasos y triglicéridos.<sup>20,218</sup> Por consiguiente, la adiponectina mejora la señalización de insulina, parcialmente a través de la activación de la proteína quinasa activada por adenosin monofosfato (AMPK),<sup>267</sup> y potencialmente puede proteger contra la aterosclerosis.<sup>36,350</sup> Niveles plasmáticos bajos de adiponectina se correlacionan inversamente con la masa de tejido adiposo y se han asociado con varios

componentes del SM incluyendo resistencia a la insulina.<sup>218</sup> La adiponectina se produce primariamente por el tejido adiposo visceral, sin embargo si los adipocitos están sobrecargados de triglicéridos producen menos adiponectina. Por ello las personas obesas y con obesidad abdominal presentan niveles plasmáticos de adiponectina disminuidos.<sup>96</sup>

- ***Resistina***

La resistina suprime la capacidad de la insulina para estimular la entrada de la glucosa en el adipocito. La resistina se encuentra implicada en el desarrollo de resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa. Sus concentraciones plasmáticas están elevadas en modelos animales de obesidad genéticos e inducidos por dietas. Tanto la expresión génica como la secreción de esta adipoquina se ven afectadas por las tiazolidinedionas (TZD),<sup>20</sup> fármacos que aumentan la sensibilidad a la insulina por los tejidos periféricos, disminuyendo la hiperglucemia, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia.<sup>156</sup>

- ***Marcadores proinflamatorios***

Además del papel de los NEFA en el desarrollo de resistencia a la insulina en pacientes con obesidad visceral, la infiltración de macrófagos y ciertos marcadores proinflamatorios como la interleuquina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) y Proteína C reactiva podrían desempeñar un papel importante en el desarrollo de RI. Además, IL-6 y TNF $\alpha$  también reprimen la síntesis de adiponectina.<sup>218</sup> La leptina, por su parte, estimula la síntesis de TNF $\alpha$ .<sup>110</sup> TNF $\alpha$  tiene un efecto directo sobre varios procesos mediados por la insulina en el adipocito, incluyendo la homeostasis de la glucosa y el metabolismo de lípidos.<sup>20</sup> Los niveles circulantes de TNF $\alpha$  aumentan con el incremento del peso corporal. De tal manera que TNF $\alpha$  favorece la lipogénesis (captación de

ácidos grasos y reesterificación de triglicéridos) y sus niveles están asociados tanto con hiperinsulinemia como con resistencia a la insulina. A nivel molecular, TNF $\alpha$  es responsable de la disminución de la actividad tirosin quinasa del receptor de la insulina, disminución de la fosforilación del receptor de sustrato de insulina (IRS-1) y disminución de la síntesis y translocación del GLUT 4.<sup>20,517</sup> Además, TNF $\alpha$ , a pesar de reducir la expresión génica de ATGL y LSH, provoca un incremento en la actividad lipasa, lo que resulta en liberación de ácidos grasos y glicerol a partir de TGs. Esta discrepancia podría ser debida a una regulación postraslacional de ambas enzimas.

Las concentraciones en plasma de IL-6 también se relacionan con las alteraciones presentes en el SM.<sup>110</sup> IL-6 incrementa los niveles de proteína C reactiva y de moléculas de adhesión que median procesos inflamatorios, estimula la secreción de triglicéridos por el hígado y, por lo tanto, contribuye a la hipertrigliceridemia asociada a obesidad visceral. Además, de manera similar al TNF $\alpha$ , IL-6 provoca una disminución en la expresión de GLUT 4 en las células musculares con la consecuente hiperinsulinemia compensatoria.<sup>461</sup> La expresión de IL-6 por los adipocitos puede ser inducida por TNF  $\alpha$ , corticoides, leptina y catecolaminas.<sup>169</sup>

Así pues, IL-6, TNF $\alpha$  y Proteína C reactiva, junto con la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo son responsables del estado proinflamatorio observado en pacientes que sufren Síndrome Metabólico.<sup>569</sup>

El tejido adiposo también secreta otras sustancias como: óxido nítrico, inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), factor de crecimiento  $\beta$  (TGF $\beta$ ), angiotensinógeno, LPL, apolipoproteína E y proteína transportadora de ésteres de

colesterol (CETP), que podrían estar implicadas en la patogenia de enfermedades cardiovasculares.

Los trastornos asociados a la obesidad pueden aminorarse parcialmente por reducción del tejido adiposo corporal. Sin embargo, grandes disminuciones de tejido adiposo, como las observadas en pacientes con lipodistrofia, pueden también inducir complicaciones metabólicas, incluyendo resistencia a la insulina, dislipemia y esteatosis hepática.<sup>175</sup>

### 2.2.3.2. Síndrome Metabólico y Enfermedad Renal

El desarrollo inicial de deterioro en la función renal se ha vinculado a obesidad crónica, resistencia a la insulina e hipertensión, alteraciones que son comunes al SM.<sup>323,529</sup> Además, la desregulación en las adipocinas derivadas del tejido adiposo y la secreción de citoquinas proinflamatorias<sup>502</sup> pueden contribuir a la progresión del daño renal.<sup>78</sup>

Los efectos de la RI sobre la función renal pueden explicarse por el hecho que la insulina estimula la proliferación de las células mesangiales y la producción de proteínas de matriz extracelular.<sup>471</sup> También induce la síntesis de factores de crecimiento similares a insulina, endotelina y TGF $\beta$ , que favorecen la síntesis de colágeno por las células mesangiales y el desarrollo de fibrosis renal intersticial.<sup>9,471</sup>

Además, el sistema renina-angiotensina presenta conexiones con la resistencia a la insulina. Estas incluyen la estimulación por la insulina de la síntesis hepática de angiotensinógeno, y un efecto sinérgico entre la insulina y el sistema renina-angiotensina sobre las células mesangiales y la contracción vascular a nivel del parénquima renal.<sup>416, 471</sup>

Finalmente, la hiperglicemia, los productos avanzados de la glicación y la dislipemia, comunes en la RI, pueden inducir estrés oxidativo y nefrotoxicidad.<sup>79,148,559</sup>



➤ **Alteraciones metabólicas durante la ERC**

Una vez ocurrido el daño renal, se desarrollan una serie de trastornos funcionales y metabólicos tales como: acumulación de toxinas urémicas (uremia), acidosis metabólica, anormalidades en el metabolismo óseo y mineral, metabolismo de lípidos, aminoácidos y homocisteína; alteraciones en el eje hormona del crecimiento-factor de crecimiento insuliniforme, en el sistema renina-angiotensina-aldosterona, adipoquinas, ghrelina, vitamina D, corticoides, resistencia a la insulina, estados inflamatorio crónico y estrés oxidativo.<sup>324,367,498,502</sup> Además, diversos factores inducen la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) a nivel renal y sistémico; entre estos se encuentran las citoquinas inflamatorias, receptores tipo Toll, angiotensina II, bradiquinina, ácido araquidónico, trombina y factores de crecimiento. Las enzimas NADPH oxidasas o enzimas Nox, son claves en la producción de EROs en respuesta a estos estímulos.<sup>419,558</sup>

Muchos factores como dislipemia, diabetes e hipertensión, los cuales coexisten con en la ERC también son considerados factores de riesgo cardiovasculares. En diversos estudios se ha demostrado la presencia de un síndrome cardio-renal, en el cual la disfunción renal y cardiovascular puede amplificar el fallo progresivo en ambos sistemas.<sup>271</sup> Por otro lado, es ampliamente conocida la asociación entre marcadores de inflamación, estrés oxidativo e indicadores renales y cardiovasculares en la ERC.<sup>68,130</sup> En este sentido, se ha descrito una posible asociación entre los factores de crecimiento fibroblásticos 23 y 21 con la hipertrofia ventricular durante la ERC.<sup>152,317</sup>

➤ **Papel de las toxinas urémicas**

Se ha planteado que las toxinas urémicas pueden inhibir la degradación de la insulina en tejido no renal: a nivel muscular y sobre todo en el hígado, y prolongar así su vida media contribuyendo a la hiperinsulinemia observada en pacientes con ERC.<sup>29,377</sup> Se considera que el músculo desempeña un rol central en la RI en estos pacientes, ya es el principal tejido de utilización de insulina y las vías por las que la insulina ejerce sus efectos metabólicos están alteradas durante la uremia.<sup>29</sup>

➤ **Papel del Sistema renina-angiotensina aldosterona**

El sistema renina-angiotensina aldosterona tiene un papel importante en la regulación de la presión sanguínea y la homeostasis de los fluidos corporales y se encuentra alterado en la ERC.<sup>278,299,508</sup> La angiotensina II es el principal péptido efector en este sistema y posee acciones hipertensivas potentes. Además, ha sido implicada en el remodelado vascular y en la patogenia de afecciones cardíacas y renales. La angiotensina II contribuye a la aterogénesis a través del incremento del estrés oxidativo por aumentos de las EROs y por la expresión de genes proinflamatorios a través de la vía del factor nuclear kappa beta (NFkb).<sup>111,579</sup> Por su parte, la aldosterona tiene acciones “genómicas” y “no genómicas” a través del receptor de mineralocorticoides citosólico y funciona de manera independiente, o junto con la señalización de angiotensina II, promoviendo la producción de EROs y fibrosis tisular a través del receptor del factor de crecimiento epidérmico en tejido cardiovascular.<sup>75,299,508</sup> Además, la angiotensina II puede contribuir a la resistencia a la insulina a nivel muscular de manera indirecta al promover estrés oxidativo y aumento de citoquinas proinflamatorias.<sup>29</sup>

➤ **Papel de la respuesta de fase aguda y citoquinas proinflamatorias**

Al igual que en otras enfermedades crónicas, durante el desarrollo de la ERC ocurren respuestas locales y sistémicas de estrés inmunológico y activación de una respuesta de fase aguda.<sup>88,197,247</sup> Este estado proinflamatorio mediado por citoquinas se caracteriza por una disminución del anabolismo músculo-esquelético y aumento del catabolismo periférico de proteínas para suplir las necesidades crecientes de aminoácidos para el hígado, necesarios en la producción de proteína de fase agudas y reactantes (APRs), glutatión y glucosa.<sup>502</sup>

Diversas citoquinas específicas que poseen acciones proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ ) aumentan durante la ERC y tienen efecto sobre el apetito (induciendo anorexia), el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, favoreciendo la resistencia a la insulina, lipólisis, reducción en el catabolismo de triglicéridos<sup>88</sup> y proteólisis.<sup>197,247</sup> Además, las citoquinas proinflamatorias incrementan la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y ellas mismas están reguladas por retroalimentación positiva por la vía del factor nuclear kappa beta (NF $\kappa$  $\beta$ ).<sup>340</sup> Por tanto, el daño celular causado por respuesta proinflamatoria estimula el ciclo de producción de EROs y además activa la producción de más citoquinas, lo que permite que se genere un círculo vicioso con activación crónica de los procesos inflamatorios celulares.<sup>502</sup>

La relación positiva entre el incremento en el tejido adiposo y marcadores de inflamación crónica ha sido reportada por varios estudios<sup>77,187,339,539</sup> y explicada previamente. Se ha descrito que la reducción del peso corporal en pacientes en hemodiálisis disminuye los marcadores de inflamación.<sup>77</sup>

Durante la ERC, el músculo esquelético contribuye al aumento de citoquinas proinflamatorias produciendo tanto  $\text{TNF}\alpha$ , como IL-6 (mioquinas).<sup>159, 515</sup>

➤ **Papel de las adipoquinas en la Enfermedad Renal Crónica**

• ***Leptina***

Durante el desarrollo inicial de la ERC puede haber antecedentes de obesidad, niveles elevados de leptina y resistencia a la leptina. Con el progreso de la enfermedad, diversos estudios han propuesto que la hiperleptinemia que se observa en humanos es debida a una disminución en el aclaramiento renal de leptina y que está asociada a la concomitante inflamación y depleción de la masa magra corporal.<sup>341</sup>

• ***Adiponectina***

Condiciones de hipoadiponectinemia están asociadas con resistencia a la insulina, obesidad, estadios tempranos de diabetes mellitus tipo 2 y dislipemia. También se ha reportado que los niveles elevados de adiponectina en hombres con diabetes tipo 2 reducen el riesgo de disfunción renal.<sup>316</sup> La adiponectina es considerada un modulador de la sensibilidad a la insulina<sup>33</sup> y de la dislipidemia.<sup>478</sup> También se le han atribuido propiedades antiinflamatorias ya que las concentraciones de adiponectina están inversamente relacionadas con fibrinógeno, molécula de adhesión-1, selectina E y proteína C reactiva, todos ellos marcadores de inflamación.<sup>342,490</sup> Sin embargo, durante la ERC, los efectos de la adiponectina son paradójicos ya que se encuentra regulada al alza.<sup>267,489,563</sup> Estos niveles elevados de adiponectina probablemente sean el producto de un estado de resistencia a la adiponectina y alteraciones en el aclaramiento renal.<sup>201</sup>

- **Factores de Crecimiento FGF21 y FGF23**

FGF23 es un factor de crecimiento que junto con su correceptor Klotho actúa sobre las glándulas paratiroides y el riñón para regular el balance de fósforo.<sup>183,544</sup> Durante la ERC los niveles circulantes de FGF23 están elevados, mientras que ocurre una disminución de la expresión de Klotho. Niveles elevados de FGF23 se han asociado con hipertrofia ventricular izquierda en pacientes con ERC<sup>202,363</sup> y se ha confirmado experimentalmente que la hipertrofia cardiaca ocurre sin la mediación de Klotho.<sup>152</sup> Por su parte, FGF21 es una hormona de origen hepático que regula el metabolismo de carbohidratos y lípidos estimulando el ingreso de glucosa no dependiente de insulina por inducción del receptor GLUT1 en adipocitos.<sup>276</sup> A nivel hepático FGF21 interviene en la señalización en el sistema PPAR $\alpha$  (receptor activado por el proliferador de peroxisomas alfa) y en el de genes regulados por el factor de transcripción FoxO1 (forkhead box O1), aumentando la expresión de genes necesarios para la codificación de enzimas que participan en la oxidación de ácidos grasos, cetogénesis, y gluconeogénesis. Estas enzimas incluyen la glucosa-6-fosfatasa, fosfofenol piruvato carboxiquinasa, 3-hidroxiurirato deshidrogenasa tipo 1, y carnitina palmitoiltransferasa 1- $\alpha$ .<sup>28,160</sup> Durante la uremia, se reportado que los niveles de FGF21 se incrementan a medida que la ERC progresa.<sup>317</sup>

## 2.3. CALCIFICACIÓN VASCULAR

La calcificación vascular (CV) es uno de los principales factores de riesgo de mortalidad cardiovascular, particularmente en pacientes con enfermedad renal crónica<sup>41,186,198,328</sup> y diabetes.<sup>442</sup>

La enfermedad renal crónica (ERC) es un problema de salud importante y frecuente en seres humanos y animales.<sup>31,97,307,309,310,422,477</sup> La arteriosclerosis y la aterosclerosis son características comunes en pacientes con ERC.<sup>198,163</sup> Las calcificaciones vasculares (CV) contribuyen en gran medida a elevar el riesgo de mortalidad cardiovascular asociada a ERC.<sup>43,162</sup> En pacientes urémicos, las CV están causadas por un desequilibrio en el metabolismo mineral, incluyendo hiperfosfatemia, hipercalcemia y niveles anormales de PTH.<sup>99</sup>

### 2.3.1. CLASIFICACIÓN DE CALCIFICACIÓN VASCULAR

La CV puede desarrollarse en dos capas distintas de las arterias: la túnica íntima y la túnica media. La calcificación de íntima ocurre en estados avanzados de lesión aterosclerótica, mientras que la calcificación de media (arterioesclerosis o esclerosis de Mönckeberg) se desarrolla independiente de la aterosclerosis y está asociada principalmente con envejecimiento, diabetes y ERC. La calcificación de la túnica media se considera que tiene un desarrollo análogo a la osteogénesis. Actualmente se piensa que podría involucrar formación de hueso endocondral, debido a que se ha reportado expresión del factor de transcripción osteogénico *Cbfa1* en la túnica media arterial calcificada de pacientes urémicos y animales.<sup>371,372,399,402</sup> Los datos acumulados sugieren que las CMLV se

transdiferencian a células osteogénicas, producen matriz mineralizada, y expresan proteínas osteogénicas.<sup>69,399,516</sup>

### ➤ **Calcificación de íntima arterial**

La calcificación aterosclerótica descrita por Virchow<sup>550</sup> es una patología cardiovascular que consiste en la formación de una placa que provoca deformación excéntrica de la luz del vaso.<sup>514</sup> El remodelado exterior de la lesión posee: una cubierta fibrosa, macrófagos cargados de colesterol, depósitos de lipoproteínas, infiltración de células inflamatorias y elastinólisis localizada. Las células de músculo liso vascular vecinas elaboran cuerpos apoptóticos yuxtapuestos mineralizantes y vesículas de matriz mineralizante. También se observa una cápsula fibrosa con gránulos de calcificación. Estas lesiones aparentemente son precursoras de la ruptura de placas en síndromes coronarios agudos.<sup>64,557</sup>

### ➤ **Calcificación de media arterial**

La calcificación de la media arterial (también llamada esclerosis calcificante media de Mönckeberg) es particularmente común en arteriosclerosis asociada con diabetes mellitus tipo II (DMT2).<sup>147,305,398,506</sup> Este tipo de calcificación vascular es un proceso concéntrico que ocurre en la túnica media y está asociada con biomineralización a lo largo de fibras de elastina de la pared del vaso.<sup>308,536</sup> Tradicionalmente se creía que la calcificación de la media no tenía consecuencias clínicas.<sup>453</sup> Actualmente se sabe que la calcificación arterial de la media impide el efecto Winkessel en los vasos sanguíneos, mecanismo necesario para amortiguar las fluctuaciones de la presión arterial,<sup>405</sup> además la calcificación de la media es el

mejor predictor de riesgo de amputación de extremidad inferior en pacientes con DMT2.<sup>305</sup> Igual que la osificación membranosa del hueso craneofacial, en la cual la biomineralización mediada por osteoblastos ocurre en una matriz de colágeno tipo I sin formación cartilaginosa previa,<sup>3</sup> la calcificación arterial de la media no incluye procesos de condrogénesis durante el inicio de la enfermedad.<sup>6</sup>

Se han desarrollado estudios que han permitido comprender la fisiopatología de la enfermedad, tanto su génesis como su progresión. Estos estudios se basan en modelos de enfermedad preclínica.<sup>487,535</sup> Cuando se alimentaron con dietas altas en grasa a ratones machos *Ldlr*<sup>-/-</sup> éstos desarrollaron obesidad, DMT2 y dislipemia junto con severa calcificación de media arterial y subsecuente calcificación aterosclerótica. En las primeras fases de la enfermedad, *Msx2* y *Msx1* arteriales (genes que codifican factores de transcripción osteoblásticos homeodominantes esenciales para la formación de hueso membranoso en el cráneo),<sup>472</sup> se regulan al alza en las aortas de estos animales. Además existen estudios *in vitro*, realizados en células vasculares calcificantes (CVCs), en los cuales se ha demostrado que los LDL mínimamente oxidados son capaces de inducir mayor expresión de fosfatasa alcalina y colágeno tipo I, indicadores de actividad osteoblástica y formación ósea.<sup>415</sup>

De manera similar a lo que sucede en la calcificación aterosclerótica, la inflamación es también la clave en la calcificación arterial media.<sup>487</sup> En este sentido se ha observado que durante la diabetes mellitus existe una producción elevada de TNF $\alpha$  por monocitos y macrófagos.<sup>532,575</sup> Estas células promueven calcificación al inducir *Msx-2* e intervenir en la señalización de la ruta de Wnt.<sup>6</sup> Además, BMP-2 (proteína morfogénica ósea) se secreta por las células endoteliales en respuesta a la inflamación.<sup>103</sup> BMP-2 y los genes *Msx*, regulados

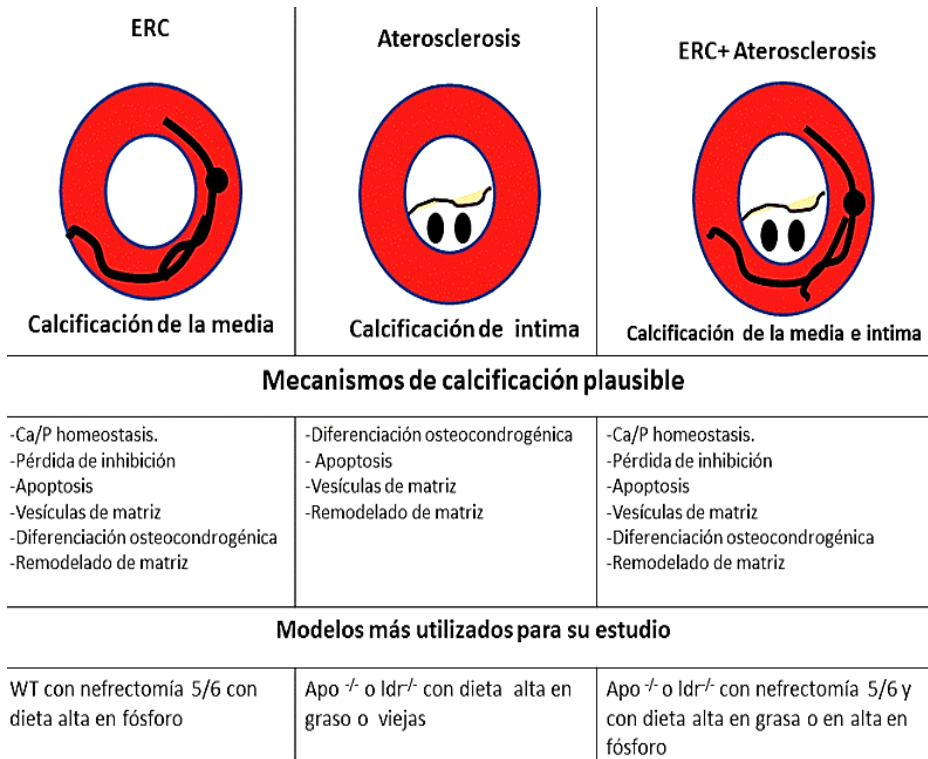


por Wnt, inducen diferenciación osteogénica de CMLV y mineralización de la matriz de colágeno en la pared arterial.<sup>485,486</sup> Asimismo, el medio paracrino activa programas reguladores de genes osteogénicos en células mesenquimales multipotenciales murales tales como CVCs y miofibroblastos de adventicia.<sup>47,74</sup>

Se ha propuesto que la adventicia tiene un rol clave en el desarrollo de calcificación asociada a diabetes ya que este tipo de calcificación es un proceso totalmente distinto del proceso de la calcificación excéntrica aterosclerótica organizada por depósitos de oxilípidos en la subíntima. En la arterioesclerosis diabética se origina neoangiogénesis desde el *vasa vasorum* en la unión adventicia-media inflamada circunferencialmente, se regula al alza la señalización mural de BMP-Wnt, y se producen miofibroblastos de adventicia adicionales que pueden ser alojados y/o programados para producir fenotipos osteogénicos y fibrogénicos.<sup>220,412</sup> La implicación de la adventicia también la han demostrado otros investigadores como Buján *et al.*, quienes reportaron que la extirpación quirúrgica de la adventicia arterial es capaz de reducir la calcificación de media en modelos de enfermedad preclínica.<sup>63</sup>

Diversos estudios sustentan la hipótesis de que tanto la calcificación aterosclerótica como la calcificación de la media se originan, en gran parte, por células osteogénicas derivadas de células vasculares residentes.<sup>121</sup> Sin embargo, estudios recientes han identificado una célula circulante CD45<sup>+</sup> que es un osteoprogenitor osteocalcina positivo (COP), que elabora proteínas BMP y se localiza en sitios de daño vascular.<sup>134</sup> Osteoprogenitores circulantes pueden también participar en procesos de mineralización vascular en DMT2<sup>149</sup> y dar lugar a osificación vascular ectópica.<sup>418</sup>

La **Figura 2.5** esquematiza los diferentes tipos de calcificación vascular



**Fig. 2.5: Representación de la calcificación vascular en humanos.** Posibles mecanismos fisiopatológicos implicados y modelos animales donde se estudian con mayor frecuencia. Rogers *et al.*, 2013.<sup>457</sup>

### 2.3.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

En el año 2005, el grupo KGIDO (International Group on Kidney Disease: Improving Global Outcomes) codificó la entidad clínica CKD-MBD, como trastorno mineral y óseo que acompaña a la calcificación vascular en la enfermedad renal crónica.<sup>231,374</sup> En la CKD-MBD, el vínculo entre enfermedad ósea y enfermedad vascular surge de perturbaciones primarias en la homeostasis del calcio y del fósforo. La diabetes mellitus y la hipertensión, dos enfermedades que independientemente promueven calcificación arteroesclerótica, son responsables de aproximadamente el 60% de pacientes con ERC que requieren terapia de reemplazo renal; sin embargo, la gran mayoría de los pacientes con CKD por cualquier causa experimentan un incremento en la mortalidad relacionada con trastornos cardiovasculares y vasculopatía calcificante.<sup>163,329,330</sup> Mientras que antecedentes de diabetes mellitus, hipertensión, dislipidemia y síndrome metabólico contribuyen a la arterioesclerosis,<sup>253</sup> la hiperfosfatemia, la expresión reducida de Klotho y las alteraciones en los mecanismos de defensa frente a la calcificación en los tejidos blandos son la llave de los componentes de fisiopatología del CKD-MBD.<sup>365,368</sup>

La calcificación vascular era considerada, en el pasado, un proceso pasivo de muerte celular; en la actualidad se considera que la calcificación vascular es una forma de biomineralización de matriz extracelular regulada activamente.<sup>121</sup> Se han identificado diversos factores, perturbaciones en el metabolismo lipídico, inflamación y diferenciación osteofibrogénica, que contribuyen al desarrollo de calcificaciones vasculares.<sup>550</sup>

También se han descrito varias subpoblaciones de células en la pared vascular implicadas en el proceso de calcificación: miofibroblastos, células endoteliales, células de músculo liso vascular y células vasculares calcificantes.

➤ **Mecanismos implicados en la calcificación vascular**

A partir de estudios en CMLV se ha planteado que el proceso de calcificación vascular se inicia por los siguientes procesos:

- 1. Por formación de microvesículas:** Estas microvesículas contienen proteínas de matriz extracelular que es secretada mediante exóstosis. Una vez secretada en la matriz extracelular, se deposita mineral sobre estas proteínas de tal manera que actúan como un foco calcificante a partir del cual se desarrollará la calcificación.<sup>551</sup>
- 2. Por apoptosis de células de la pared vascular:** En este caso las células muertas actuarían como un foco a partir del cual se depositaría mineral.<sup>431</sup>
- 3. Por inducción de transdiferenciación osteogénica:** Mecanismos diversos inducirían en las CMLV un cambio fenotípico hacia un linaje osteocondrogénico y la expresión de marcadores osteoblásticos como CBF $\alpha$ -1 y RANKL (Ligando del factor  $\kappa\beta$ ).

En cuanto a los mecanismos desencadenantes, actualmente se sabe que van más allá de la formación de depósitos de Ca y P por mecanismos pasivos debido los desequilibrios en el metabolismo mineral (particularmente la hiperfosfatemia) que se presenta en la ERC.

Como se mencionó anteriormente, está ampliamente aceptado que en el desarrollo de calcificaciones extraesqueléticas también participan mecanismos activos. Estos mecanismos activos se desencadenan cuando fallan los factores protectores contra calcificación o cuando se incrementan aquellos factores que son inductores.

Estos mecanismos activos incluyen: la producción de BMP-2 por las células endoteliales en respuesta a diversos estímulos como niveles altos de fósforo, inflamación, estrés oxidativo, etc. BMP-2 induce la producción de vesículas de matriz a nivel de la túnica media y la transformación osteocondrogénica de células residentes de la pared vascular, en particular células de músculo liso vascular.<sup>510</sup> Un trabajo reciente logró demostrar *in vivo*, que células mesenquimales estromales también participan en el proceso de calcificación vascular.<sup>289</sup> Este trabajo es relevante ya que una de las grandes incógnitas referentes a las CV es elucidar los mecanismos mediante los cuales células madres mesenquimales, residentes de la pared vascular o circulantes, contribuyen a la CV.

El papel del endotelio en la inducción de CV también es otra de las cuestiones sujeta a investigación.<sup>93</sup> Al respecto, Zeabboudj *et al.* lograron demostrar la implicación de las células endoteliales en la producción de BMP-2 y la movilización de esta proteína hacia la túnica media de los vasos sanguíneos.<sup>571,572</sup> Trabajos más recientes han contribuido a respaldar la hipótesis de la implicación activa del endotelio en el desarrollo de CV. Uno de estos trabajos es el publicado por Buendía *et al.* Estos investigadores observaron que al estimular células endoteliales con TNF $\alpha$  se inducía liberación de micropartículas endoteliales. Estas micropartículas contenían BMP-2 y fueron capaces de inducir diferenciación osteogénica y calcificación en CMLV. Además, demostraron que micropartículas endoteliales de pacientes con ERC también expresaban BMP-2 y que al bloquear

el BMP-2 con ARNm de interferencia se inhibió la calcificación de CMLV.<sup>62</sup> En otro estudio reciente se pone de manifiesto que las células endoteliales progenitoras, consideradas pericitos, pueden participar directamente en los procesos de CV a través de la expresión de osteocalcina.<sup>507</sup>

Los segmentos calcificados expresan fosfatasa alcalina,<sup>523,524</sup> una isoenzima no específica de este tejido necesaria para la mineralización ósea.<sup>223</sup> Además, BMP-2 también se expresa en placas ateroscleróticas de vasos humanos.<sup>46</sup>

Los oxilípidos derivados de LDL oxidado (oxiLDL) se han identificado como potentes inductores endoteliales de BMP-2,<sup>93,576</sup> así como de TNF $\alpha$ <sup>532</sup> y otras señales derivadas de macrófagos que conducen a la mineralización *in vitro* e *in vivo*.<sup>200, 532</sup> Por otro lado, se ha demostrado que la inhibición de la señalización de BMP-2 arterial en ratones ateroscleróticos con MGP reduce el calcio vascular y el tamaño de la lesión.<sup>566</sup>

### ➤ Factores que participan en el desarrollo de calcificación vascular

En términos generales, el proceso de mineralización vascular y extraesquelética ocurre cuando los factores inductores de calcificación sobrepasan a los mecanismos fisiológicos responsables de evitar y proteger contra la diferenciación de las células de músculo liso vascular y el depósito mineral.

A continuación se describirán los factores relacionados con la inducción y con la inhibición de calcificación.

- ***Factores inductores***

Estos factores pueden actuar directamente induciendo cambios fenotípicos o indirectamente al provocar apoptosis, incrementar el producto calcio x fósforo, etc. A continuación se describen los principales factores inductores de calcificación:

*a) Calcio, Fósforo y producto Ca x P*

Actualmente está ampliamente aceptado que el producto Ca x P es el responsable del inicio de la calcificación vascular, induciendo la precipitación de sales minerales. Particularmente relevante para los pacientes con enfermedad renal son aquellos mecanismos relacionados con incremento en el fósforo. El fósforo elevado está asociado con incremento en los índices de calcificación, incremento en el riesgo de eventos cardiovasculares y en todas las causas de mortalidad.

Durante la hiperfosfatemia, el P en sangre puede formar sales con el Ca. Estas sales pueden precipitar sobre cuerpos apoptóticos o sobre las vesículas de matriz extracelular, originando focos de calcificación, aunque también en condiciones de hipercalcemia se pueden favorecer los depósitos minerales. No obstante, se ha demostrado que el fósforo tiene un efecto más importante sobre la calcificación que el Ca.<sup>325</sup>

Los niveles elevados de fósforo inducen calcificación en CMLV en un modo dosis y tiempo dependiente. El fósforo entra en las células de musculo liso vascular mediante el cotransportador tipo III de fósforo dependiente de sodio Pit-1 y Pit-2. Las CMLV humanas expresan principalmente Pit-1.<sup>181</sup>

El fósforo también induce cambios fenotípicos de las células de músculo liso. Estos se caracterizan por la elaboración de un repertorio señales osteogénicas, incluyendo incremento en la expresión de BMP-2 y regulación al alza de Runx2/Cbfa1 y Msx2 mediante la ruta de señalización de Pit-1.<sup>510, 549</sup> BMP-2, a su vez, mejora el ingreso de P y la programación osteogénica de las CMLV creando un círculo vicioso.<sup>314</sup> Por consiguiente, la hiperfosfatemia puede reprogramar el fenotipo de las CMLV para que mantengan los depósitos minerales osteogénicos.<sup>509</sup> El proceso de cambio fenotípico también incluye el incremento en la expresión de osteocalcina y fosfatasa alcalina; al tiempo que se pierde la expresión de genes miogénicos.<sup>180</sup> En este sentido, en diversos estudios *in vitro* se ha comprobado que al bloquear la entrada de fósforo a la célula no se produce cambio fenotípico de las CMLV.<sup>312,313</sup>

En el 2010, Montes de Oca *et al.*, demostraron que el cambio fenotípico de las CMLV a linaje osteocondrogénico inducido por fósforo está mediado por la metilación del promotor de SM-22 $\alpha$ .<sup>379</sup> En otro estudio reciente se comprobó que la transformación osteogénica de células madres estromales en presencia de alto fósforo puede ser inhibida por TGF $\beta$ , a través del bloqueo de la traslocación nuclear de Smad 1/5/8, y evitar la activación de la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina.<sup>199</sup>

En experimentos *ex vivo*, anillos arteriales humanos de pacientes en predialisis y diálisis, pero no de sujetos control, presentaron acumulación significativa de calcio por exposición prolongada a niveles elevados de calcio y/o fósforo, sugiriendo que el ambiente urémico compromete los mecanismos inhibidores de calcificación en la pared de los vasos sanguíneos.<sup>497</sup>



Estudios *in vivo* también han demostrado el papel del fósforo en la calcificación vascular.<sup>332,333</sup>

Otro mecanismo responsable de la mineralización inducida por fósforo es que la hiperfosfatemia sostenida induce apoptosis de las CMLV.<sup>496</sup> El depósito mineral resultante es una calcificación de la media que casi siempre se superpone a antecedentes de aterosclerosis y calcificación de la media originada por diabetes mellitus, dislipidemia y otras causas.

Al igual que la hiperfosfatemia, la hipercalcemia incrementa la producción de vesículas de matriz en las CMLV. En condiciones de calcio y fósforo elevado, las células de músculo liso vascular sufren apoptosis y también el proceso de transdiferenciación fenotípica descrito anteriormente. Las CMLV liberan vesículas que contienen cristales preformados de apatita. Estas vesículas, que también pueden ser cuerpos apoptóticos de células dañadas, son ricas en fosfatidiserina y anexina y son similares a las vesículas mineralizantes de los condrocitos.<sup>445</sup> Se ha demostrado que las CMLV producen estas vesículas como un mecanismo para eliminar complejos intracelulares de calciproteínas.<sup>445,446</sup> Tal y como se mencionó en apartados anteriores, las vesículas y los cuerpos apoptóticos pueden servir como núcleo y propagar la mineralización de matriz extracelular.<sup>446</sup>

La Figura 2.5 representa los mecanismos a través de los cuales el Ca y P inducen CV en CMLV

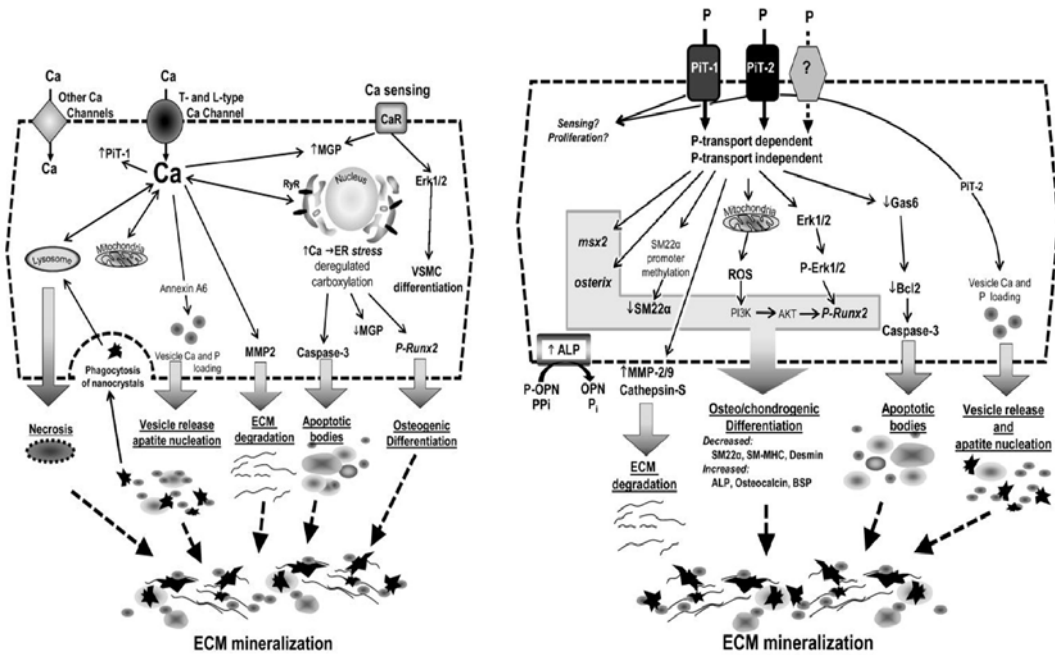


Figura 2.5. Rol del Ca y P en la calcificación de CMLV. Shanahan *et al.*, 2011<sup>484</sup>

### b) Análogos de vitamina D

La deficiencia de Vitamina D está asociada con enfermedad arterial periférica<sup>150</sup> y con otras enfermedades cardiovasculares, incluyendo la insuficiencia cardíaca congestiva,<sup>53</sup> y puede inhibir los depósitos de colesterol en macrófagos y la activación de macrófagos en pacientes con diabetes mellitus, mecanismos relacionados con el desarrollo de calcificaciones.<sup>407</sup> En la ERC la deficiencia de vitamina D ocasiona hiperparatiroidismo secundario. Por otra parte, las dosificaciones excesivas de 1,25- dihidroxivitamina D pueden inducir enfermedad de bajo remodelado óseo (enfermedad ósea adinámica), hipotiroidismo e incrementar calcificaciones vasculares. En este sentido se ha demostrado que

pacientes con ERC que tienen calcificación arterial extensa presentan índices de formación ósea y niveles de PTH reducidos.<sup>330</sup>

La intoxicación con vitamina D induce calcificación vascular extensa y nefrocalcinosis, y los roedores con intoxicación por vitamina D son utilizados comúnmente como modelos de calcificación vascular.<sup>240,427</sup> Además, existen trabajos en los que se sugiere que la incorporación de calcitriol al medio de cultivo de células de musculo liso vascular bovinas induce calcificación por inhibición de los mecanismos protectores locales de la calcificación como el PTHrP, y un aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina y la osteopontina.<sup>262</sup> También el calcitriol puede inducir transformación a linaje osteoblástico en cultivos celulares de CMLV.

#### c) *Dislipemia*

Como se indicó en apartados anteriores, la dislipemia, principalmente la hiperlipemia, constituye uno de los trastornos metabólicos que se presentan durante la ERC. Normalmente la hiperlipemia provoca aterosclerosis. La hiperlipemia puede favorecer el desarrollo de CV al promover inflamación de la pared vascular tal y como se mencionó con anterioridad, La hiperlipemia también podría facilitar la acumulación de cuerpos apoptóticos en la pared vascular, que servirían como nidos a partir de los cuales ocurriría mineralización.<sup>430</sup>

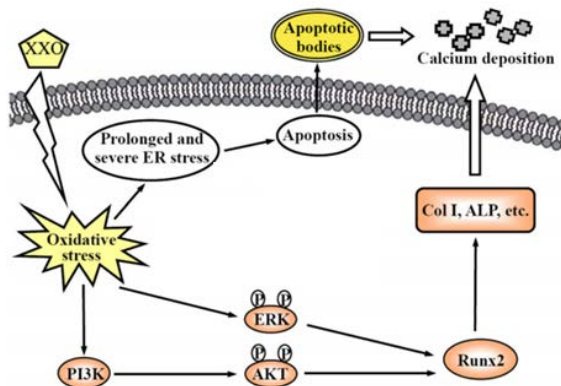
#### d) *Resistencia a la Insulina, Síndrome Metabólico y Estrés Oxidativo*

Los efectos de la resistencia a la insulina se han abordado ampliamente en apartados previos. Un trabajo publicado recientemente por Garland *et al.*, reporta una asociación entre niveles de FGF23 y resistencia a la insulina en pacientes con ERC en estados 3-4. Lo interesante de este trabajo es que además de la asociación

con el FGF23, la RI también se asoció con un aumento en la calcificación de arteria coronaria, sin diferencias en los niveles de P, PTH, fetuína u osteoprotegerina entre los pacientes con RI leve o severa.<sup>178</sup>

En otro estudio reciente se encontró asociación entre síndrome metabólico y arteriosclerosis en diversos órganos, incluyendo vasos intracraneales, arteria carótida externa, arterias coronarias y aorta abdominal.<sup>408</sup>

Los mecanismos mediante los cuales la RI y el SM inducen estrés oxidativo han sido descritos en apartados previos. Existen estudios *in vitro* y en animales en los que el uso de antioxidantes previene la calcificación inducida por fósforo.<sup>205</sup> En un trabajo reciente se plantea que el uso de un antioxidante, el dimetil fumarato, atenúa la calcificación inducida por fósforo elevado o altas dosis de vitamina D, a través de la activación de la vía antioxidante Nrf2 (factor relacionado con NF-E<sub>2</sub>).<sup>205</sup> En apartados anteriores se han citado algunos experimentos con antioxidantes que han conseguido reducir la CV en modelos animales y en cultivos celulares. La vía mediante la cual el estrés oxidativo provoca transdiferenciación de CMLV a células osteoblásticas está sujeta a investigación. Uno de los mecanismos descritos es que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede modular Runx2 por la vía de señalización de la PI3K/Akt.<sup>67,319,366</sup> (**Figura 2.6**). Otro estudio demostró que para que ocurra la mineralización de las CMLV inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es necesaria una señal extracelular regulada por quinasas (ERK).<sup>320</sup>



**Figura 2.6.** Mecanismo mediante el cual el estrés oxidativo puede inducir CV en CMLV. Adaptado de Liu *et al.*, 2014.<sup>319</sup>

#### e) Inflamación

Diversos mediadores de la inflamación que se encuentran incrementados durante la uremia pueden contribuir al desarrollo de CV. Estos mediadores incluyen: la proteína C reactiva, la IL-6 y el TNF $\alpha$ . Los mecanismos a través de los cuales inducen calcificación son: la estimulación de la transformación fenotípica de CMLV a un fenotipo de linaje osteocondrocítico y la inducción de apoptosis en las células de músculo liso.<sup>44,540</sup>

Tras el incremento masivo de matriz mineral extracelular se reclutan células de linaje monocítico y macrófagos a las zonas de mineralización.<sup>386</sup> Como consecuencia, los depósitos de calcio-fósforo inducen respuesta inmune innata por los monocitos o macrófagos,<sup>48</sup> incrementan la producción de TNF $\alpha$ <sup>284</sup> y desencadenan la activación de las señalizaciones celulares de BMP-2, MSX, Wnt y Runx2.<sup>200,284,549</sup>

También es importante destacar que ciertas interleuquinas, que son mediadores de inflamación, no tienen efectos favorecedores sobre la CV. Al contrario se ha demostrado que IL-1 $\beta$  e IL-8 median la fagocitosis, por macrófagos-monocitos, de los cristales de mineral depositado en los tejidos extraesqueléticos favoreciendo eliminación de estos depósitos.<sup>386</sup>

f) *Fosfatasa alcalina*

Esta enzima es necesaria para la formación de la hidroxiapatita y se encuentra relacionada estrechamente con la pirofosfatasa y el estado ácido-base. La actividad de esta enzima está disminuida durante la acidemia. Además, estudios *in vitro* han demostrado que la adición de esta enzima al medio de cultivo aumentó considerablemente la calcificación de CMLV.<sup>325</sup>

g) *FGF23*

El FGF23 es un regulador del metabolismo del fósforo, responsable del aclaramiento renal de este mineral. Las acciones del FGF23 se han descrito en apartados anteriores. Cabe señalar que en pacientes en diálisis el FGF23 está correlacionado con la calcificación de aorta.<sup>246</sup>

h) *Proteínas morfogénicas del hueso (BMPs)*

Las BMPs son un grupo de proteínas que tienen distintas funciones en el hueso y en la pared vascular y se han relacionado con el desarrollo de CV. La proteína más destacada de este grupo es BMP-2. Como se mencionó anteriormente, BMP-2 es secretada por el endotelio y tiene capacidad para inducir transformación fenotípica de las CMLV a osteoblastos. Se ha planteado que la acción de BMP-2 sobre las células de músculo liso vascular se puede inhibir principalmente por MGP.<sup>93,571,572</sup>

*i) Proteínas Smad*

Las proteínas Smad están relacionadas con las BMPs. Las proteínas Smad son mediadores intracelulares que pueden ser activados o desactivados por BMPs o ligandos de la familia TGF- $\beta$ , dependiendo del tejido donde se encuentren. Un estudio reciente señala que en el endotelio fibroso de segmentos calcificados de válvulas aórticas humanas se expresan preferentemente Smad-1/5/8, una vía canónica de BMPs. Por el contrario, no se observaron diferencias entre segmentos calcificados y no calcificados en la expresión de Smad-2/3, una vía canónica de TGF- $\beta$ . Los investigadores también encontraron baja expresión de antagonistas de BMPs así como inhibición de Smad6.<sup>19</sup>

*j) Receptor tirosina Kinasa Ax1 y Gas6*

El receptor tirosina Kinasa Ax1 se expresa en la pared de las células de músculo liso vascular. Estudios *in vitro* han demostrado que la expresión de este receptor y su ligando Gas6 está disminuida en la calcificación inducida por fósforo. La activación Ax1 conlleva a la inhibición de apoptosis en CMLV.<sup>94,505</sup>

*k) Factores de transcripción*

A nivel génico existen una serie de factores de transcripción que son necesarios para la transformación fenotípica de las células de músculo liso vascular. Estos factores de transcripción son proteínas que interactúan con el ADN en secuencias específicas para regular la expresión del gen que codifica esa secuencia. Dentro de estos factores se incluyen: el factor relacionado con el suero (SRF); el Cbfa1 o RUNX; la familia de factores de transcripción GATA; el factor osterix; la miocardina; los factores A y B relacionados con la miocardina; el factor nuclear de activación de células T (NFAT) subtipos c1, c3 y c4; el Sox 9; el Msx2; el STAT3 y el receptor Notch1.

- ***Mecanismos protectores de calcificación***

Dentro de este grupo destacan, por su efecto inhibitor sobre el desarrollo de CV, las proteínas: proteína de matriz gla (MGP), complejo mineral-fetuina, osteoprotegerina, osteopontina, osteonectina, PTHrP, pirofosfato, bifosfonatos, Klotho y estatinas.

*a) Proteína de matriz gla (MGP)*

La MGP es una proteína de 84 aminoácidos, dependiente de vitamina K, que se encuentra en diversos tejidos, incluyendo corazón, endotelio y células de músculo liso vascular. La función principal de la MGP es unirse al calcio iónico o a los cristales de calcio y facilitar su eliminación de la pared vascular y, probablemente, de otros tejidos blandos.<sup>432</sup>

Entre los factores que regulan positivamente la actividad de MGP se encuentran los niveles de calcio iónico,<sup>150</sup> el calcitriol,<sup>151</sup> la vitamina K,<sup>426</sup> el pH sanguíneo<sup>325</sup> y los calcimiméticos;<sup>332</sup> por el contrario, los factores que reducen la expresión de MGP son: el ácido retinoico, el TGF- $\beta$ <sup>151</sup> y la warfarina.<sup>426</sup>

*b) Complejo mineral –fetuína A*

Este complejo lo forman principalmente: una proteína, fetuína o  $\alpha$ -hgs y, en menor medida, MGP, albúmina e hidroxapatita. Investigaciones recientes indican que la fetuína A, una proteína de conjugación de calcio derivada de hepatocitos que mantiene la solubilidad del calcio en el suero supersaturado y en compartimentos de líquido intersticial,<sup>257</sup> puede ser fagocitada por CMLV y que la presencia de esta en las vesículas puede inhibir el desarrollo de calcificaciones.<sup>446</sup> En pacientes con ERC, la diálisis, al igual que la inflamación, reducen los niveles de fetuína A<sup>91</sup> y los niveles bajos de fetuína se han correlacionado con la



mortalidad cardiovascular en este tipo de pacientes. La fetuina se almacena en el hueso y tiene actividad anticalcificante pero en menor medida que la MGP.<sup>256</sup>

*c) Osteoprotegerina (OPG)*

Es una proteína de la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral. Es un inhibidor de la actividad resorptiva del hueso al inhibir la función osteoclástica. También es un inhibidor potente de las calcificaciones extraóseas al prevenir la salida de mineral desde el hueso, sobre todo calcio y fósforo que pudiesen precipitar en los tejidos blandos. Sin embargo, en pacientes con ERC, los niveles plasmáticos elevados de osteoprotegerina son indicativos de alta probabilidad de calcificación coronaria y muerte cardiovascular.<sup>263,277,390</sup>

Existen estudios que indican que la OPG activa al ligando del factor nuclear  $\kappa\beta$  (RANKL), el cual activa a RANK, lo que conlleva a la liberación de mediadores de la inflamación. También OPG actúa como receptor para el ligando activador de TRAIL (Ligando inductor de apoptosis relacionada con TNF). Cuando este ligando se une a OPG ejerce un efecto inhibidor de la apoptosis ya que impide que se active TRAIL. Como consecuencia se evita la formación de cuerpos apoptóticos en las CMLV y en las células endoteliales y, por tanto, la mineralización.<sup>476</sup>

*d) Osteopontina (OPN)*

La osteopontina es una fosfoproteína ácida que se encuentra únicamente en los tejidos altamente mineralizados como es el caso del hueso y los dientes. No existe en los vasos sanguíneos normales y aparece cuando existe depósito de sales minerales.<sup>180</sup> La OPN inhibe el crecimiento de los cristales de hidroxiapatita. También participa activamente en la regresión de calcificación al parecer por la

activación de osteoclastos en tejidos blandos altamente calcificados a través de una  $\alpha\beta$ -integrina. Estos osteoclastos activados participarían en la eliminación de los depósitos minerales extraesqueléticos.<sup>180</sup>

A pesar de su efecto inhibitorio sobre las CV, la OPN se encuentra en cantidades muy bajas en los tejidos calcificados, por lo que su acción protectora es menor que la de la MGP.<sup>326</sup>

*e) Osteonectina (ON o SPARC)*

La osteonectina es una glicoproteína fosforilada de 32 kDa que muestra una gran afinidad por el calcio, la hidroxiapatita y el colágeno tipo I. Forma un complejo con el colágeno tipo I que tiene afinidad por la hidroxiapatita y los iones de calcio, proceso necesario para la formación de hueso.<sup>527</sup> Esta proteína también se encuentra en la pared íntima vascular y rara vez en la lámina media, sin embargo la pared de las arterias calcificadas tiene una menor expresión de ON.

Las principales funciones de la ON son modular la mineralización de tejidos calcificados y regular, junto con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la proliferación de CMLV.<sup>439</sup>

*f) Péptido relacionado con la PTH (PTHrP)*

Identificado inicialmente como un factor patológico por producir hipercalcemia maligna en el síndrome paraneoplásico, el péptido relacionado con la PTH tiene una similitud en la región amino-terminal de la hormona paratiroidea. El PTHrP es capaz de interactuar con el receptor de la PTH, ejerciendo acciones similares sobre el metabolismo mineral.<sup>437</sup> El PTHrP se expresa en diversos tejidos fetales y adultos y ejerce una gran variedad de funciones, sobre todo a nivel local, actuando

como un factor paracrino/autocrino. En las CMLV este péptido actúa como: vasorrelajante, factor de crecimiento y modulador local de CV al inhibir a la fosfatasa alcalina.<sup>262,264</sup>

*g) Pirofosfato y Bifosfonatos*

El pirofosfato es un componente inorgánico que contiene un enlace P-O-P. El pirofosfato se sintetiza en las células del músculo liso vascular y otras poblaciones celulares. Se encuentra libre en la sangre y su concentración y actividad están relacionadas estrechamente con la fosfatasa alcalina.<sup>326</sup> El pirofosfato reduce la mineralización de la pared vascular a través de la inhibición de la formación de hidroxiapatita,<sup>359</sup> además modula a nivel molecular el equilibrio entre calcificación y resorción ósea.<sup>425</sup>

*h) Klotho*

La relación entre Klotho, FGF23 y metabolismo del fósforo ya se ha mencionado en apartados anteriores. Se le atribuyen diversas funciones que en su conjunto retrasan la senescencia. Entre estas destacan unirse a receptores de superficie celular para iniciar la señalización de IGF-1.<sup>227</sup> También tiene actividad antiapoptótica en las células endoteliales<sup>242</sup> y las protege contra el estrés oxidativo.<sup>387</sup> Además, la expresión de este gen es crucial para la angiogénesis<sup>493</sup> y su ausencia disminuye la osteoclastogénesis y regula positivamente la expresión de OPG.<sup>270</sup>

*i) Estatinas*

El efecto beneficioso de las estatinas sobre la calcificación vascular se basa en que son capaces de disminuir la apoptosis de las CMLV a través de la regulación positiva del receptor Ax1, el cual se encuentra disminuido cuando existe

calcificación vascular.<sup>97</sup> Las estatinas tienen otros efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular: son capaces de modificar la función endotelial,<sup>383</sup> disminuyen la inflamación<sup>66</sup> e inhiben la proliferación y migración de las CMLV.<sup>26</sup>

### ➤ **Magnesio y calcificación vascular**

En pacientes con ERC los niveles circulantes de Mg se correlacionan inversamente con calcificación vascular y con engrosamiento de íntima y media de carótida.<sup>541, 542</sup>

El principal uso terapéutico del Mg en la ERC es como quelante de fósforo en la dieta, no obstante, existe evidencia de que el Mg tiene un rol más allá del control de la hiperfosfatemia. Investigaciones recientes indican que el Mg inhibe el desarrollo de las CV tanto en modelos animales como en estudios *in vitro*, sin embargo los mecanismos celulares a través de los cuales el Mg ejerce este efecto no se comprenden en su totalidad.

Diversas investigaciones han demostrado que el Mg evita la transformación osteogénica de CMLV. Uno de estos trabajos indica que el Mg extracelular regula negativamente la calcificación en CMLV a través de un incremento en la actividad del canal de catión TRPM7.<sup>338</sup> En otro trabajo Montes de Oca *et al.* observaron que el Mg puede inhibir la actividad Wnt/ $\beta$  catenina y revertir la transformación osteogénica de células de músculo liso vascular.<sup>378.</sup>

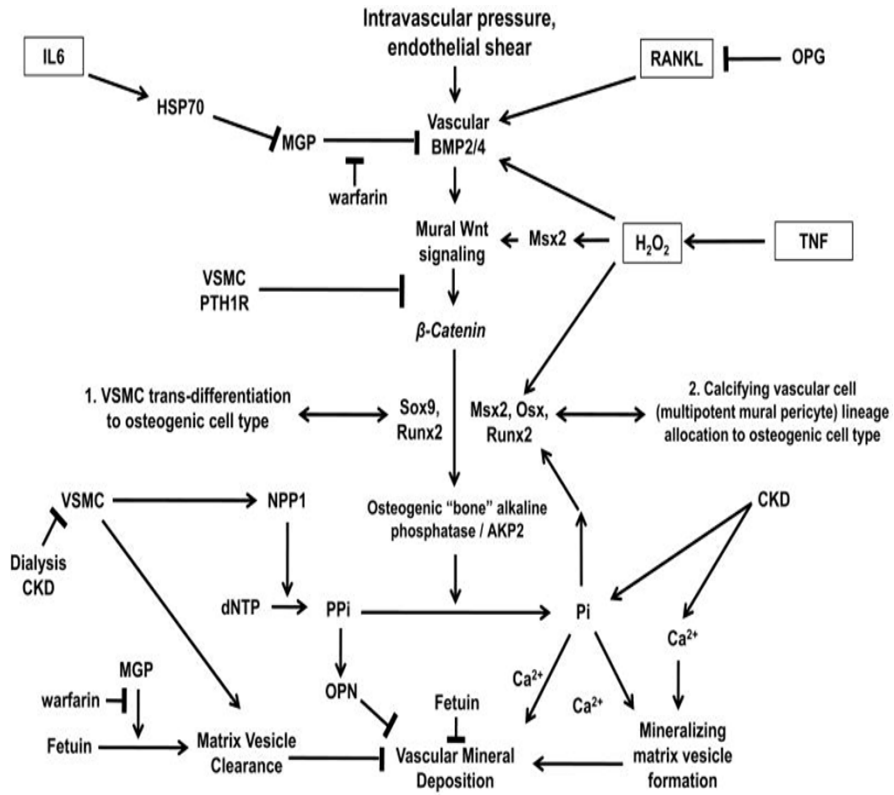
Otro efecto atribuido al Mg es una acción sobre las glándulas paratiroides, contribuyendo al control del hiperparatiroidismo secundario. Al respecto, Rodríguez-Ortiz *et al.* observaron que el Mg reduce la secreción de PTH en

condiciones de bajo calcio, y que también ejerce regulación al alza de receptores claves en la glándula: RSCa, VDR y el sistema FGF23/Klotho.<sup>454</sup>

Los calcimiméticos que actúan sobre RSCa son efectivos para controlar el hiperparatiroidismo secundario y las calcificaciones vasculares en pacientes con ERC puesto que disminuyen los niveles circulantes de PTH, P y  $\text{Ca}^{2+}$ .

Se ha postulado que los calcimiméticos, así como el  $\text{Mg}^{2+}$ , podrían activar mecanismos locales sensores de cationes que protegen de procesos de calcificación ectópica. La activación del RSCa por calcimiméticos ha sido asociada con disminución y reversión de CV. Al respecto, un estudio *in vivo* con ratas urémicas demostró que el calcimimético AMG 641 reduce la progresión de CV.<sup>333</sup> Además, *in vitro*, el calcimimético R-568 inhibió la deposición mineral en CMLV a través de la activación de RSCa.<sup>7,254</sup>

La **Figura 2.6.** muestra la relación entre los principales factores inductores e inhibidores de CV en CMLV.



**Figura 2.6.** Representación de los mecanismos y factores inductores e inhibidores de la calcificación de CMLV. Shao *et al.* 2010.<sup>487</sup>

➤ **Trastornos del equilibrio ácido-base y calcificación vascular**

Los cambios en el equilibrio ácido-base influyen en el desarrollo de CV. Se ha reportado que la acidosis disminuye las CV<sup>355</sup> y se cree que la alcalosis incrementa la CV.<sup>116</sup> La información sobre la influencia del estado ácido-base sobre las CV se ha obtenido, principalmente, de dos grupos de estudios:

a) Experimentos en los cuales el equilibrio ácido-base ha sido gravemente modificado, por ejemplo, por inducción de acidosis.<sup>16,355</sup>

b) Estudios epidemiológicos llevados a cabo en pacientes humanos en diálisis.<sup>215,280</sup>

A pesar de que una gran cantidad de conocimiento sobre las CV secundarias a ERC,<sup>265,327,332-334,411,565</sup> la correlación entre equilibrio ácido-base y CV en ratas urémicas que no han sido sometidas a cambios artificiales pH no ha sido reportada.

- ***Efecto de la acidosis metabólica sobre la calcificación.***

Los pacientes con ERC tienen complicaciones en el equilibrio ácido-base, particularmente acidosis metabólica. La acidosis promueve la disolución físico química del hueso, activa a los osteoclastos e inhibe a los osteoblastos. El resultado es una movilización de Ca desde el hueso junto con una inhibición de la neoformación ósea.<sup>21,290</sup>

La acidosis metabólica disminuye la deposición de calcio y fósforo en los tejidos blandos al incrementar la solubilidad y el punto de precipitación de la

hidroxiapatita,<sup>297</sup> por tanto, la acidosis podría evitar el depósito de sales cálcicas en la pared arterial al incrementar su solubilidad y promover la disolución de las sales minerales ya depositadas sobre la pared.

En cuanto a los mecanismos implicados, existen trabajos que han demostrado que la acidosis metabólica inhibe la producción de colágeno y otros componentes de matriz por los osteoblastos, previniendo así la neoformación de tejido óseo.<sup>167,168</sup> Otro estudio señala que el cultivo de osteoblastos de ratón en un medio con pH ácido produce una regulación negativa de la fosfatasa alcalina y un incremento en la producción de la MGP.<sup>50</sup>

Por su parte, Lomashvili *et al.* observaron que, en anillos de aorta de ratas, una disminución en del pH en el medio de cultivo fue capaz de frenar la deposición mineral.<sup>325</sup>

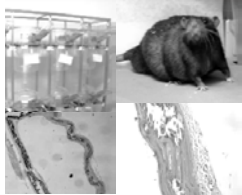
En trabajos realizados por Jara *et al.* en animales urémicos con acidosis metabólica inducida, los investigadores observaron que la función renal se mejoraba con la acidosis. Los autores atribuyeron este resultado a una menor deposición de calcio en la médula renal (nefrocalcinosis).<sup>258-260</sup>

Es importante considerar que también existen trabajos *in vitro* e *in vivo* que plantean un efecto perjudicial de la acidosis metabólica sobre la pared arterial. Boenisch *et al.* observaron que al disminuir el pH del medio de cultivo de CMLV se incrementó la producción de mediadores inflamatorios como la IL-6 y la quimioquina RANTES.<sup>44</sup> En este sentido, estudios clínicos reportan que el corregir la acidosis metabólica en pacientes en diálisis peritoneal resultó en una disminución de los niveles plasmáticos de TNF $\alpha$ . Como se ha descrito



anteriormente, la inflamación es un importante inductor de CV y por tanto, se ha planteado que la acidosis podría producir indirectamente calcificación vascular.<sup>369,540</sup>





### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



Esta Tesis Doctoral se basa en contrastar 3 Hipótesis, que han dado lugar a 3 estudios independientes pero muy relacionados entre sí. A continuación se presentan estas Hipótesis y los Objetivos que de ellas se desprenden:

**Hipótesis 1:** *La calcificación vascular y de otros tejidos blandos está exacerbada en los enfermos urémicos obesos, debido a que padecen procesos de estrés oxidativo.*

**Objetivos:**

1. Estudiar los procesos de calcificación extraesquelética en ratas urémicas obesas (Zucker fa/fa) y en ratas urémicas delgadas (Zucker FA/FA).
2. Evaluar estrés oxidativo en sangre y tejidos de ratas urémicas obesas.
3. Determinar el efecto del tratamiento con vitamina E sobre estrés oxidativo y calcificaciones tanto en ratas urémicas obesas como en cultivos de células de músculo liso vascular.

**Hipótesis 2:** *En la uremia, existe una relación entre los procesos de calcificación vascular y el estado ácido-base.*

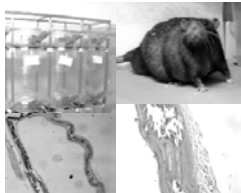
**Objetivos:**

4. Evaluar en ratas urémicas la correlación entre estado ácido-base sanguíneo (pH, PCO<sub>2</sub>, bicarbonato, anión gap, etc.) y calcificación vascular.

**Hipótesis 3:** *La suplementación dietética de magnesio es una medida eficaz e inocua para prevenir y tratar las calcificaciones extraesqueléticas asociadas a la uremia.*

**Objetivos:**

5. Evaluar el efecto de distintas concentraciones de magnesio de la dieta sobre el desarrollo calcificaciones vasculares y de otros tejidos blandos en ratas urémicas.
6. Determinar la influencia de niveles elevados de magnesio en la dieta sobre la histología ósea de ratas urémicas.
7. Estudiar el efecto del magnesio en la dieta sobre la regresión de calcificación vascular preexistente en ratas urémicas.



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS





Todos los protocolos experimentales fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética para la Investigación Animal de la Universidad de Córdoba y las ratas utilizadas recibieron cuidado humanitario según los Principios para el Cuidado de Animales de Laboratorio formulados por la Sociedad Nacional para la Investigación Médica.

Los animales se mantuvieron alojados con ciclos de luz/oscuridad de 12h/12h previo y durante los experimentos y recibieron *ad libitum* una dieta estándar (Calcio= 0.6%, Fósforo=0.6% y Magnesio= 0.1%) antes de los experimentos.

## **4.1. ESTUDIO 1: Calcificaciones vasculares en un modelo de uremia y obesidad: influencia del estrés oxidativo y del tratamiento con vitamina E**

### **4.1.1 Estudios *in vivo***

#### **4.1.1.1. Animales y procedimientos quirúrgicos**

Para este estudio se utilizaron ratas Zucker con fenotipo Obeso (n=44) y ratas Zucker con fenotipo Delgado (n=20). Los animales fueron facilitados por Harlan Laboratories Models (Barcelona, España). La uremia fue inducida por nefrectomía 5/6 (5/6 Nx), un procedimiento de dos pasos que reduce la masa renal original en cinco sextos (5/6) de acuerdo con estudios previos.<sup>334</sup> En el primer paso, bajo anestesia general, se realizó una incisión de 8 mm en la superficie medio lateral izquierda del abdomen, y el riñón izquierdo fue expuesto. Los dos polos del riñón se ligaron y se extirparon, por tanto, se conservó 1/3 de la masa renal original. Tras una semana de recuperación, los animales fueron reanestesiados y se realizó una incisión de 8 mm en la superficie medio lateral derecha del abdomen. El riñón derecho fue exteriorizado y se retiró la cápsula renal. A continuación se ligó el pedículo renal, y el riñón derecho fue extirpado. Tras la segunda cirugía, se suministraron dietas con un contenido de calcio normal (0.6 %) y de fósforo elevado (0.9%). Además las ratas recibieron calcitriol, 80 ng/kg ip (Calcijex, Abbot, Madrid, España) en días alternos (3 veces por semana) para controlar el hiperparatiroidismo secundario. La eutanasia se realizó 24 horas después de recibir la última dosis de calcitriol.

#### **4.1.1.2. Diseño experimental**

El diseño experimental incluyó dos grupos de experimentos *in vivo*: el Experimento 1, cuyo objetivo fue determinar la influencia de la obesidad sobre las calcificaciones; y el Experimento 2, diseñado para estudiar el efecto del tratamiento con vitamina E sobre las calcificaciones en ratas obesas urémicas.

##### **4.1.1.2.1. Experimento 1:** *Efecto de la obesidad sobre el desarrollo de calcificación extraesquelética.*

Antes de iniciar los estudios todas las ratas se mantuvieron durante 2 semanas con una dieta estándar. A las 12 semanas de edad, las ratas de cada fenotipo se asignaron de manera aleatoria a 2 grupos: un grupo Control (C) y un grupo nefrectomizadas (Nx). Las ratas Control (C-Obesas, n=8 y C-Delgadas, n=8) se sacrificaron para obtener un perfil bioquímico sanguíneo no urémico y un control negativo de calcificación. Las otras ratas fueron nefrectomizadas (Nx-Obesa, n=12 y Nx-Delgada, n=12) y recibieron dieta alta en fósforo y calcitriol tal y como se describió en el apartado 4.1.1.1. Ambos grupos se sacrificaron 4 semanas después por punción aortica y exanguinación bajo anestesia general.

##### **4.1.1.2.2. Experimento 2:** *Efecto del tratamiento con vitamina E sobre las calcificaciones en ratas urémicas obesas.*

Todos los análisis se realizaron en ratas Nx-Obesas (n=24) de la misma edad que el Experimento 1. Las ratas se asignaron a dos grupos experimentales: un grupo control (n = 12) que recibió una dieta alta en fósforo (0.9%) que contenía el requerimiento mínimo de vitamina E (27 mg/kg) (Nx-Obesas-C) y un grupo

tratado (n=12) que recibió también una dieta alta en fósforo (0.9%) más un suplemento de vitamina E (30000 mg/kg) en la dieta (Nx-Obesas-Vit E).

Ambos grupos recibieron calcitriol a dosis y frecuencia similar a las ratas del Experimento 1 y fueron sacrificados tras 4 semanas.

#### **4.1.1.3. Valoración de la calcificación vascular**

Después del sacrificio, se obtuvieron muestras de aorta torácica y estómago para evaluar el contenido mineral mediante cuantificación del contenido de calcio y fósforo e histopatología. Para evitar sesgo en las muestras, se utilizó la misma sección de aorta de cada animal para cada estudio: el tercio craneal para histología y el tercio medio para cuantificación mineral. Los tejidos aórticos y gástricos se desmineralizaron en ácido fórmico al 10% y en HCl 150 mM, respectivamente. El contenido de fósforo y calcio se cuantificó en el sobrenadante de acuerdo con la metodología descrita en trabajos previos de nuestro grupo<sup>332</sup> y por Price *et al.*<sup>424</sup>

La porción craneal de la aorta torácica y muestras de estómago y pulmón se fijaron en formol al 10% tamponado y posteriormente se incluyeron en parafina. Se cortaron en secciones de 3µm y se tiñeron por el método de von Kossa para evaluar mineralización. La extensión de la calcificación fue evaluada por tres observadores independientes utilizando una escala semicuantitativa (rango de 0-4).

#### **4.1.1.4. Evaluación del estrés oxidativo**

El estrés oxidativo se evaluó mediante la cuantificación de la actividad de la GPx en plasma en ratas de los Experimentos 1 y 2.

Además, en el Experimento 2, la actividad de esta enzima fue medida en tejido cardiovascular (aorta y corazón). Para ello, las muestras de corazón y aorta se lavaron con solución salina fisiológica y posteriormente se congelaron y almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta que fueron procesadas.

Para el análisis del tejido, las muestras se descongelaron y se homogenizaron en 5 ml de solución tampón (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA y 1mM DTT) por gramo de tejido utilizando un homogenizador Polytron (Kinematica, AG, Luzernerstrasse, Suiza). Los homogenados se centrifugaron a  $10000 \times g$  durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Las determinaciones de GPx se realizaron en el sobrenadante.

Para la cuantificación de la actividad GPx en plasma y en tejido se utilizó un kit comercial de Glutación peroxidasa (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI. Ítem No. 703102). En las muestras de tejido una porción del sobrenadante del homogenado se utilizó para cuantificar la concentración de proteína (método Bradford) y la actividad enzimática se normalizó para la proteína total.

#### **4.1.1.5. Bioquímica sanguínea**

Las muestras de sangre que se utilizaron para los análisis bioquímicos se obtuvieron por punción de aorta abdominal en el momento del sacrificio. Las muestras de sangre para cuantificación de calcio iónico se recolectaron en jeringas heparinizadas y fueron analizadas inmediatamente en un analizador Ciba-Corning 634 ISE  $\text{Ca}^{2+}/\text{pH}$  (Ciba-Corning, Essex, Inglaterra). Posteriormente, el plasma fue separado por centrifugación y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

Las determinaciones de los niveles de PTH se realizaron con un ensayo inmunorradiométrico comercial de PTH<sub>(1-34)</sub> de rata (Immunotopics, San Clemente, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los niveles plasmáticos de creatinina, fósforo, glucosa, colesterol total, colesterol asociado a lipoproteína de alta densidad (HDL), colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDL) y triglicéridos se determinaron por espectrofotometría (BioSystems SA, Barcelona, España).

Los niveles plasmáticos de TNF $\alpha$  y FGF21 se cuantificaron por ELISA (Biosource, In vitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) y (Millipore, St. Charles, MO, USA).

Mediante pruebas de radioinmunoensayos se determinaron los niveles de insulina, leptina, adiponectina (Millipore, St. Charles, MO, USA) y 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Immunodiagnostic Systems, IDS kit, Boldon, UK)

#### **4.1.2. Estudios *in vitro***

##### **4.1.2.1. Cultivo de CMLV y cuantificación de la calcificación**

Células humanas de músculo liso de aorta (CHMLVs) obtenidas de Clonetics (Lonza Walkersville, Inc., USA) se cultivaron en DMEM suplementadas con FBS (20%) (BioWhittaker; Verviers, Bélgica), Na piruvato (1 mmol/l), glutamina (4.5g/l), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 mg/ml), y HEPES (20 mmol/l) a 37°C en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>.

Después del quinto pase y a 80% de confluencia, las CHMLVs se incubaron con el medio descrito anteriormente más un suplemento con sales de fosfato:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  en proporción 1:2 (Sigma Aldrich Inc; MO, USA) para alcanzar una concentración final de fósforo de 3.3 mmol/l. Después del periodo de incubación, las células se descalcificaron durante 24 h en HCl (0.6 mol/l).

La cantidad de calcio en el sobrenadante se determinó por el método fenolsufoneftaleína (QuantiChrom™ Calcium Assay Kit, BioAssay Systems, CA, USA). Para ello, las células se lavaron 3 veces con PBS (Sigma Aldrich Inc; MO, USA) y se solubilizaron en 0.1 mol/l NaOH/0.1% SDS.

El contenido de proteína en las células fue medido por un ensayo para proteínas (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Alemania). El contenido de calcio se normalizó por la proteína total de la muestra.

#### **4.1.2.2. Tratamiento antioxidante**

Se agregó Vitamina E (40  $\mu\text{mol/l}$ : succinato de alfa-tocoferol; Sigma Aldrich Inc; MO, USA) al cultivo como tratamiento antioxidante. Esta dosis fue elegida después de realizar estudios preliminares, en los que se observó una respuesta dosis-dependiente.

#### **4.1.2.3. Actividad fosfatasa alcalina**

Para cuantificar la actividad fosfatasa alcalina, las células se lavaron 3 veces con PBS y se solubilizaron con Triton X-100 en 0.9% NaCl. La actividad fosfatasa alcalina (ALP) fue medida por el método p-nitrofenil fosfato (Sigma Aldrich; MO, USA). La actividad ALP se normalizó por la proteína total.

#### 4.1.2.4. Reacción en Cadena de la polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR)

El ARN total se obtuvo de las CHMLVs utilizando un kit de extracción de ARN (Rneasy<sup>TM</sup>, Qiagen, USA). El ADNc fue sintetizado con un kit de síntesis de una cadena primaria de ADNc (Roche; IN, USA) para 0.5 µg de ARN total en la presencia de hexámeros aleatorios en un volumen final de 20 µl.

Los *primers* o cebadores utilizados para la amplificación por PCR fueron:

##### a) **Cbfa1 Humano**

###### Directo o sentido

5'- GCA GTT CCC AAG CAT TTC AT-3'

###### Reverso o antisentido

5'- CGG ACA TAC CGA GGG ACA T-3'

##### b) **β-actina humana**

###### Directo

5'- GCA CTC TTC CAG CCT TCC TT-3'

###### Reverso

5'-ATC CAC ATC TGC TGG AAG GT-3'

Las PCR en tiempo real se llevaron a cabo por duplicado con QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen; USA) según las recomendaciones del fabricante. Todas las aplicaciones por PCR se realizaron en un sistema *Lightcycler* (Roche Molecular Biochemicals; IN, USA.). La expresión de los genes diana fue normalizada a la expresión de β-actina. Todos los primers presentaron eficiencias similares.



#### **4.1.2.5. Cuantificación de los productos finales de la glicación avanzada y peroxidación lipídica**

Las CHMLVs se lavaron tres veces, se resuspendieron en PBS y se lisaron mediante sonicación.

Los productos finales de glicación avanzada (AGEs) se cuantificaron en el lisado mediante ELISA (Oxiselect™ Advanced glycation end products (AGE) ELISA kit; Cell Biolabs, Inc. San Diego CA, USA) y según las recomendaciones del fabricante. La peroxidación lipídica (LPO) se evaluó por cuantificación de las concentraciones de malondialdehído (MDA) con un kit comercial LPO-586 (OxisResearch™ Bioxytech™ LPO-586™ Oxis International, Inc. Portland OR, USA).

#### **4.1.3. Estadística**

Los valores se expresaron como media  $\pm$  error estándar (ES). Las diferencias entre medias de dos grupos diferentes se determinaron por pruebas t; la diferencia entre medias de tres o más grupos se estimó mediante ANDEVA. La prueba de Fisher LDL se utilizó como procedimiento post-hoc. Además, se realizó un estudio de correlación utilizando la prueba de Pearson. Se consideraron significativos valores de  $P < 0.05$ .

## **4.2. ESTUDIO 2: Trastornos del equilibrio ácido-base en ratas con calcificación vascular**

### **4.2.1. Animales y procedimientos quirúrgicos**

Se utilizaron ratas Zucker (n=36). Se indujo ERC en 26 ratas y 10 fueron utilizadas como controles (C). La ERC se indujo de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 4.1.1.1. Después de la segunda cirugía, el contenido mineral de la dieta se modificó aumentando el contenido de fósforo de 0.6% a 0.9% y las ratas fueron tratadas con calcitriol 80 ng/kg ip (Calcijex, Abbot, Madrid, España) en días alternos (3 veces por semana) para controlar el hiperparatiroidismo secundario. La eutanasia se realizó 24 horas después de recibir la última dosis de calcitriol.

### **4.2.2. Evaluación de la calcificación vascular**

Después del sacrificio, se tomaron muestras de aorta torácica para estudiar el contenido mineral siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.1.1.3.

### **4.2.3. Bioquímica sanguínea**

Las muestras de sangre para los análisis bioquímicos se obtuvieron por punción de la aorta abdominal en el momento del sacrificio. La sangre para las determinaciones del equilibrio ácido-base se tomaron en jeringas heparinizadas e inmediatamente se analizaron utilizando un gasómetro Ciba-Corning 800 series (Ciba-Corning, Essex, Inglaterra). Las mediciones de pH, PaCO<sub>2</sub>, Na, K, Cl y calcio iónico (Ca<sup>2+</sup>) se hicieron por electrodo selectivo. A partir de estos parámetros, se calcularon los valores de HCO<sub>3</sub>, contenido total de CO<sub>2</sub>, exceso de base (EB) y anión gap (AG).

Posteriormente, el plasma se separó por centrifugación y se almacenó a -20 °C hasta ser procesado.

Los valores plasmáticos de creatinina y fósforo se cuantificaron de acuerdo al método descrito en el apartado 4.1.1.5.

#### **4.2.4. Estadística**

Los valores se expresaron como media  $\pm$  error estándar (ES). Las diferencias entre medias se estimaron mediante ANDEVA. Se realizó un estudio de correlación usando una prueba de Pearson. Se consideró significativo un valor de  $P < 0.05$ .

### **4.3. ESTUDIO 3: Efecto del magnesio en la dieta sobre la prevención y reversión de calcificaciones vasculares y de tejidos blandos en ratas urémicas**

#### **4.3.1. Animales**

En este estudio se utilizaron ratas Wistar machos, entre 9-19 semanas de edad con peso corporal de 250-300 g. Los animales se asignaron aleatoriamente a diferentes grupos experimentales para determinar el efecto del Mg en la dieta sobre la calcificación vascular en ratas con fallo renal.

#### **4.3.2. Nefrectomía 5/6**

El fallo renal se indujo por nefrectomía 5/6 (Nx 5/6) de acuerdo con la metodología descrita en el apartado 4.1.1.1.

También se estudiaron grupos adicionales de ratas control a las cuales se les realizó la misma manipulación quirúrgica, pero sin la ablación renal.

#### **4.3.3. Diseño experimental**

El estudio incluyó tres experimentos: el Experimento 1, diseñado para estudiar el efecto de la suplementación con Mg sobre la prevención de calcificaciones vasculares; el Experimento 2, orientado a evaluar las consecuencias de niveles dietéticos de Mg elevados sobre el hueso; y el Experimento 3, que tenía como objetivo investigar el efecto del tratamiento con Mg sobre la reversión de calcificaciones extrasqueléticas.

**4.3.3.1. Experimento 1:** *Efecto de la suplementación de Mg en la dieta sobre el desarrollo de calcificación extraesquelética*

Un día después de la segunda cirugía renal, se suministró a las ratas una dieta alta en fósforo (0.6% Ca y 1.2% P). Además, los animales recibieron calcitriol (CTR), 80 ng/kg ip (Calcijex, Abbot, Madrid, España) en días alternos (3 veces por semana) para controlar el hiperparatiroidismo secundario e inducir calcificaciones vasculares. Las ratas se dividieron en grupos (n= 10-14), que recibieron dietas con distintos contenidos de Mg: 0.1, 0.3, 0.6, 0.9 y 1.1 (%) durante 14 días. Las ratas con cirugía simulada recibieron una dieta con niveles normales de Mg (0.1%) y se utilizaron como controles. Todas las dietas fueron suministradas por Altromin (Altromin GmbH, Lage, Alemania).

Los animales se colocaron en cajas metabólicas 3 días antes del sacrificio para recoger tres muestras de orina de 24 horas. Tras dos semanas en uremia todas las ratas se sacrificaron por punción aortica y exanguinación bajo anestesia general. El sacrificio se realizó 24 h después de recibir la última dosis de calcitriol.

Después del sacrificio, la aorta torácica y el estómago fueron extirpados y procesados para cuantificar el contenido de Ca y P.

**4.3.3.2. Experimento 2:** *Efecto de la suplementación de Mg en la dieta sobre el hueso*

Una vez que los experimentos anteriores se completaron surgió interés por evaluar si el contenido elevado de Mg en la dieta podría afectar al hueso. Por tanto, se estudiaron 3 grupos adicionales de ratas (n= 6) (Control + Mg 0.1%, Nx 5/6 + P 1.2% + CTR+ Mg 0.1% y Nx 5/6 + P 1.2% + CTR+ Mg 0.6%) para obtener muestras de hueso ilion. El manejo de estos animales fue idéntico al descrito en 4.3.3.1.

**4.3.3.3. Experimento 3:** *Efecto de la suplementación con magnesio en la dieta sobre la reversión de calcificaciones extraesqueléticas*

Este experimento se realizó para determinar si la CV observada en ratas Nx con dieta normal en Mg (0.1%) podría ser revertida después de incrementar el contenido de Mg en la dieta.

Para esto, se siguió el mismo protocolo descrito en el Experimento 1: las ratas fueron nefrectomizadas y alimentadas con una dieta con 0.6% Ca, 1.2% P y 0.1% Mg con la misma dosis de calcitriol. Las ratas recibieron este tratamiento durante 14 días para permitir el desarrollo de calcificaciones en tejidos blandos. Transcurrido este tiempo (día 0) un grupo de 10 animales se sacrificó para cuantificar calcificación en aorta y en tejidos blandos y parámetros bioquímicos en sangre antes de iniciar la suplementación con Mg.

Las ratas restantes se asignaron aleatoriamente a dos grupos experimentales, los cuales recibieron dieta con 0.6% Ca, 1.2% P y Mg normal (Mg = 0.1 %, n = 21) o Mg moderadamente alto (Mg = 0.6 %, n = 18).

El diseño original consideraba sacrificar a la mitad de las ratas de cada grupo después de 14 días. Sin embargo, debido a que a ese momento (día 14), se observó una mortalidad elevada (principalmente en las ratas alimentadas con Mg normal), se sacrificaron 7 ratas del grupo con Mg normal y 9 ratas del grupo con Mg alto.

Las ratas restantes, 3 del grupo con Mg normal y 4 ratas del grupo con Mg alto, se mantuvieron por un periodo adicional de 14 días. Transcurrido este tiempo (día 28) todas las ratas que continuaban vivas se sacrificaron. Después del sacrificio, la aorta torácica, el estómago y los pulmones se recogieron y se guardaron hasta su análisis.

#### **4.3.4. Valoración de la calcificación vascular y de tejidos blandos**

La calcificación de tejidos blandos se evaluó mediante histología y por cuantificación del contenido de calcio y fósforo en aorta, estómago y pulmón de acuerdo a la metodología descrita en el apartado 4.1.1.3.

#### **4.3.5. Bioquímica sanguínea**

Las determinaciones de calcio iónico, (iCa) creatinina, P, hormona paratiroidea (PTH) y calcitriol (1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) se realizaron según los procedimientos descritos en el apartado 4.1.1.5. Los niveles de Mg se cuantificaron por espectrofotometría (BioSystems SA, Barcelona, España) y el FGF23 se determinó mediante una prueba de ELISA (Kainos Laboratories, Tokio, Japón).

#### **4.3.6. Bioquímica urinaria**

La orina recolectada se centrifugó (1500 rpm durante 5 min), se midió el volumen, y se guardó una alícuota para las cuantificaciones de Ca, P, Mg y creatinina por espectrofotometría (BioSystems SA, Barcelona, España).

#### **4.3.7. Histomorfometría ósea**

El hueso ilion de cada rata se fijó en etanol al 70% hasta ser sumergido en metilmetacrilato. Los bloques curados se recortaron y tallaron por el borde de la muestra. Se obtuvieron secciones de cinco  $\mu\text{m}$  utilizando un microtomo corredizo para materiales sólidos (Jung Polycut, Leica, Nussloch, Alemania) las cuales se tiñeron con tricrómico de Goldner para microscopía de campo brillante.

La histomorfometría cuantitativa se realizó mediante microscopía óptica con un objetivo graduado.

Todas las evaluaciones se realizaron por debajo de la placa de crecimiento. Las mediciones de osteoblastos y parámetros de superficie se hicieron con un objetivo 20x. Todos los demás parámetros fueron medidos con objetivos 10x.

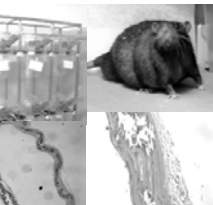
Se calcularon los siguientes parámetros histomorfométricos utilizando nomenclatura estandarizada: volumen de hueso trabecular (BV/TV), superficie osteoide como porcentaje superficie ósea trabecular (OS/BS), superficie osteoblástica como porcentaje de superficie ósea cubierta por osteoblastos (OB/BS) y superficie resortiva como porcentaje de superficie ósea (RS/BS).



#### **4.3.8. Estadística**

Los valores se expresan como media  $\pm$  ES. Las diferencias entre medias de más de dos grupos se evaluaron mediante análisis de varianza seguido de análisis de Duncan post hoc. La comparación de medias de dos grupos diferentes fue evaluada mediante una prueba t para datos no pareados. Un valor de  $P < 0.05$  fue considerado significativo.





## 5. RESULTADOS



## 5.1 ESTUDIO 1: Calcificaciones vasculares en un modelo de uremia y obesidad: influencia del estrés oxidativo y del tratamiento con vitamina E

### 5.1.1. Estudios *in vivo*

#### 5.1.1.1. Experimento 1

Las ratas C-Obesas consumieron aproximadamente el doble de alimento y alcanzaron el doble de peso corporal comparadas con las ratas C-Delgadas. Es interesante resaltar que, tras la nefrectomía, las ratas Nx-Delgadas mantuvieron el consumo de alimento sin cambio pero las ratas Nx-Obesas tuvieron una gran reducción en el consumo de alimento, lo cual también se reflejó en un descenso del peso corporal. La creatinina plasmática se elevó en los grupos Nx y también fue ligeramente más alta en las ratas Nx-Obesas,  $1.27 \pm 0.20$  mg/dl, que en las ratas Nx-Delgadas,  $1.11 \pm 0.07$  mg/dl, aunque las diferencias no fueron significativas ( $P = 0.375$ ) (Tabla 5.1).

**Tabla 5.1.** Función renal, peso corporal y consumo de alimento en los grupos estudiados en el Experimento 1. C = Controles con función renal normal; Nx = ratas 5/6 nefrectomizadas (ver Métodos para mayores detalles). Media  $\pm$  ES

	C-Delgadas n=8	Nx-Delgadas n=12	C-Obesas n=8	Nx-Obesas n=12
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	0.54 $\pm$ 0.04	1.11 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.45 $\pm$ 0.02	1.27 $\pm$ 0.20 <sup>ab</sup>
<b>Peso corporal (g)</b>	251 $\pm$ 19	286 $\pm$ 18	503 $\pm$ 5 <sup>ac</sup>	440 $\pm$ 20 <sup>abc</sup>
<b>Consumo de alimento (g/día)</b>	15.0 $\pm$ 1.1	14.7 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	26.5 $\pm$ 0.4 <sup>ac</sup>	10.6 $\pm$ 1.6 <sup>abc</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs C-Delgadas <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs C-Obesas <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs Nx-Delgadas

Las concentraciones de glucosa fueron similares en las ratas C-Delgadas y C-Obesas (**Tabla 5.2**); sin embargo, las concentraciones de insulina fueron mucho más altas en las ratas C-Obesas ( $10.8 \pm 2.8$  ng/ml vs  $1.0 \pm 0.1$  ng/ml,  $P < 0.01$ ). Las ratas C-Obesas también tuvieron niveles significativamente más elevados de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL y triglicéridos que las ratas C-Delgadas. Todas estas diferencias entre ratas Obesas y Delgadas también se observaron en los grupos Nx. Es interesante resaltar que, cuando se compararon con las C-Delgadas, las ratas Nx-Delgadas tuvieron concentraciones de insulina, colesterol y triglicéridos más elevadas en plasma. Además, las ratas Nx-Obesas presentaron concentraciones significativamente mayores de colesterol (total, HDL y LDL) y menores de triglicéridos que las ratas C-Obesas.

**Tabla 5.2.** Bioquímica sanguínea en los grupos estudiados en el Experimento 1. C = Controles con función renal normal; Nx = ratas 5/6 nefrectomizadas (ver métodos para mayores detalles). Media  $\pm$  ES

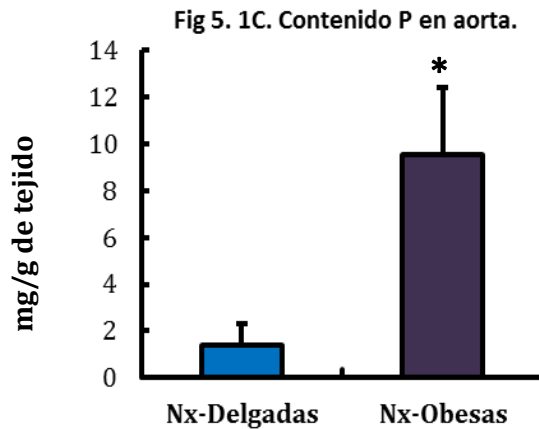
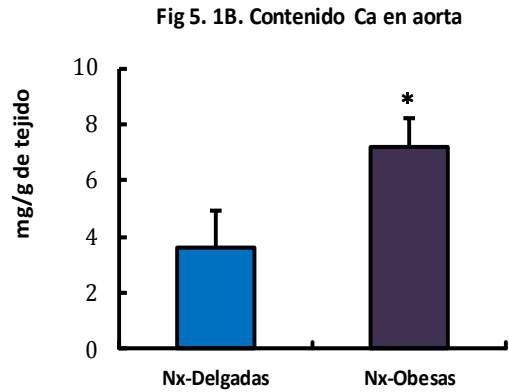
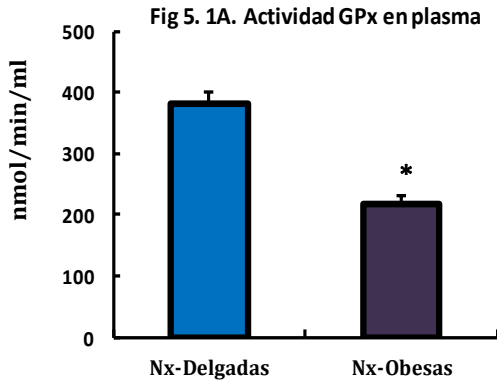
	<b>C-Delgadas</b> n=8	<b>Nx-Delgadas</b> n=12	<b>C-Obesas</b> n=8	<b>Nx-Obesas</b> n=12
<b>Glucosa (mg/dl)</b>	189.0 $\pm$ 3.7	168.2 $\pm$ 7.6	183.8 $\pm$ 12.5	201.6 $\pm$ 27.2
<b>Insulina (ng/ml)</b>	1.0 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	10.8 $\pm$ 2.8 <sup>ac</sup>	8.5 $\pm$ 1.1 <sup>ac</sup>
<b>Glucosa/Insulina</b>	239.7 $\pm$ 30.5	136.5 $\pm$ 48.6 <sup>a</sup>	24.2 $\pm$ 4.1 <sup>ac</sup>	22.2 $\pm$ 2.9 <sup>ac</sup>
<b>Colesterol Total (mg/dl)</b>	67.3 $\pm$ 1.0	90.4 $\pm$ 6.1	113.0 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>	172.0 $\pm$ 15.3 <sup>abc</sup>
<b>Colesterol HDL (mg/dl)</b>	26.0 $\pm$ 0.5	32.4 $\pm$ 0.6 <sup>ab</sup>	42.6 $\pm$ 0.9 <sup>ac</sup>	48.3 $\pm$ 4.1 <sup>ac</sup>
<b>Colesterol LDL (mg/dl)</b>	5.2 $\pm$ 0.4	9.3 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	10.3 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	20.9 $\pm$ 2.5 <sup>abc</sup>
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>	49.7 $\pm$ 2.7	60.4 $\pm$ 15.5 <sup>b</sup>	709.4 $\pm$ 90.0 <sup>ac</sup>	181.9 $\pm$ 47.9 <sup>ab</sup>
<b>Leptina (ng/ml)</b>	3.9 $\pm$ 0.2	5.1 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	51.9 $\pm$ 3.7 <sup>ac</sup>	86.4 $\pm$ 3.1 <sup>abc</sup>
<b>Adiponectina (<math>\mu</math>g/ml)</b>	2.2 $\pm$ 0.3	6.9 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	5.5 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	5.0 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>
<b>TNF<math>\alpha</math> (pg/ml)</b>	82.6 $\pm$ 1.5	95.1 $\pm$ 6.0 <sup>a</sup>	87.0 $\pm$ 5.3	85.5 $\pm$ 3.4

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs C-Delgadas <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs C-Obesas <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs Nx-Delgadas

En la Tabla 5.2 puede observarse que los niveles plasmáticos de adipoquinas fueron mayores en las ratas Obesas (en ambos grupos: C y Nx). También se observaron diferencias sustanciales en los niveles de leptina en los grupos Control (C-Delgadas:  $3.9 \pm 0.2$  ng/ml, C-Obesas:  $51.9 \pm 3.7$  ng/ml,  $P < 0.01$ ). Los cambios en adipoquinas observados tras la nefrectomía, entre Control y Nx, fueron distintos en las ratas Obesas y Delgadas. Mientras las ratas Nx-Delgadas presentaron mayores niveles de leptina y adiponectina que las ratas C-Delgadas, las ratas Nx-Obesas solo presentaron niveles más elevados de leptina ( $86.4 \pm 3.1$  ng/ml) que sus controles. Los niveles plasmáticos de TNF $\alpha$  no fueron mayores en las ratas Obesas vs Delgadas y después de la nefrectomía, solo incrementaron en las ratas Nx-Delgadas,  $95.1 \pm 6.0$  pg/ml,  $P < 0.05$  vs C-Delgadas,  $82.6 \pm 1.5$  pg/ml (**Tabla 5.2**).

Tal y como se observa en la **Figura 5.1A**, la actividad de GPx plasmática fue menor ( $P < 0.05$ ) en las ratas Nx-Obesas ( $217.2 \pm 18.2$  nmol/min/ml) que en las ratas Nx-Delgadas ( $382.3 \pm 15.5$  nmol/min/ml).

Ninguno de los controles, Delgadas y Obesas, mostraron calcificación extraesquelética. Las calcificaciones vasculares se observaron en los dos grupos de ratas Nx, aunque la gravedad de las calcificaciones fue muy distinta entre las ratas Obesas y Delgadas. La concentración de calcio en aorta fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) en las ratas Nx-Obesas,  $7.2 \pm 1.0$  mg/g p de tejido, que en las ratas Nx-Delgadas,  $3.6 \pm 1.3$  mg/g de tejido (**Figura 5.1B**). De igual manera, se observaron mayores concentraciones de fósforo en aorta en las ratas Nx-Obesas,  $9.5 \pm 2.9$  vs  $1.4 \pm 0.9$  mg/g de tejido ( $P < 0.05$ ) (**Figura 5.1C**).



**Figura 5.1.**

Actividad Glutación peroxidasa (GPx) en plasma (A), Contenido de Calcio (B) y Fósforo (C) en aortas de ratas Zucker urémicas Delgadas (Nx-Delgadas, n=12) y Ratas Zucker urémicas obesas (Nx-Obesas, n=12). Media  $\pm$ ES. \* $P < 0.05$  vs Nx-Delgadas.



Los parámetros sanguíneos de metabolismo mineral (calcio, PTH y calcitriol) fueron muy similares en los grupos Nx-Delgadas y Nx-Obesas. El fósforo en plasma fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) en las ratas Nx-Obesas,  $11.4 \pm 0.7$  mg/dl, que en las ratas Nx-Delgadas,  $8.2 \pm 0.4$  mg/dl (**Tabla 5.3**).

**Tabla 5.3.** Concentraciones plasmáticas de parámetros del metabolismo mineral en los grupos de ratas nefrectomizadas. \* $P < 0.05$  vs Nx-Delgadas. Los valores son medias  $\pm$  ES.

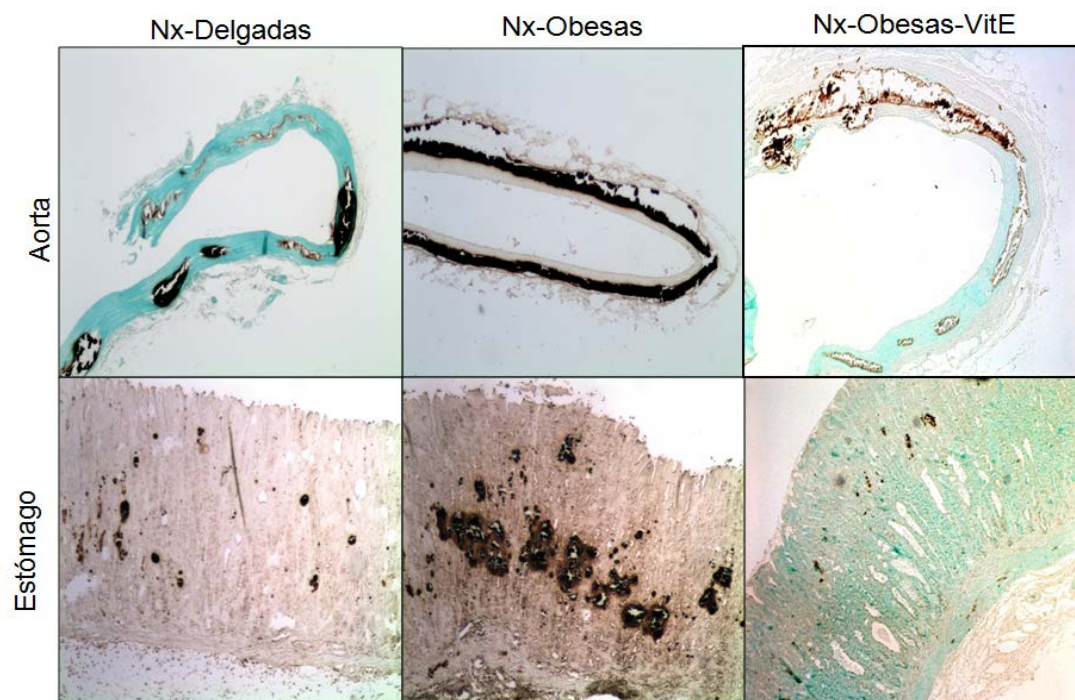
	<b>Nx-Delgadas</b> n= 12	<b>Nx-Obesas</b> n= 12
<b>iCa</b> (mM)	$1.34 \pm 0.02$	$1.31 \pm 0.01$
<b>P</b> (mg/dl)	$8.2 \pm 0.4$	$11.4 \pm 0.7^*$
<b>PTH</b> (pg/ml)	$132.4 \pm 13.6$	$120.9 \pm 19.1$
<b>CTR</b> (pg/ml)	$279.5 \pm 47.8$	$338.2 \pm 55.4$

\* $P < 0.05$  vs Nx-Delgadas

Las concentraciones de depósito mineral en otros tejidos blandos también fueron significativamente mayores en las ratas Nx-Obesas. Esto se evidenció al evaluar el contenido de calcio en el estómago que fue  $1.5 \pm 0.2$  mg/g de tejido en Nx-Obesas vs  $0.6 \pm 0.1$  mg/g de tejido en Nx-Delgadas ( $P = 0.003$ ) y el contenido de fósforo en estómago  $1.2 \pm 0.2$  mg/g de tejido en Nx-Obesas vs  $0.5 \pm 0.1$  mg/g de tejido en Nx-Delgadas ( $P = 0.018$ ).

Las diferencias en las calcificaciones extraóseas entre ratas Obesas y Delgadas también fueron observadas mediante técnicas histológicas. La **Figura 5.2** muestra secciones de aorta y estómago teñidas por el método von Kossa de ratas Nx-Obesas y Nx-Delgadas. Además de la diferencia en la gravedad de los depósitos

minerales, es interesante resaltar que en la pared vascular el depósito de calcio se observó casi exclusivamente en la túnica media



### 5.1.2. Experimento 2

Cuando se compararon con las ratas Nx-Obesas no tratadas, las ratas Nx-Obesas tratadas con vitamina E mostraron concentraciones ligeramente menores de glucosa ( $185.8 \pm 18.2$  vs  $209.5 \pm 40.6$  mg/dl) e insulina ( $7.0 \pm 0.9$  vs  $8.6 \pm 1.4$  ng/ml), pero las diferencias no fueron significativas. Además, el TNF $\alpha$  fue significativamente menor en las ratas tratadas con vitamina E ( $70.3 \pm 1.8$  vs  $82.1 \pm 4.9$  pg/ml,  $P < 0.05$ ) (Tabla 5.4).

**Tabla 5.4.** Bioquímica sanguínea en los grupos estudiados en el Experimento 2. Nx-Obesas-C = Ratas urémicas control sin tratamiento; Nx-Obesas-VitE = Ratas Obesas urémicas tratadas con Vitamina E (ver Métodos para detalles). <sup>a</sup>  $P < 0.05$  vs Nx-Obesas-C. Media  $\pm$  ES

	<b>Nx-Obesas-C</b>	<b>Nx-Obesas-VitE</b>
	n=12	n=12
<b>Glucosa</b> (mg/dl)	209.5 $\pm$ 40.6	185.8 $\pm$ 18.2
<b>Insulina</b> (ng/ml)	8.6 $\pm$ 1.4	7.0 $\pm$ 0.9
<b>Glucosa/Insulina</b>	22.3 $\pm$ 3.4	27.9 $\pm$ 3.9
<b>Colesterol Total</b> (mg/dl)	199.8 $\pm$ 14.1	222.8 $\pm$ 19.9
<b>Colesterol HDL</b> (mg/dl)	56.2 $\pm$ 3.5	65.2 $\pm$ 3.7
<b>Colesterol LDL</b> (mg/dl)	24.3 $\pm$ 3.4	27.1 $\pm$ 4.2
<b>Triglicéridos</b> (mg/dl)	236.2 $\pm$ 72.3	296.7 $\pm$ 75.7
<b>Leptina</b> (ng/ml)	82.0 $\pm$ 3.9	82.9 $\pm$ 4.3
<b>Adiponectina</b> ( $\mu$ g/ml)	3.92 $\pm$ 0.96	5.16 $\pm$ 1.13
<b>TNF<math>\alpha</math></b> (pg/ml)	82.1 $\pm$ 4.9	70.3 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs Nx-Obesas-C

El cambio más importante en los análisis bioquímicos del plasma que se observó tras la administración de vitamina E a las ratas Nx-Obesas fue un incremento en la actividad de la GPx, cuyos valores duplicaron a los del grupo sin tratar ( $388.3 \pm 78.1$  vs  $189.4 \pm 31.7$  nmol/min/ml,  $P < 0.05$ ). Además, la actividad GPx también fue mayor en aorta ( $124.7 \pm 8.9$  vs  $91 \pm 11$  nmol/min/mg de proteína,  $p < 0.05$ ) y en corazón ( $110.1 \pm 6.9$  vs  $20 \pm 7.9$  nmol/min/mg proteína,  $P < 0.001$ ) de las ratas Nx-Obesas-VitE que en las Nx-Obesas-C (**Figura 5.3A**).

La calcificación vascular disminuyó en el grupo Nx-Obesas tratadas con vitamina E.

El contenido de calcio en aorta en el grupo de ratas Nx-Obesas-C fue  $10.0 \pm 2.1$  mg/g de tejido vs  $4.6 \pm 1.3$  mg/g de tejido en Nx-Obesas-Vit E ( $p < 0.05$ ) (**Figura 5.3B**).

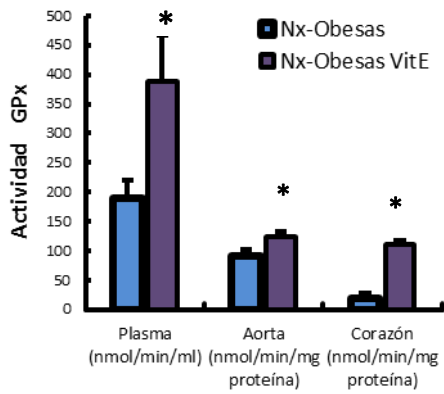
Asimismo, el fósforo en aorta también fue menor en las ratas tratadas con vitamina E ( $9.5 \pm 3.8$  mg/g de tejido) que en las controles sin tratar ( $16.4 \pm 5.2$  mg/g de tejido). Además, el contenido de Ca y P en la pared del estómago disminuyó en las ratas tratadas con vitamina E (Ca=  $0.9 \pm 0.3$  vs  $1.4 \pm 0.2$  mg/g de tejido y P=  $0.8 \pm 0.1$  vs  $1.3 \pm 0.3$  mg/g de tejido) (**Figuras 5.3D y 5.3E**).

Es importante destacar que estas diferencias se presentaron sin cambios en los parámetros plasmáticos de metabolismo mineral (**Tabla 5.5**).

**Tabla 5.5.** Concentraciones plasmáticas de parámetros del metabolismo mineral en los grupos estudiados. Nx-Obesas-C = Ratas urémicas control sin tratamiento; Nx-Obesas-Vit E = Ratas Obesas urémicas tratadas con Vitamina E (ver Métodos para detalles). <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs Nx-Obesas. Media  $\pm$  ES

	Nx-Obesas-C n=12	Nx-Obesas-Vit E n=12
<b>iCa</b> (mM)	$1.18 \pm 0.07$	$1.26 \pm 0.10$
<b>P</b> (mg/dl)	$11.52 \pm 1.0$	$11.55 \pm 1.0$
<b>PTH</b> (pg/ml)	$162.3 \pm 29.5$	$89.8 \pm 9.7$
<b>CTR</b> (pg/ml)	$252.4 \pm 47.5$	$334.9 \pm 80.3$

Fig. 5.3A



**Figura 5.3.** (A) Actividad Glutación peroxidasa (GPx) en plasma, aorta y corazón de ratas Zucker urémicas obesas (Nx-Obesas, n=12) y ratas Zucker urémicas obesas tratadas con vitamina E (Nx-Obesas-Vit E, n=12). (B) Contenido de Calcio y Fósforo (C) en aortas de ratas Zucker urémicas obesas (Nx-Obesas, n=12) y ratas Zucker urémicas obesas tratadas con vitamina E (Nx-Obesas Vit E, n=12). (D) Contenido de Calcio y Fósforo (E) en estómago de ratas Zucker urémicas obesas (Nx-Obesas, n=12) y ratas Zucker urémicas obesas tratadas con vitamina E (Nx-Obesas Vit E, n=12). \* $P < 0.05$  vs Nx-Obesas. Media  $\pm$  ES.

Fig. 5.3B Contenido de Ca en Aorta

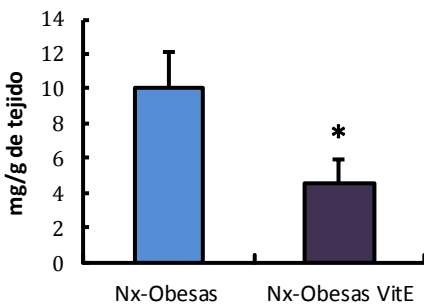


Fig 5. 3D Contenido de Ca Estómago

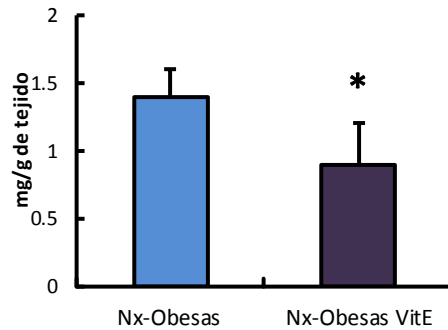


Fig 5.3C Contenido de P en Aorta

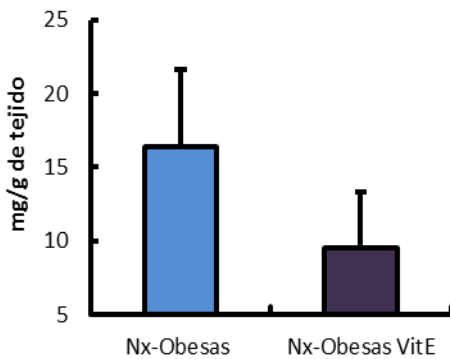
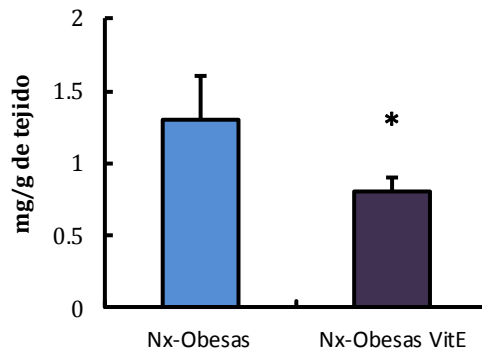
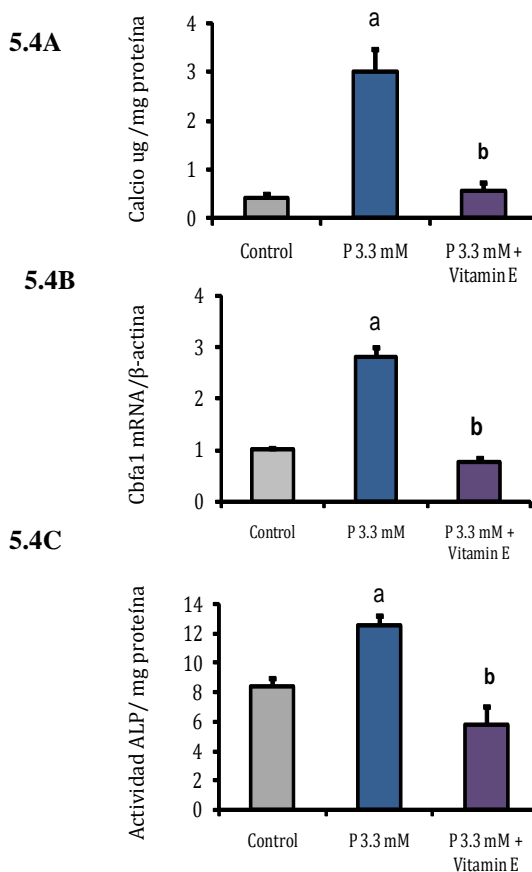


Fig 5.3E Contenido de P Estómago



**Figura 5.4** CHMLVs cultivadas durante 9 días con fósforo normal (Control), fósforo elevado (P 3.3 mM), y fósforo elevado con vitamina E (40  $\mu$ M) (**A**) Contenido total de calcio (**B**) expresión génica de Cbfa1 y (**C**) actividad fosfatasa alcalina (ALP). Las gráficas muestran los resultados de tres experimentos en triplicado. Media  $\pm$  ES. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs Control; <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs P 3.3 mM.



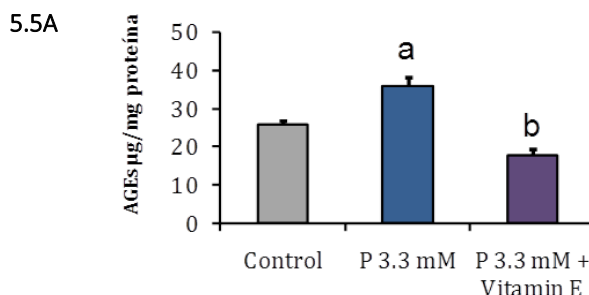
## 5.2. Estudios *in vitro*

Como se muestra en la Figura 5.4, la incubación de las CHMLVs en un medio alto en fósforo durante 9 días dio lugar a calcificación, incremento en la expresión de Cbfa1 y elevación en la actividad de la fosfatasa alcalina (**Figura 5.4A, B y C**).

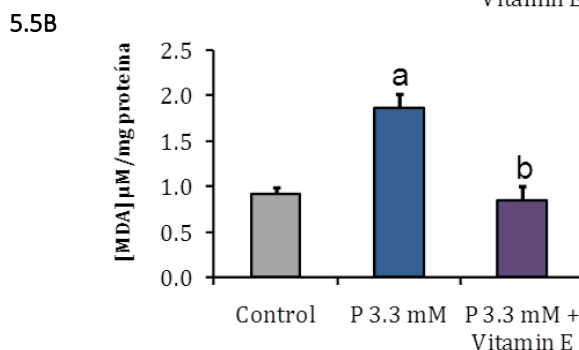
Cuando se compararon con el grupo de fósforo alto, el tratamiento con vitamina E de las CHMLVs disminuyó la calcificación ( $0.5 \pm 0.2$  vs  $3.0 \pm 0.5$   $\mu$ g calcio/mg de proteína,  $P < 0.001$ ), la expresión de Cbfa-1 ( $0.7 \pm 0.1$  vs  $2.8 \pm 0.2$  mRNA Cbfa1/ $\beta$ -Actina,  $P < 0.001$ ) y la actividad de fosfatasa alcalina ( $5.8 \pm 1.3$  vs  $12.6 \pm 0.7$  IU/mg de proteína,  $P < 0.001$ ).

El efecto del fósforo elevado y la vitamina E sobre el estrés oxidativo se evaluó en las CHMLVs mediante la cuantificación de AGEs y LPO durante el periodo de incubación. Se identificó un incremento en AGEs y LPO en los periodos iniciales de incubación. Posteriormente, estos parámetros se redujeron progresivamente y tendieron a normalizarse al final del periodo de incubación (9 días). Así, el tratamiento con vitamina E redujo significativamente las concentraciones de AGEs ( $17.7 \pm 1.5$  vs  $35.9 \pm 2.3$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína,  $P < 0.001$ ) en CHMLVs cultivadas durante 24 h, y el contenido de LPO ( $0.9 \pm 0.2$  vs  $1.9 \pm 0.2$  MDA  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de proteína,  $P < 0.001$ ) en células cultivadas durante 48 h (**Figura 5.5A y B**).

(A) Productos finales de glicación avanzada (AGEs) a 24 horas de incubación. Las barras son resultados de dos experimentos en triplicado. Media  $\pm$  ES. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs Control; <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs P 3.3mM.



(B) Concentración de malondialdehído (MDA) como indicador de peroxidación lipídica a 48 horas de incubación. Las barras son resultados de dos experimentos en triplicado. Media  $\pm$  ES. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs Control; <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs P 3.3mM.



**Figura 5.5.** CHMLVs cultivadas con fósforo normal (Control), fósforo elevado (P 3.3 mM), y fósforo elevado con vitamina E (40  $\mu\text{M}$ )

## 5.2 ESTUDIO 2: Trastornos del equilibrio ácido-base en ratas con calcificación vascular.

Tal como se muestra en la **Tabla 5.6**, las ratas Nx 5/6 tuvieron un perfil sanguíneo urémico, incluyendo creatinina elevada ( $1.37 \pm 0.11$  mg/dl), bajo calcio iónico ( $1.10 \pm 0.05$  mmol/l) y fósforo elevado ( $10.6 \pm 0.6$  mg/dl). Estos animales también presentaron calcificación vascular extensa evidenciada en los contenidos elevados de calcio ( $8.3 \pm 0.2$  mg/g de tejido) y fósforo ( $17.7 \pm 4.3$  mg/g de tejido) en aorta. El grupo control no mostró calcificación extraósea.

**Tabla 5.6.** Parámetros sanguíneos de función renal, metabolismo mineral; y contenido mineral en aorta de ratas urémicas (Nx 5/6) y controles (ver métodos para detalles). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

	Nx 5/6 (n=26)	Control (n=10)
	Media $\pm$ ES (Rango)	Media $\pm$ ES
<b>Creatinina</b> (mg/dl)	$1.37 \pm 0.11$ (0.64-3.2)	$0.44 \pm 0.02$ **
<b>Calcio en plasma</b> (mmol/l)	$1.10 \pm 0.05$ (0.73 -1.39)	$1.26 \pm 0.03$ *
<b>Fósforo en plasma</b> (mg/dl)	$10.63 \pm 0.61$ (6.57-19.54)	$6.90 \pm 0.44$ **
<b>Calcio Aorta</b> (mg/g)	$8.28 \pm 1.47$ (1.08 - 26.12)	<0.01**
<b>Fósforo Aorta</b> (mg/g)	$17.69 \pm 4.32$ (0.02-58.89)	<0.01**

La **Tabla 5.7** muestra el equilibrio ácido-base en los animales estudiados. El ligero aumento del pH sanguíneo detectado en el grupo Nx 5/6 ( $7.56 \pm 0.04$ ) reveló una tendencia hacia la alcalosis. El incremento del pH fue consecuencia de trastornos respiratorios ( $\text{PaCO}_2 = 29.2 \pm 2.9$  mmHg) y, en menor grado, metabólicos ( $\text{HCO}_3 = 24.9 \pm 0.9$  mmol/l). Esta tendencia alcalótica también se reflejó en el EB ( $3.8 \pm 1.2$  mmol/l). No se encontraron cambios en otros electrolitos.



Como se muestra en las Tablas 5.6 y 5.7 los rangos de variación tanto de calcificación y como de los parámetros ácido-base de las ratas Nx 5/6 fueron amplios, lo cual permitió realizar el estudio de correlación.

**Tabla 5.7.** Parámetros ácido-base y electrolitos en ratas urémicas (Nx 5/6) y controles (ver métodos para detalles). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

	<b>Nx 5/6 (n=26)</b>	<b>Control (n=10)</b>
	<b>Media ± ES (Rango)</b>	<b>Media ± ES</b>
<b>pH</b>	7.56 ± 0.04 (7.13-7.92)	7.36 ± 0.1 **
<b>pCO<sub>2</sub> (mmHg)</b>	29.24 ± 2.97 (4.17- 69.00)	44.31 ± 2.21**
<b>HCO<sub>3</sub>(mmol/l)</b>	24.86 ± 0.92 (13.50- 35.00)	24.52 ± 1.32
<b>t CO<sub>2</sub> (mmol/l)</b>	25.82 ± 0.94 (14.00 - 36.80)	25.90 ± 1.38
<b>EB (mmol/l)</b>	3.75 ± 1.17 (-7.80 - 14.10)	-1.11 ± 1.11**
<b>Na (mmol/l)</b>	143.31 ± 0.87 (137.50-152.40)	135.98 ± 1.36**
<b>K (mmol/l)</b>	4.98 ± 0.18 (3.85 - 7.90)	4.09 ± 0.16
<b>Cl(mmol/l)</b>	110.54 ± 1.20 (97.00- 120.00)	106.11 ± 1.72
<b>AG (mmol/l)</b>	11.05 ± 1.52 (3.20-19.80)	9.1 ± 1.3

La correlación entre el contenido de calcio y fósforo en aorta y los parámetros ácido-base se muestra en la **Tabla 5.8**. No se encontró correlación significativa entre el pH sanguíneo y las concentraciones de calcio y fósforo en aorta. PaCO<sub>2</sub> y HCO<sub>3</sub> mostraron correlaciones negativas con la mineralización aórtica que estuvieron en el borde de la significación estadística y que, de hecho, llegaron a ser significativas cuando se consideró el contenido de tCO<sub>2</sub>. Sin embargo, lo más llamativo fue la fuerte correlación positiva que se observó entre AG y el contenido de calcio ( $r=0.565$ ,  $p=0.03$ ) y fósforo ( $r=0.582$ ,  $p=0.02$ ) en aorta.

**Tabla 5.8.** Correlación entre el contenido mineral en aorta y parámetros acido-base en ratas (Nx 5/6) urémicas. (Ver métodos para detalles). N= 26. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

	Calcio aórtico (mg/g)		Fósforo aórtico (mg/g)	
	<i>r</i>	<b>P</b>	<i>r</i>	<b>P</b>
<b>pH</b>	0.217	0.287	0.338	0.091
<b>pCO<sub>2</sub></b> (mmHg)	-0.237	0.243	-0.378	0.057
<b>HCO<sub>3</sub></b> (mmol/L)	-0.366	0.066	-0.383	0.053
<b>t CO<sub>2</sub></b> (mmol/L)	-0.387	0.051	-0.416(*)	0.035
<b>EB</b> (mmol/L)	-0.072	0.728	0.004	0.983
<b>Na</b> (mmol/l)	0.162	0.550	0.265	0.320
<b>K</b> (mmol/L)	-0.246	0.227	-0.387	0.051
<b>Cl</b> (mmol/L)	-0.022	0.916	0.003	0.987
<b>AG</b> (mmol/L)	0.565(*)	0.028	0.582(*)	0.023

### 5.3. ESTUDIO 3: Efecto del magnesio en la dieta sobre la prevención y reversión de calcificaciones vasculares y de tejidos blandos en ratas urémicas

#### 5.3.1. Experimento 1: Efecto de la suplementación con magnesio sobre el desarrollo de calcificación extraesquelética.

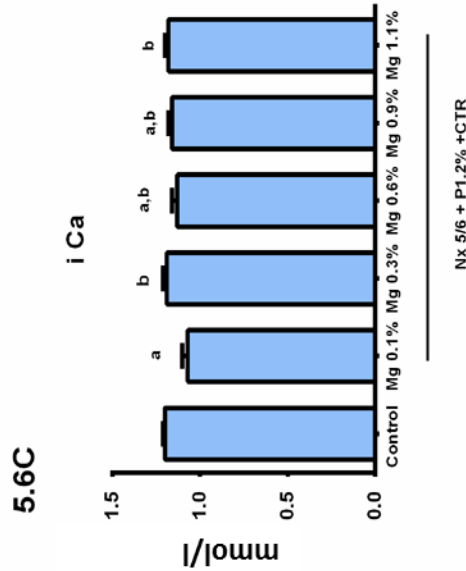
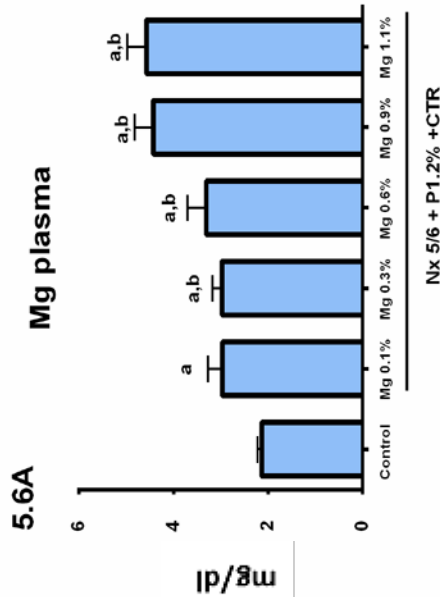
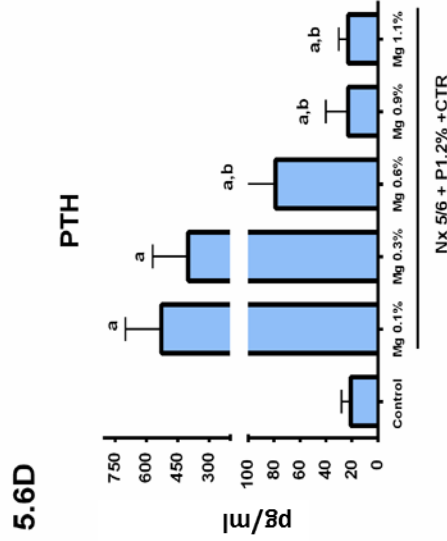
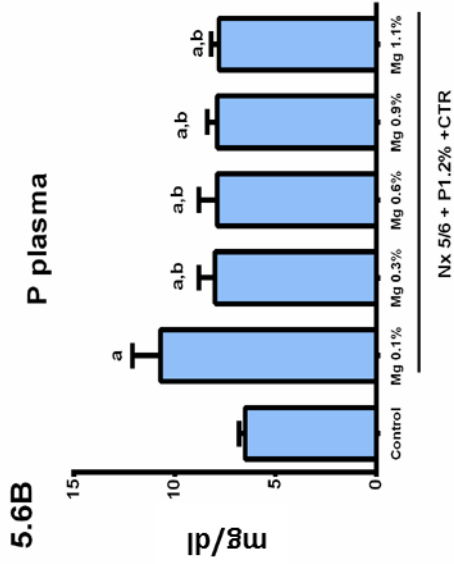
La primera parte de este estudio fue diseñado para evaluar el efecto de la suplementación en la dieta con Mg sobre la prevención de CV en ratas urémicas. El peso corporal de todos los grupos antes de Nx 5/6 y los controles (operación simulada) fue similar. Al momento del sacrificio el peso corporal de los grupos controles fue mayor que el de los grupos Nx, pero entre los grupos Nx el peso corporal no fue significativamente diferente. Los resultados de la bioquímica sanguínea en los grupos estudiados al momento del sacrificio se muestran en la **Figura 5.6** y en la **Tabla 5.9**.

**Tabla 5.9. –Experimento 1: Efecto de la dieta con Mg sobre el desarrollo de calcificación extraesquelética. Bioquímica sanguínea en los grupos estudiados al momento del sacrificio (ver texto para detalles). Media ± ES**

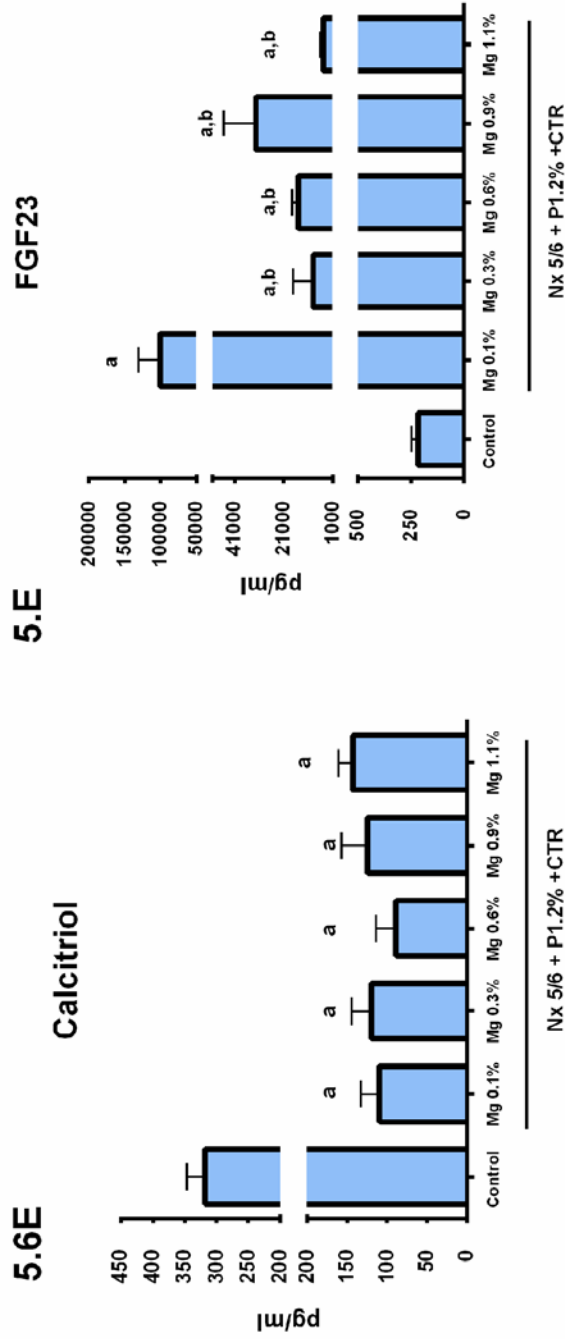
	<b>Control Mg 0.1% (n= 10)</b>	<b>Nx Mg 0.1% (n= 14)</b>	<b>Nx Mg 0.3% (n= 10)</b>	<b>Nx Mg 0.6% (n= 10)</b>	<b>Nx Mg 0.9% (n= 10)</b>	<b>Nx Mg 1.1% (n= 10)</b>
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	0.41 ± 0.06.	1.71 ± 0.2(a)	1.11 ± 0.12 (a,b)	1.10 ± 0.16 (a,b)	1.04 ± 0.06 (a,b)	1.20 ± 0.2 (a,b)

a : $P < 0.05$  vs Control Mg 0.1%; b:  $P < 0.05$  vs Nx Mg 0.1%

Tal como se esperaba, los valores de creatinina plasmática fueron mayores en las ratas Nx comparadas con las controles. Entre las ratas Nx, los valores de creatinina plasmática fueron significativamente mayores ( $P < 0.05$ ) en ratas que ingirieron la dieta más baja de Mg (0.1%). En las otras ratas Nx con concentraciones crecientes de Mg en la dieta los valores de creatinina plasmática fueron elevados y similares.



**5.6. Efecto de la dieta con Mg sobre el desarrollo de calcificación extraesquelética.** Bioquímica sanguínea en los gruposestudiados al momento del sacrificio. Mg 0.1%, n= 14; otros grupos, n=10. Media ± ES. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs Control Mg 0.1%; <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs Nx Mg 0.1%.



**5.6. Efecto de la dieta con Mg sobre el desarrollo de calcificación extraesquelética.** (Continuación) Bioquímica sanguínea en los grupos estudiados al momento del sacrificio. Mg 0.1%, n= 14; otros grupos, n=10. Media  $\pm$  ES. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs Control Mg 0.1%; <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs Nx Mg 0.1%.

Al comparar ratas alimentadas con dieta 0.1% de Mg, las ratas Nx tuvieron niveles de Mg plasmáticos mayores que los controles ( $P<0.05$ ). Dentro de los grupos de ratas Nx, al incrementar los niveles de Mg en la dieta de 0.1% a 1.1% se observó un incremento progresivo en las concentraciones plasmáticas de Mg.

El P en plasma fue mayor en las ratas Nx que en las controles ( $P<0.05$ ). En las ratas Nx, las concentraciones plasmáticas de P fueron significativamente superiores en el grupo con dieta 0.1% Mg, mientras que en los grupos con dietas 0.6%, 0.9% y 1.1% Mg se observaron niveles de P similares entre ellos.

Tal y como se esperaba, las ratas Nx mostraron una disminución en la concentración de iCa, siendo más acentuada en las ratas con dieta 0.1% Mg; estas ratas también presentaron los mayores valores de P en plasma. En las ratas Nx, los valores de PTH, fueron más elevados que en las ratas control, aunque descendieron progresivamente cuando el contenido del Mg de en la dieta aumentó de 0.1 a 0.9%, de manera que con Mg 0.9% se observaron valores de PTH muy similares al control. Los niveles plasmáticos de calcitriol fueron menores en las ratas Nx que en las controles y fueron similares entre los grupos Nx independientemente de la ingesta de Mg.

En las ratas urémicas, como era de esperar, los valores de FGF23 fueron significativamente mayores que en las controles. En estas ratas Nx, la magnitud del incremento en el FGF23 se relacionó con al incremento del Mg en dieta.

La excreción urinaria de creatinina no fue diferente entre los grupos Nx y los grupos controles. Las concentraciones urinarias de Ca, P y Mg fueron corregidas por la creatinina en orina (**Tabla 5.10**). El Ca urinario fue mayor en el grupo Nx

Mg 1.1% que en el resto de ratas Nx. El P en orina y la excreción fraccional de P fueron mayores en los grupos Nx-Mg 0.1% y Nx-0.3% Mg, los cuales también tuvieron valores más elevados de PTH.

La excreción fraccional de P fue mayor en los grupos Nx-Mg que en el grupo Control Mg 0.1%. La excreción urinaria de Mg también fue menor en el grupo Nx- Mg 0.1%, en el cual la función renal disminuyó más que en cualquier otro grupo, que en el grupo control Mg 0.1%. La excreción urinaria de Mg fue mayor en los grupos Nx-Mg 0.3, 0.6, y 0.9%, los cuales también tuvieron las concentraciones mayores de Mg en plasma.

**Tabla 5.10. –Experimento 1: Efecto de la dieta con Mg sobre el desarrollo de calcificación extraesquelética. Bioquímica urinaria en los grupos de estudio (ver texto para detalles). Media  $\pm$  ES.**

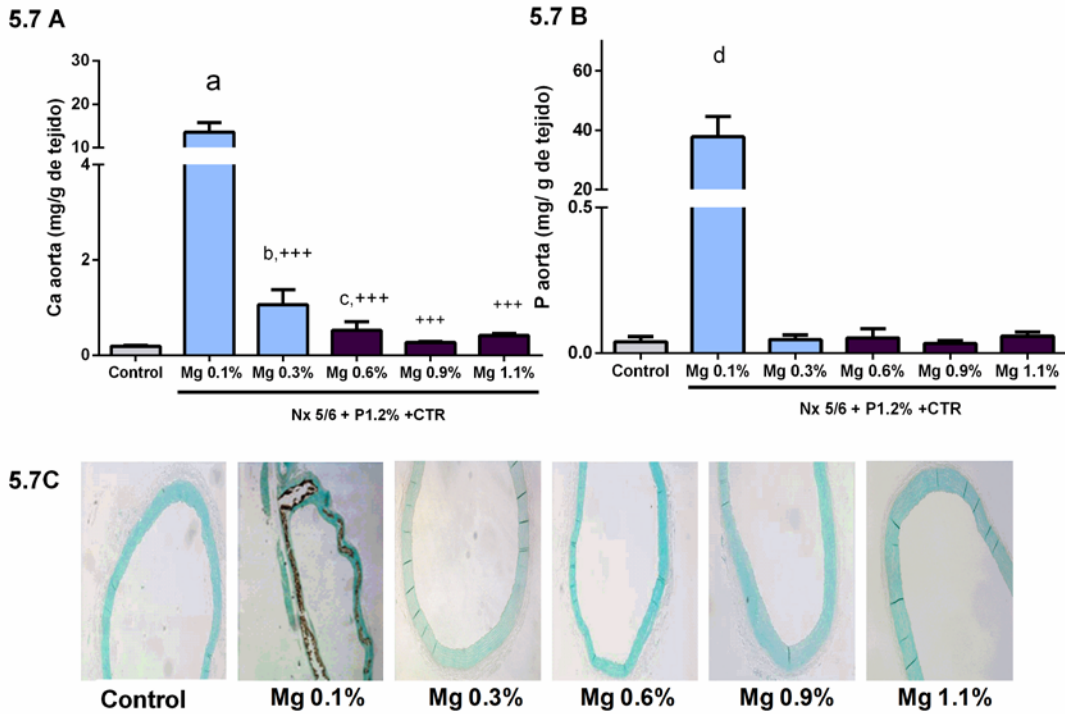
Parámetro	Control Mg 0.1%	Nx Mg 0.1%	Nx Mg 0.3%	Nx Mg 0.6%	Nx Mg 0.9%	Nx Mg 1.1%
Relación Calcio /Creatinina	0.05 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.07	0.18 $\pm$ 0.03	0.15 $\pm$ 0.04	0.15 $\pm$ 0.04	0.35 $\pm$ 0.12 <sup>(ab)</sup>
Relación Fósforo /Creatinina	0.68 $\pm$ 0.06	6.12 $\pm$ 0.83 <sup>(a)</sup>	6.11 $\pm$ 0.70 <sup>(a)</sup>	3.47 $\pm$ 0.44 <sup>(b)</sup>	1.97 $\pm$ 0.30 <sup>(b)</sup>	2.40 $\pm$ 0.64 <sup>(b)</sup>
Relación Magnesio/ Creatinina	1.04 $\pm$ 0.10	0.45 $\pm$ 0.06 <sup>(a)</sup>	1.48 $\pm$ 0.16 <sup>(ab)</sup>	1.72 $\pm$ 0.25 <sup>(ab)</sup>	1.86 $\pm$ 0.20 <sup>(ab)</sup>	A
Excreción fraccional de fósforo (%)	4.9 $\pm$ 0.80	95.0 $\pm$ 17.2 <sup>(a)</sup>	86.5 $\pm$ 7.1 <sup>(a)</sup>	44.8 $\pm$ 6.0 <sup>(ab)</sup>	21.7 $\pm$ 3.4 <sup>(ab)</sup>	36.4 $\pm$ 12.7 <sup>(a,b)</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs Control Mg 0.1%; <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs Nx Mg 0.1%. .Mg 0.1%, n= 14; otros grupos, n=10.

A:no determinado

El contenido de Ca en tejidos fue evaluado por medición directa e histología (**Figura 5.7**). Por medición directa, el contenido de Ca en la aorta ( $13.6 \pm 2.2$ mg/g de tejido) en ratas Nx alimentadas con dieta de 0.1 % Mg fue más de ochenta veces mayor que el grupo control con dieta 0.1% (**Figura 5.7A**).

Figura 5.7



**Figura 5.7. Efecto del magnesio en la dieta sobre el desarrollo de calcificaciones de aorta** (A) Contenido de calcio en aorta en los grupos estudiados. (B) Contenido de fósforo en aorta en los grupos estudiados. (C) Secciones de aorta de los grupos estudiados teñidas con von Kossa. Mg 0.1%, n= 14; otros grupos, n=10. Media ± ES. <sup>a</sup> $P < 0.001$  vs. Grupo Control; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs Grupo Control; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs Grupo Control; <sup>d</sup> $P < 0.001$  vs todos los grupos; <sup>+++</sup> $P < 0.001$  vs Mg. 0.1%.

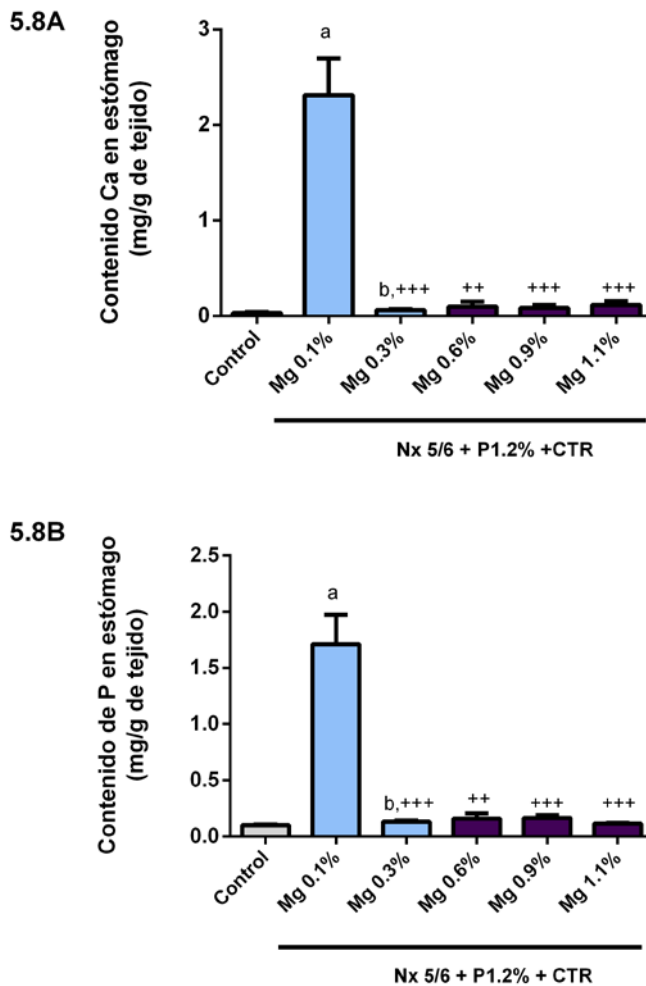


En ratas Nx el cambio de 0.1% a 0.3% Mg en la dieta se asoció con una reducción de 15 veces en el contenido de Ca en aorta ( $1.06 \pm 0.31$  mg/g de tejido). La diferencia en el contenido de P fue aún mayor con valores de  $37.8 \pm 6.8$  mg/g de tejido en ratas Nx con una dieta de 0.1 % Mg comparada con las ratas control ( $P= 0.04 \pm 0.02$  mg/g de tejido) (**Figura 5.7B**).

La disminución en el contenido de P en aorta con el incremento en el Mg de la dieta fue similar a la reducción observada en el Ca. En los grupos Nx, un incremento en el Mg de la dieta de 0.1 a 0.6% redujo el contenido de Ca y P en aorta a niveles similares a los de los animales control. Los cortes histológicos de la pared de la aorta teñidos con von Kossa mostraron un extenso depósito mineral (color marrón) en la aorta del grupo Nx-0.1% Mg. Un incremento en el Mg de la dieta en el grupo Nx previno esencialmente el depósito de mineral tal como evidencia la histología (**Figura 5.7C**)

Los resultados de calcificación en estómago fueron similares a los observados en la aorta. En las ratas Nx con dieta 0.1% Mg el contenido de Ca en estómago fue  $2.3 \pm 0.4$  mg/g, significativamente mayor que en el grupo con dieta 0.3% Mg, donde el contenido de Ca fue solo de  $0.06 \pm 0.01$  mg/g de tejido. Los valores del contenido de P en estómago fueron paralelos a los de Ca. Un incremento adicional en el contenido de Mg en la dieta no logró reducir más la deposición de Ca en el estómago (**Figura 5.8**).

Figura 5.8



**Figura 5.8. Efecto del magnesio en la dieta sobre la prevención de calcificación gástrica. (A)** Contenido de calcio gástrico en los grupos del Experimento 1. **(B)** Contenido de fósforo gástrico en los grupos del Experimento 1. Mg 0.1%, n= 14; otros grupos, n=10. Media  $\pm$  ES. <sup>a</sup> $P < 0.001$  vs Grupo control; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs Grupo control; <sup>+++</sup> $P < 0.001$  vs Mg 0.1% . <sup>++)</sup> $P < 0.01$  vs Mg 0.1%.

### 5.3.2. Experimento 2: Efecto de la suplementación de Mg en la dieta sobre el hueso.

La Histomorfometría ósea no mostró diferencias significativas en las ratas Nx alimentadas con 0.1% o 0.6% Mg (**Tabla 5.11**). Tampoco se observaron diferencias en el volumen óseo de ratas control y Nx con dieta 0.1% o 0.6% Mg. La superficie osteoide y la superficie de osteoblastos fueron mayores en ratas Nx pero no alcanzaron la significación estadística. En ratas Nx, el incremento en el contenido de Mg en la dieta a 0.6% disminuyó la superficie resortiva a valores menores a los de las ratas control ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 5.11. Experimento 2: Efecto del magnesio en la dieta sobre el hueso.** Diferentes parámetros óseos en los grupos estudiados (ver el texto para detalles). Media  $\pm$  ES.

	Volumen óseo (BV/TV)%	Superficie osteoide (OS/BS)%	Superficie osteoblástica (OB/BS)%	Superficie resortiva (RS/BS)%
<b>Control Mg 0.1%</b> (n=6)	12.5 $\pm$ 1.8	5.3 $\pm$ 2.1	9.5 $\pm$ 1.0	1.6 $\pm$ 0.4
<b>Nx Mg 0.1%</b> (n=6)	11.8 $\pm$ 2.2	10.1 $\pm$ 4.2	11.7 $\pm$ 2.3	2.1 $\pm$ 0.6
<b>Nx Mg 0.6%</b> (n=6)	12.7 $\pm$ 2.4	16.3 $\pm$ 5.5	11.9 $\pm$ 3.4	0.5 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs Control Mg 0.1%

### 5.3.3. Experimento 3: Efecto del magnesio en la dieta sobre la prevención y reversión de calcificaciones vasculares y de tejidos blandos en ratas urémicas.

La segunda parte del estudio fue diseñada para determinar si la CV observada en ratas Nx alimentadas con dietas con 0.1% de Mg podría detener su progresión o revertirse mediante un incremento en el contenido de Mg en la dieta.

Para este experimento se utilizaron ratas Nx que previamente recibieron un protocolo de calcificación que consistió en calcitriol ip a días alternos y dieta baja en Mg (0.1%) y alta en fósforo (1.2 %) durante 14 días. Trascurrido este periodo se dividieron en dos grupos y recibieron dietas altas en fósforo (1.2%), pero con contenidos distintos de Mg (Mg 0.1 %, n= 21; vs Mg 0.6%, n= 18) durante 28 días adicionales.

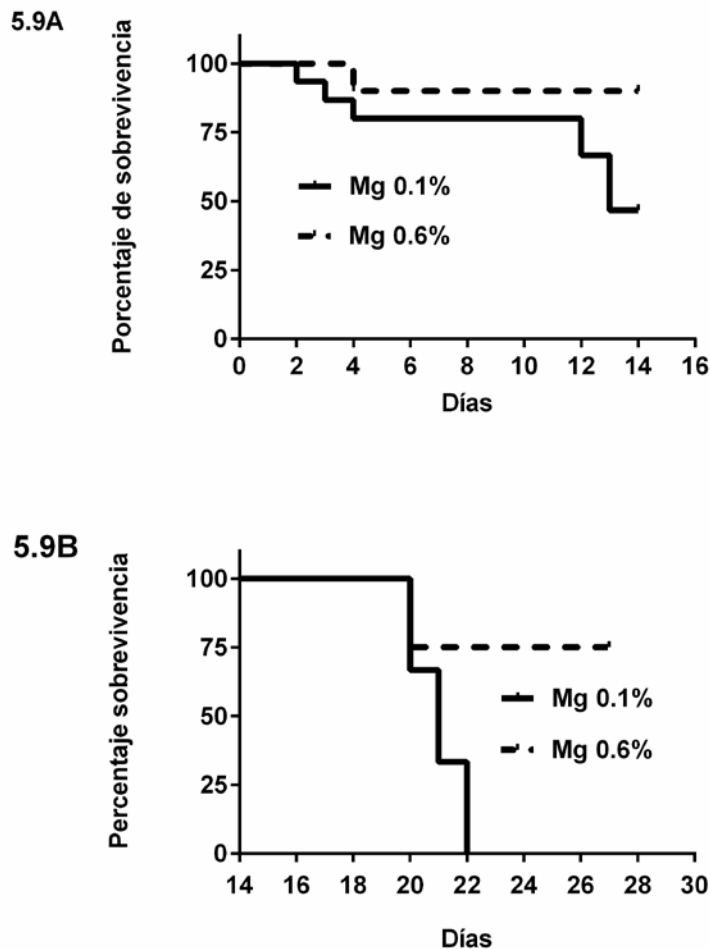
Cabe aclarar que en los resultados que se presentan el “día 0” hace referencia al inicio del tratamiento con dieta alta en Mg.

Inicialmente se comparó la tasa de supervivencia de los animales urémicos alimentados con 0.1% y 0.6% Mg, ambas con alto fósforo.

Como se muestra en la **Figura 5.9**, existe un marcado descenso en la tasa de mortalidad en las ratas alimentadas con una dieta alta en Mg (Mg = 0.6%). El día 14, más del 50 % (11/21) de las ratas que consumieron la dieta normal (0.1% Mg) murieron, pero en las ratas que recibieron dieta alta en Mg, la tasa de mortalidad fue solo del 28% (5/18).

Todas las ratas alimentadas con dieta con 0.1 % Mg murieron antes del día 28; por contra, el 75% de las ratas alimentadas con alto Mg sobrevivieron hasta el día 28 (Figura 5.9B).

**Figura 5.9**



**Figura 5.9.** Curvas de Kaplan Meier en ratas urémicas calcificadas alimentadas dietas con magnesio normal (Mg 0.1%,n=21) o magnesio moderadamente alto (Mg 0.6%, n= 18). Día 0, es el día posterior al protocolo de inducción de calcificación. (A) Supervivencia del día 0 al 14. (B) Supervivencia del día 14 al 28.

Los análisis de bioquímica sanguínea de las ratas los días 0 y 14 se presentan en la **Tabla 5.12.**

**Tabla 5.12. Efecto del magnesio en la dieta sobre la reversión de calcificaciones de aorta.** Parámetros bioquímicos en el los grupos estudiados al momento del sacrificio. (Ver texto para detalles). Media  $\pm$  ES.

	Día 0		Día 14	
	Nx Mg 0.1% (n=10)	Nx Mg 0.1% (n=7)	Nx Mg 0.1% (n=7)	Nx Mg 0.6% (n=9)
<b>Magnesio</b> (mg/dl)	2.4 $\pm$ 0.17	2.3 $\pm$ 0.25	2.3 $\pm$ 0.25	3.1 $\pm$ 0.23 <sup>a*</sup>
<b>Calcio iónico</b> (mmol/l)	1.22 $\pm$ 0.04	1.06 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	1.06 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	1.20 $\pm$ 0.03 <sup>*</sup>
<b>PTH</b> (pg/ml)	284 $\pm$ 55	1401 $\pm$ 312 <sup>b</sup>	1401 $\pm$ 312 <sup>b</sup>	177 $\pm$ 79 <sup>*</sup>
<b>Fósforo</b> (mg/dl)	10.9 $\pm$ 1.00	19.2 $\pm$ 2.59 <sup>b</sup>	19.2 $\pm$ 2.59 <sup>b</sup>	11.3 $\pm$ 0.01 <sup>**</sup>
<b>Creatinina</b> (mg/dl)	2.3 $\pm$ 0.18	1.8 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	1.8 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	2.1 $\pm$ 0.2

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs día 0; <sup>b</sup> $P < 0.001$  vs día 0; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs Mg 0.1% día 14; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs Mg 0.1% día 14.

Los niveles de Mg en plasma se mantuvieron sin cambios en ratas alimentadas con dieta normal en Mg, pero se incrementaron en aquellas ratas que recibieron dieta con 0.6% Mg: 3.1  $\pm$  0.2 mg/dl,  $P < 0.05$  vs 2.4  $\pm$  0.2 mg/dl el día 0. El día 14, las ratas con dieta normal de Mg mostraron una reducción significativa en la concentración de iCa en plasma (1.06  $\pm$  0.06 mmol/l vs 1.22  $\pm$  0.04 mmol/l el día 0), que se acompañó con un aumento en los niveles plasmáticos de PTH (1401  $\pm$  312 pg/ml vs 284  $\pm$  55 pg/ml el día 0) y una marcada hiperfosfatemia. Ni los niveles plasmáticos de iCa ni de PTH cambiaron en las ratas alimentadas con dieta alta en Mg con respecto al día 0.

Cuando se comparó con el día 0, el P en plasma fue significativamente mayor el día 14 en ratas con dieta Mg normal (19.2  $\pm$  2.6 mg/dl vs 10.9  $\pm$  1 mg/dl día 0,

---

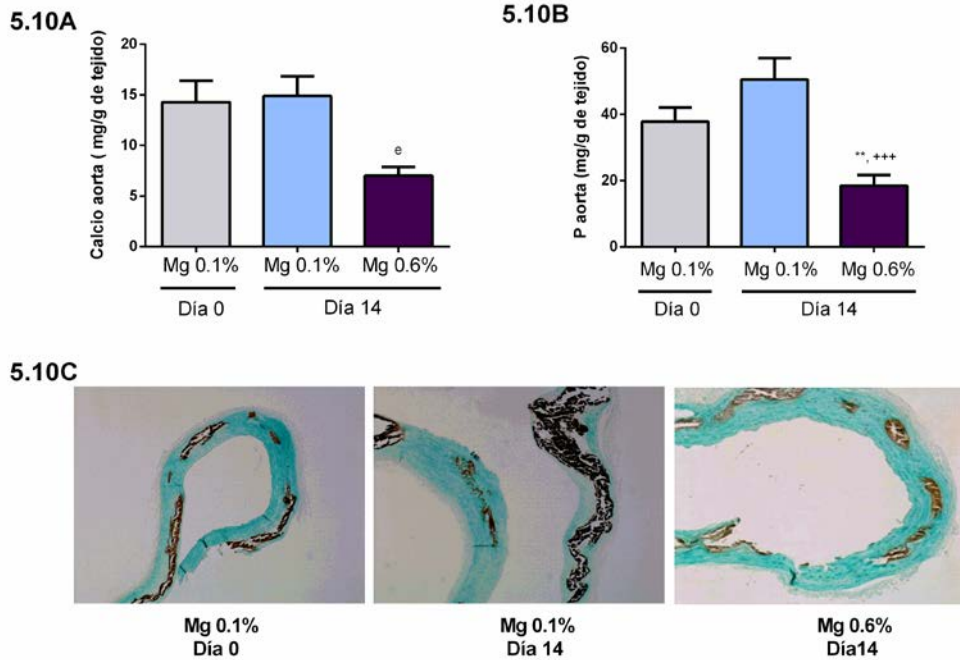
$P < 0.05$ ) pero se mantuvo sin cambios en ratas con dieta 0.6 % Mg ( $11.3 \pm 0.1$  mg/dl vs  $10.9 \pm 1$  mg/dl día 0).

El día 14, las concentraciones de Ca en aorta fueron significativamente menores en las ratas que recibieron una dieta alta en Mg ( $7 \pm 0.9$  mg/g tejido) que en ratas con dieta normal de Mg ( $14.9 \pm 1.9$  mg/g de tejido). Por otra parte, los valores observados el día 14 en las ratas alimentadas con Mg alto fueron también significativamente menores que los valores al día 0 ( $14.3 \pm 2.1$  mg/g de tejido), indicando que el tratamiento con Mg no solamente detuvo, sino que además revirtió la CV (**Figura 5.10A**).

El P en aorta presentó una tendencia similar y los valores en el grupo con alto Mg fueron más bajos que los valores del grupo de Mg 0.1% el día 14 y que el día 0 ( $17.8 \pm 4.23$  mg/g de tejido,  $51 \pm 6.5$  mg/g y  $37.8 \pm 4.23$  mg/g de tejido, respectivamente) (**Figura 5.10B**).

Los hallazgos en las secciones de aorta teñidas con von Kossa fueron consistentes con los datos anteriores; de manera que los depósitos mineral teñidos de color marrón fueron extensos en las ratas alimentadas con Mg normal, mientras que las ratas alimentadas con dietas altas en Mg presentaron un depósito mineral menos marcado que en los grupos sin tratamiento y que el control del día 0, con un patrón “parcheado” de estos depósitos a diferencia del grupo con dieta baja en Mg al día 14 y con el grupo control al día 0 que presentaban un borde continuo de depósito a lo largo de la pared de la aorta. (**Figura 5.10C**).

Figura 5.10



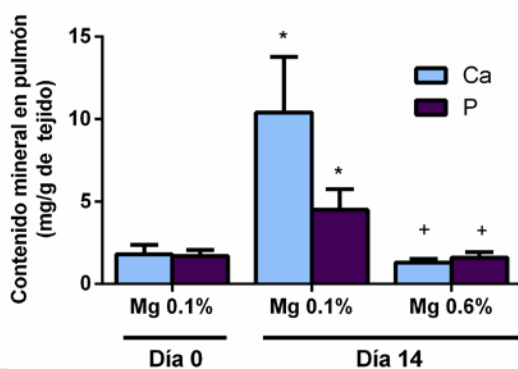
**Figura 5.10. Efecto del magnesio en la dieta sobre la reversión de calcificaciones de aorta** (A) Contenido de calcio aórtico el día 0 y el día 14 en ratas alimentadas con dieta con contenido de Mg normal (0.1%) y moderadamente elevado (0.6%). (B) Contenido de fósforo en aorta el día 0 y el día 14 en ratas alimentadas con dieta con contenido de Mg normal (0.1%) y moderadamente elevado (0.6%). (C) Secciones de aorta teñidas con von Kossa el día 0 y el día 14 en ratas alimentadas con dieta con contenido de Mg normal (0.1%) y moderadamente elevado (0.6%). Media  $\pm$  ES. <sup>e</sup> $P < 0.01$  vs Todos los grupos; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs Mg 0.1% día 0; <sup>+++</sup> $P < 0.001$  vs Mg 0.1% día 14. Día 0 n= 10. Día 14 Mg 0.1% n= 7; Mg 0.9% n= 9.



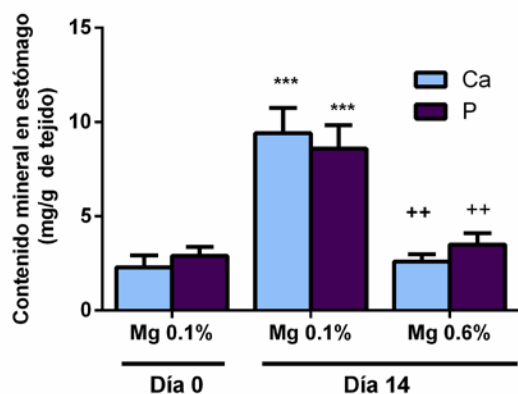
Los efectos beneficiosos del tratamiento con Mg sobre la calcificación extraesquelética también se evidenciaron cuando se estudiaron los depósitos minerales en estómago y pulmones, tal y como lo muestra la **Figura 5.11**.

Figura 5.11

5.11A



5.11B



**Figura 5.11. Efecto del Mg en la dieta sobre la reversión de la calcificación de tejido blando.**

(A) Contenido mineral de pulmones el día 0 y 14 en ratas alimentadas con dieta con contenido de Mg normal (0.1%) y moderadamente elevado (0.6%).

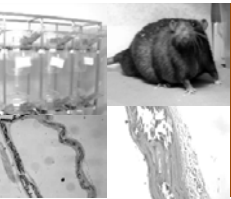
(B) Contenido mineral gástrico al día 0 y 14 en ratas alimentadas con dieta con contenido de Mg normal (0.1%) y moderadamente elevado (0.6%).

Media  $\pm$  ES. \*\*\* $P < 0.001$  vs Mg 0.1% día 0; \* $P < 0.05$  vs. Mg 0.1% día 0; \*\* $P < 0.01$  vs. Mg 0.1% día 14 y + $P < 0.05$  vs Mg 0.1% día 14. Día 0 n= 10. Día 14 Mg 0.1% n= 7; Mg 0.9% n= 9.

El tratamiento con Mg resultó en concentraciones significativamente más bajas de Ca tanto en estómago,  $2.6 \pm 0.4$  vs  $9.3 \pm 1.4$  mg/g de tejido, como en pulmones,  $1.3 \pm 0.2$  vs  $10.4 \pm 3.4$  mg/g de tejido. Tras la suplementación con Mg, el contenido de P en estómago y pulmones cambió de manera paralela al de Ca.

Tal como se reportó anteriormente (ver Figura 5.9), de las 4 ratas del grupo alto Mg que no se sacrificaron el día 14, 3 permanecieron vivas hasta al día 28. El perfil bioquímico (creatinina, iCa y Mg) de estas 3 ratas sobrevivientes fue similar al de las ratas con alto Mg evaluadas el día 14, pero tuvieron niveles significativamente menores de P ( $6.2 \pm 0.7$  mg/dl) y PTH ( $12 \pm 3$  pg/ml) en plasma.

Entre las ratas que recibieron dietas altas en Mg el grado de calcificación de la aorta fue similar el día 14 y 28 ( $7 \pm 0.9$  mg/g de tejido vs  $7.4 \pm 2.1$  mg/g de tejido). Cabe señalar que tanto el Ca en estómago como el Ca en los pulmones fueron mucho más bajos el día 28 que el día 14 (estómago: Ca=  $0.4 \pm 0.2$  mg/g de tejido vs  $2.6 \pm 0.4$  mg/g de tejido; pulmones: Ca=  $0.6 \pm 0.1$  mg/g de tejido vs  $1.3 \pm 0.2$  mg/g de tejido).



## 6. DISCUSIÓN



### **6.1. ESTUDIO 1: Calcificaciones vasculares en un modelo de uremia y obesidad: influencia del estrés oxidativo y del tratamiento con vitamina E**

Tanto la arteriosclerosis como la aterosclerosis son características comunes en pacientes con ERC. Las calcificaciones vasculares (CV) contribuyen en gran medida a la elevada tasa de mortalidad cardiovascular asociada a ERC.<sup>43</sup> En pacientes urémicos, las CV son causadas en parte por desequilibrios en el metabolismo mineral, incluyendo hiperfosfatemia, hipercalcemia y niveles anormales de PTH.<sup>99</sup>

Aunque algunas de las características del síndrome metabólico (diabetes tipo 2, hipertensión, dislipemia, estado proinflamatorio) son factores de riesgo bien conocidos para CV,<sup>300</sup> que nosotros sepamos la influencia de la obesidad sobre las CV no ha sido estudiada en modelos experimentales de uremia. Además, la influencia del estrés oxidativo, una característica consistente del síndrome metabólico, sobre las calcificaciones vasculares y la efectividad de antioxidantes para prevenir el desarrollo de calcificaciones hasta el momento no ha sido estudiada en detalle.

El propósito de este trabajo fue determinar la gravedad de las calcificaciones extraóseas en ratas Zucker urémicas, comparando fenotipos obesos y delgados. Además, se evaluó la influencia de la vitamina E, un antioxidante bien conocido, sobre el desarrollo de calcificaciones tanto en ratas obesas urémicas como en células de musculo liso vascular humanas (CMLVH) cultivadas *in vitro*. La hipótesis de partida era que las ratas urémicas obesas con síndrome metabólico podrían desarrollar calcificaciones extraóseas más graves que las ratas delgadas y

que controlando el estrés oxidativo con vitamina E se podría disminuir la gravedad de las calcificaciones vasculares.

Las ratas Nx-Obesas tuvieron concentraciones ligeramente más elevadas de creatinina en plasma que las ratas Nx-Delgadas. Por tanto, podría argumentarse que la calcificación más severa podría estar relacionada a una menor función renal. Consideramos que este no es el caso y que los niveles mayores de creatinina son, de hecho, una consecuencia de la nefrocalcinosis.<sup>332</sup> Para comprobar esta hipótesis se seleccionaron dos subgrupos (n=10 cada uno) de ratas con niveles comparables de creatinina (rango 0.8-1.3 mg/dl). Aunque en estos subgrupos la creatinina en plasma fue menor en las ratas Nx-Obesas ( $0.97 \pm 0.07$  mg/dl) que en las ratas Nx-Delgadas ( $1.12 \pm 0.05$  mg/dl), el calcio en aorta fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) en los animales Nx-Obesas ( $7.4 \pm 1.3$  mg/g de tejido) que en las ratas Nx-Delgadas ( $2.8 \pm 1.1$  mg/g de tejido).

Cuando se estudiaron los parámetros de metabolismo mineral, la única diferencia entre ratas Nx-Delgadas y Nx-Obesas fue unos niveles más altos de fósforo en plasma en el último grupo. Estos niveles mayores de fósforo se relacionaron con una función renal más comprometida secundaria a depósitos de calcio en el riñón remanente. Nuevamente, cuando se compararon subgrupos con niveles de fósforo similares (Obesas,  $9.1 \pm 0.4$  mg/dl; Delgadas,  $8.2 \pm 0.4$  mg/dl), el calcio en aorta también fue mayor en los animales Nx-Obesos ( $8.1 \pm 1.6$  mg/g de tejido) que en las ratas Nx-Delgadas ( $3.6 \pm 1.3$  mg/g de tejido). La correlación débil entre el fósforo en plasma y el contenido mineral en aorta demuestran que la ligera elevación de fósforo en plasma en ratas Obesas contribuye sólo de manera parcial al desarrollo de las calcificaciones encontradas en este estudio. Además, mientras que el fósforo en plasma correlacionó con los parámetros de calcificación en las

ratas Nx-Delgadas, no correlacionó en las ratas Nx-Obesas. Estos resultados refuerzan el concepto de que las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad desempeñan un rol independiente en el desarrollo de mineralización en tejidos blandos de ratas Nx-Obesas.

Los mecanismos responsables de las graves calcificaciones observadas en las ratas Obesas son difíciles de elucidar y, probablemente, estas calcificaciones sean el resultado final de múltiples alteraciones metabólicas interrelacionadas. A partir de los datos bioquímicos obtenidos en este estudio, las diferencias más importantes en los parámetros bioquímicos del plasma entre ratas Obesas y Delgadas pueden centrarse en: leptina, insulina, perfil lipídico y GPx.

Se ha observado que la leptina promueve la diferenciación de osteoblastos y la mineralización de cultivos primarios de células de músculo liso vascular y calcificación de células vasculares.<sup>414</sup> *In vivo*, se cree que la leptina incrementa el riesgo cardiovascular por promover la diferenciación osteogénica y la calcificación vascular en ratones deficientes en apolipoproteína E.<sup>570</sup> Además, en humanos, los niveles de leptina en plasma han sido asociados con calcificación de la arteria coronaria.<sup>248</sup> Las ratas Zucker Obesas tienen una mutación en el gen receptor de la leptina que da lugar a una afinidad reducida de la leptina e impide la transducción de la señal.<sup>109</sup> Por tanto, aunque se ha demostrado que las ratas Zucker mantienen cierta capacidad para responder a la leptina,<sup>388</sup> la influencia de la hiperleptinemia sobre las calcificaciones encontradas en el presente estudio probablemente sea pequeña.

Aunque la asociación clínica entre diabetes y calcificación vascular ha sido bien establecida,<sup>303</sup> la relación directa entre insulina y calcificación de células de

músculo liso vascular es algo controvertida.<sup>410,554</sup> Un estudio reciente indica que la insulina promueve la diferenciación osteoblástica de las células de músculo liso vascular al incrementar la expresión de RANKL a través de la activación de ERK1/2.<sup>568</sup>

La dislipemia podría contribuir a la gravedad de la calcificación en las ratas Nx-Obesas. Es interesante resaltar que el estudio histológico claramente indica que la calcificación está restringida a la túnica media (arterioesclerosis) sin evidencia de involucrar a la túnica íntima (aterosomatosis). Los pacientes con ERC avanzada presentan ambos tipos de calcificación<sup>13</sup> aunque la arterioesclerosis suele aparecer antes en el curso de la enfermedad sin estar asociada al depósito de lípidos o colesterol.<sup>197</sup> Adicionalmente, se ha reportado que dietas altas en grasas que causan diabetes hiperinsulinémica pueden activar un programa regulatorio transcripcional osteoblástico aórtico que es independiente de la formación de ateroma en la íntima.<sup>535</sup>

Las principales diferencias entre ratas Obesas y Delgadas se centraron en el estrés oxidativo. La disminución en la actividad GPx en plasma de ratas obesas indica que estos animales sufren un severo estrés oxidativo. El incremento en el estrés oxidativo es una complicación bien conocida de la obesidad y el síndrome metabólico.<sup>500</sup> Aunque el estrés oxidativo ha sido asociado a la patogénesis de enfermedades arteriales<sup>208</sup> su influencia sobre las calcificaciones vasculares no ha sido explorada a fondo. Los agentes oxidantes, incluyendo algunas toxinas urémicas, han sido reportados como promotores de la diferenciación osteoblástica de CMLV.<sup>366,385</sup> Por tanto, nos planteamos la hipótesis de que el estrés oxidativo podría ser uno de los principales factores implicados en la gravedad de las calcificaciones observadas en las ratas obesas urémicas y que el tratamiento con



un antioxidante podría reducir las calcificaciones vasculares. Nuestros resultados demuestran que la administración de vitamina E, uno de los antioxidantes naturales mejor conocidos, reduce significativamente el grado de calcificación en ratas obesas. Por otra parte, la disminución en la calcificación está acompañada de un incremento simultáneo de la actividad GPx, no solo en plasma, sino también en tejido cardiovascular. Aunque en base a estos datos parece evidente que el efecto de la vitamina E está ligado a su acción antioxidante, es importante señalar que la vitamina E también reduce los niveles de TNF $\alpha$  en las ratas urémicas. Los reportes de otros investigadores y de nuestro grupo de investigación indican que niveles elevados de TNF $\alpha$  promueven la calcificación vascular.<sup>6,200</sup> Por consiguiente, un efecto antiinflamatorio adicional de la vitamina E, el cual podría ser de ayuda en la prevención de la calcificación, no puede ser excluido. No obstante, es necesario indicar que estrés oxidativo e inflamación tienen una relación estrecha y que pueden amplificar mutuamente sus acciones sobre el sistema vascular.<sup>208</sup>

Se realizaron estudios *in vitro* para determinar si la vitamina E, independientemente de sus efectos antiinflamatorios, era capaz de disminuir directamente la calcificación de CMLV. Estos experimentos revelaron que la reversión del estrés oxidativo por adición de vitamina E tiene un efecto favorable en la prevención de la calcificación de CMLV. Nuestros resultados confirman que las CHMLVs incubadas en un medio con alto fósforo están expuestas a un estrés oxidativo significativo, como lo demuestra el incremento del contenido celular de AGEs y malondialdehído. Este cambio ocurre antes de la transformación fenotípica de las CMLV a células similares a osteoblastos. Estudios previos han demostrado la capacidad del fósforo alto para inducir la producción de especies reactivas de oxígeno en CMLV.<sup>459,521,578</sup> Además, la incubación de estas células

con peróxido de hidrógeno (en presencia de concentraciones basales de fósforo), promueve el cambio de las CMLV de un fenotipo contráctil a un fenotipo osteogénico.<sup>67</sup> Byon y colaboradores reportaron que el estrés oxidativo activa la ruta de señalización PI3K/Akt, induciendo regulación al alza de Cbfa1 y la mineralización de CMLV.<sup>67</sup> En nuestro estudio se encontró que el tratamiento con vitamina E previene el incremento de marcadores de estrés oxidativo, la transdiferenciación osteoblástica y la calcificación de CMLV. La vitamina E ha sido relacionada con la desfosforilación de Akt, resultando en una inhibición de la señalización,<sup>238</sup> implicada en la regulación al alza de Cbfa1. En nuestro estudio, la vitamina E reguló a la baja la expresión de Cbfa1 en CMLV cultivadas en alto fósforo. Todos estos datos sugieren que el estrés oxidativo desempeña un papel importante en la señalización temprana de la calcificación vascular.

## 6.2 ESTUDIO 2: Trastornos del equilibrio ácido-base en ratas con calcificación vascular.

El propósito de este estudio era describir el equilibrio ácido-base en ratas con CV y correlacionar los parámetros que definen el balance ácido-base con CV. La hipótesis planteada es que se encontraría un correlación fuerte entre equilibrio ácido-base y CV.

Con el protocolo experimental descrito en este estudio las ratas Nx 5/6 no desarrollaron acidosis, como clásicamente se ha descrito en seres humanos y animales urémicos,<sup>215,280,561</sup> sino más bien alcalosis. La razón para esta tendencia a la alcalosis es desconocida, pero podría estar relacionada con la gravedad de la calcificación extraesquelética. La relación entre alcalosis y calcificación parece ser bidireccional, por un lado, la alcalosis promueve la calcificación y, por otro, la calcificación puede incrementar el pH sanguíneo. El incremento del pH sanguíneo en animales con calcificación de tejidos blandos puede deberse a que en el proceso de calcificación algunos minerales son desviados desde hueso hacia tejido extraóseo<sup>209</sup> y en este proceso hay transferencia de *buffer* óseo al líquido extracelular. No obstante, la presencia simultánea de alcalosis y calcificación refuerza el concepto de que la acidificación del líquido extracelular es una intervención válida para prevenir y tratar las CV.<sup>355</sup>

Sin embargo, es interesante resaltar que en un rango amplio de pH (7.1 a 7.9) el estado ácido-base no se correlaciona con los parámetros de calcificación. Este hallazgo puede indicar que, aunque el equilibrio ácido-base influye en la calcificación, otros factores como el grado de uremia o hiperparatiroidismo

secundario tienen una contribución relativamente mayor al desarrollo de calcificación vascular.

Aunque los valores medios de AG en ratas Nx 5/6 estuvieron en los rangos de referencia del grupo control, de forma individual las ratas urémicas tuvieron un AG elevado que estaba asociado con calcificaciones más graves. Se ha reportado que el incremento en AG está vinculado a un mayor riesgo de muerte en pacientes urémicos.<sup>2</sup> La hiperfosfatemia, una de las características principales en las ratas urémicas, contribuye a la elevación del AG. Por otro lado, el AG elevado es probable que esté asociado a un incremento en los aniones no identificados/no medidos (ej., toxinas urémicas). La correlación positiva entre AG y el depósito mineral en los vasos sanguíneos sugiere que el equilibrio de electrolitos es importante en el desarrollo de calcificaciones vasculares. Los mecanismos por los que se podrían vincular las CV y AG no están claros, pero el receptor sensor de calcio (RSCa) podría estar implicado. El RSCa, el cual se expresa en la pared vascular y desempeña un rol en el desarrollo de las CV,<sup>375,376</sup> puede sentir cambios en la fuerza iónica independientemente de las variaciones en la osmolaridad.<sup>434</sup> La activación de RSCa por calcimiméticos ha demostrado brindar beneficios en la prevención de CV.<sup>332</sup> Por consiguiente, los cambios en el balance iónico del líquido extracelular pueden influir en las CV a través de las interacciones con el RSCa.

Es importante señalar que el tipo de acidosis que se ha reportado que tiene efectos benéficos sobre calcificaciones es la acidosis hiperclorémica<sup>355</sup> en la cual no se presenta un incremento en AG.

Por tanto, podría ser interesante realizar futuros estudios para determinar:

- a) El rol de los iones no identificados (ej., toxinas urémicas) sobre las calcificaciones.
  
- b) El rol de electrolitos individuales que influyen en el anión gap (Na, K, y Cl) y la fuerza iónica sobre las calcificaciones vasculares.

### **6.3. ESTUDIO 3: Efecto del magnesio en la dieta sobre la prevención y reversión de calcificaciones vasculares y de tejidos blandos en ratas urémicas.**

Los quelantes de fósforo son utilizados comúnmente para controlar los niveles plasmáticos de fósforo en pacientes urémicos. Los quelantes que contienen Mg han demostrado ser efectivos en el control del P sérico.<sup>511,512</sup>

Otros investigadores y nosotros hemos descrito que *in vitro* el Mg reduce la calcificación de células de músculo liso vascular (CMLV) cultivadas en medio con concentraciones elevadas de fósforo<sup>279,378,380,468</sup> y disminuye el crecimiento de cristales de hidroxapatita.<sup>139</sup> La inhibición del transporte de Mg en el interior de la célula bloquea el efecto protector del Mg en CMLV en ambientes procalcificantes, indicando que el Mg ejerce su efecto protector de manera activa a nivel intracelular.<sup>378,380</sup> *In vivo*, el Mg puede proteger contra la CV al disminuir el P sérico. Además, el Mg modula trastornos metabólicos asociados a uremia (como la resistencia a la insulina y el estrés oxidativo) los cuales pueden favorecer el desarrollo de CV en ratas con fallo renal.

Investigaciones recientes muestran una clara asociación entre hipomagnesemia y mortalidad en pacientes con ERC.<sup>467</sup> Las concentraciones plasmáticas de Mg han sido asociadas inversamente con evento cardiovascular.<sup>268</sup> Los pacientes con niveles bajos de Mg plasmático tienen mayor riesgo de enfermedad arterial coronaria.<sup>315</sup> Además, en un estudio prospectivo, Ascerio *et al.*, encontraron una asociación negativa entre el consumo de Mg en la dieta y el riesgo de accidente cerebrovascular.<sup>22</sup> En pacientes en hemodiálisis no diabéticos, la hipomagnesemia está asociada con CV de arterias periféricas, independiente de los niveles de Ca y P plasmáticos.<sup>251, 252</sup>

La calcificación anular mitral y el incremento en el grosor de la íntima-media de la carótida han sido asociados con niveles bajos de Mg en pacientes en hemodiálisis.<sup>542,543</sup> A la inversa, un incremento moderado en el Mg sérico parece tener efectos protectores sobre la CV y las tasas de mortalidad en pacientes con ERC. Se ha reportado que la suplementación con Mg a largo plazo reduce el grosor de la íntima-media de la arteria carótida y por tanto puede retardar la progresión de la enfermedad vascular.<sup>541</sup> Por tanto, el Mg puede reducir la mortalidad debido a su efecto protector cardiovascular, incluyendo sus acciones sobre CV.

El presente estudio se realizó para determinar si la adición de Mg en la dieta de ratas con fallo renal:

- a) Protege contra el desarrollo de CV.
- b) Tiene algún efecto negativo sobre el hueso.
- c) Previene la progresión y revierte las calcificaciones vasculares y de tejidos blandos.

Este estudio en ratas urémicas proporciona varios resultados interesantes, todos ellos sugieren que la suplementación de la dieta con Mg podría tener efectos beneficiosos en la ERC. El incremento en el Mg en la dieta de ratas Nx disminuyó el P y la PTH en plasma, redujo dramáticamente la calcificación vascular y de otros tejidos blandos y disminuyó la magnitud del fallo renal. Además, en ratas con CV ya existente, la adición de Mg a la dieta fue capaz de revertir calcificaciones extraesqueléticas y reducir la mortalidad en un corto periodo de tiempo.

Es difícil separar el efecto de la suplementación con Mg sobre la calcificación del efecto sobre la reducción de la fosfatemia. Sin embargo, aunque el P en plasma disminuyó en las ratas que recibieron Mg, la hiperfosfatemia persistió aún en la dieta con mayor contenido de Mg. Además, la regresión de la calcificación extraesquelética se observó en ratas suplementadas con Mg que tuvieron fosfatemia persistentemente elevada.

En ratas Nx con dieta normal de Mg 0.1%, la creatinina en plasma estaba muy elevada. La hiperfosfatemia con marcada calcificación vascular y de tejidos blandos probablemente contribuyó al avance del fallo renal. El incremento del Mg en la dieta a 0.3% resultó en una reducción de la creatinina en plasma que estuvo asociada con valores más bajos de P en plasma y la virtual eliminación de la calcificación de aorta y estómago. Cabe resaltar que los valores de PTH no disminuyeron significativamente en este grupo a pesar de que el iCa fue mayor que en el grupo Nx- Mg 0.1%. El incremento del contenido de Mg en la dieta no resultó en un descenso de la creatinina en plasma, pero si se observó una eventual normalización de los valores de PTH. Es importante resaltar que en el grupo Nx- Mg 0.9% se observó la normalización de la PTH a pesar de que los animales consumían dieta alta en P y la hiperfosfatemia persistió.

Estos últimos resultados sugieren que la hipermagnesemia, tal y como se ha reportado en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, podría suprimir la secreción de PTH a través de su acción sobre el RSCa especialmente cuando los niveles séricos de iCa son bajos.<sup>57,90,347,454</sup>

Sin embargo, no tenemos evidencia de estudios previos que muestren una marcada reducción en la PTH por sobrecarga de Mg/hipermagnesemia en



animales urémicos con hiperparatiroidismo secundario provocado por sobrecarga de P. La magnitud de la hiperfosfatemia se podría haber modificado por la dieta alta en Mg ya que el Mg es un quelante efectivo del fósforo.<sup>112,119</sup> Es interesante destacar que las concentraciones de iCa se incrementaron hasta alcanzar valores normales en los animales que recibieron dietas altas en Mg. Nuestros datos no permiten determinar si el aumento de iCa se produjo por mayor secuestro de P por el Mg a nivel intestinal, por menor unión del Ca con el P, o menor depósito del Ca en hueso. Los valores de calcitriol fueron menores en las ratas Nx que en las controles, pero no se observaron diferencias entre las ratas Nx. Por tanto, el calcitriol no parece haber afectado la absorción intestinal de Mg, Ca y P, ni los valores de PTH y FGF23. En las ratas Nx, los valores de FGF23 fueron mayores que en las ratas control, pero entre las ratas Nx, se detectó una a variación muy amplia en los valores de FGF23 sin encontrarse diferencia significativa entre estos grupos.

La calcificación en aorta y estómago fue evaluada a través de dos métodos: a) cuantificación directa del Ca y P, por disolución del tejido en ácido fórmico y clorhídrico, y b) por tinción histológica para Ca-P. Ambos métodos arrojaron resultados similares. En ratas Nx con dieta 0.1% Mg, se observaron calcificaciones extensas en aorta y estómago. Cuando el Mg en la dieta se incrementó a 0.3% o más, las calcificaciones en aorta y estómago fueron de 20 a 40 veces menores que en los animales con dieta 0.1% Mg y no se observaron diferencias al compararlas con las ratas control. Estudios previos *in vitro* y en animales han demostrado que el Mg inhibe la calcificación de células de músculo liso vascular<sup>279,338,380,468</sup> en ratones con predisposición genética a calcificación<sup>188,292</sup> así como en injertos de aorta de ratas<sup>481</sup> y en ratas urémicas.<sup>115</sup> Estudios clínicos también han sugerido que la suplementación con Mg puede tener efectos

favorables sobre calcificación vascular y enfermedad no cardiovascular en pacientes con ERC.<sup>268,468</sup>

Se ha especulado que un efecto adverso potencial de la hipermagnesemia podría ser el deterioro en la mineralización ósea.<sup>104,269</sup> En los datos limitados disponibles en este estudio, no se observó evidencia de que el Mg causara enfermedad ósea adinámica. En las ratas Nx con dietas 0.6% Mg no se encontró reducción en el número de osteoblastos ni la superficie osteoide presentó cambios significativos. En las ratas que recibieron dieta 0.6% Mg la superficie resorptiva se redujo lo cual se puede corresponder con los cambios observados en la PTH. De manera similar, a pesar de la reducción de la PTH en el grupo Mg 0.6 %, no se observó una reducción en la superficie de osteoblastos. Un trabajo reciente en ratas urémicas demostró que el Mg puede prevenir la calcificación sin causar enfermedad ósea adinámica. Los autores también observaron un aumento en la superficie osteoide, sin embargo la superficie de osteoblástica y la tasa de crecimiento óseo no estaba afectada. Los investigadores indican que el aumento de la superficie osteoide podría deberse a disminución de la carga de P, más que a un efecto directo del Mg sobre el hueso.<sup>400</sup>

Además de los beneficios potenciales sobre la calcificación de tejidos blandos y sobre la enfermedad vascular en general, el Mg también es un quelante de fósforo efectivo y barato.<sup>119,112</sup> Se ha planteado que niveles excesivamente elevados de Mg podrían producir supresión de la PTH<sup>396,454</sup> y osteomalacia.<sup>184</sup> Con hipermagnesemia severa pueden ocurrir las siguientes alteraciones: hipocalcemia, hipotensión, bloqueo del sistema de conducción cardíaca y parálisis muscular y respiratoria.<sup>373</sup> Sin embargo, estas últimas condiciones se presentan con poca frecuencia. En pacientes en hemodiálisis, los niveles de Mg pueden ser

controlados por la concentración de Mg en el dializado.<sup>184</sup> En pacientes con ERC de moderada a avanzada el exceso de Mg puede ser compensado parcialmente por un incremento en la excreción renal.

En el presente estudio se observó la inhibición de las calcificaciones en aorta y estómago en las ratas Nx que recibieron dietas con incrementos moderados en la concentración de Mg de 0.1% a 0.3%. En estos animales, la concentración de Mg en plasma no fue significativamente diferente del promedio del Mg plasmático en ratas Nx con dieta 0.1% Mg. Sin embargo, la creatinina plasmática fue menor en las ratas Nx con dieta 0.3% Mg. Si el Mg, independientemente de sus efectos sobre la reducción del P, es definitivamente un inhibidor de la calcificación vascular sin efectos adversos sobre el hueso, es importante considerar si la suplementación con Mg puede ser segura para pacientes con ERC moderada a grave. Por tanto la monitorización del Mg sanguíneo podría llegar a ser muy importante.

Nuestro estudio también ha demostrado, por primera vez, que la suplementación con Mg fue capaz de revertir calcificaciones vasculares y de tejidos blandos ya establecidas. Por tanto, si estas acciones protectoras se confirman, el Mg podría ser considerado como un agente terapéutico en pacientes con CV por acciones más allá de su actividad quelante de P.

La capacidad de revertir calcificaciones extraesqueléticas es un desafío clínico en pacientes con ERC. Sin embargo, son pocas las opciones terapéuticas disponibles capaces de lograr la reversión de calcificaciones de tejidos blandos. Existen reportes previos en la literatura sobre el uso de quelantes, como el tiosulfato de sodio, para tratar o retardar la progresión de CV.<sup>120,306,567</sup>

También se ha reportado que los calcimiméticos pueden ser efectivos en el tratamiento de CV en modelos animales.<sup>334</sup> Sin embargo, un estudio clínico sugirió que los calcimiméticos no disminuyen significativamente la progresión de las calcificaciones al ser comparados con tratamientos convencionales.<sup>87</sup>

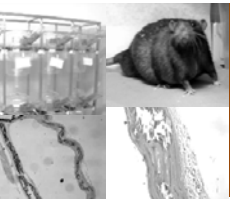
Resulta interesante señalar que en nuestro estudio la regresión de CV promovida por el Mg ocurrió con un descenso paralelo en los parámetros bioquímicos en plasma relacionados con hiperparatiroidismo secundario. Así, los niveles de PTH en plasma fueron significativamente menores en ratas el día 14 al compararlas con el día 0. En pacientes en hemodiálisis después de ser sometidos a paratiroidectomía, se ha descrito la regresión parcial de calcificaciones cardíacas y pulmonares<sup>127</sup> y la resorción completa de calcificación de tejidos blandos abdominales.<sup>466</sup> Por tanto, la supresión marcada de la PTH que observamos en nuestras ratas urémicas después de la suplementación dietética de Mg pudo haber influido en la regresión de la CV.

Sin embargo, además de la normalización de los parámetros del metabolismo mineral, el Mg podría también haber promovido la regresión de CV por mecanismos directos. Aunque los mecanismos involucrados en la reversión de la CV no se han elucidado completamente, un efecto mediado por el RSCa se ha postulado en un estudio con calcimiméticos.<sup>334</sup> De manera similar al calcimimético, el Mg también es capaz de interactuar con el RSCa, de tal manera que podrían compartir algunos mecanismos relacionados con la capacidad para revertir CV.

Es relevante indicar que Bas *et al*, observaron que en ratas no urémicas la calcificación inducida por calcitriol revierte espontáneamente con el tiempo.<sup>32</sup>

Estudios previos de nuestro laboratorio, que originalmente pretendían evaluar la prevención de las CV, muestran la capacidad de distintos tratamientos (calcimiméticos, acidificación del medio interno) para revertir CV.<sup>334,355</sup> Los datos reportados en el presente estudio sobre el Mg refuerzan el concepto de que la regresión de las CV puede ocurrir espontáneamente una vez controlados los factores que la originan, en este caso por una suplementación dietética de Mg.





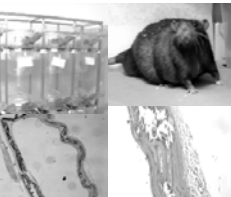
## 7. CONCLUSIONES





1. Los procesos de calcificación extraesquelética son mucho más graves en ratas urémicas obesas que en ratas urémicas delgadas.
2. El estrés oxidativo asociado a la obesidad contribuye al desarrollo de calcificaciones extraesqueléticas en ratas urémicas obesas.
3. El tratamiento con vitamina E reduce el estrés oxidativo y las calcificaciones tanto en ratas urémicas obesas como en cultivos de células de músculo liso vascular.
4. En ratas urémicas, no se observa correlación entre el pH sanguíneo y la calcificación vascular, pero los procesos de calcificación vascular asociados a la uremia correlacionan positivamente con el anión gap sanguíneo.
5. El incremento en los niveles de magnesio de la dieta reduce, de forma dosis dependiente, las calcificaciones vasculares y de otros tejidos blandos en ratas urémicas.
6. La suplementación de magnesio en la dieta, en niveles suficientes para prevenir la calcificación extraesquelética, no produce efectos negativos sobre el hueso.
7. En ratas urémicas con calcificación vascular preexistente, la suplementación de magnesio en la dieta reduce la mortalidad y la magnitud de las calcificaciones extraesqueléticas.



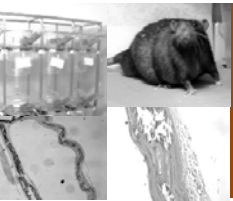


## 8. RESUMEN



Esta Tesis Doctoral se diseñó para evaluar diversos factores que influyen en la etiopatogenia (obesidad, estrés oxidativo, alteración del estado ácido-base) y en el tratamiento (suplementos dietéticos con vitamina E y magnesio) de la calcificación vascular (CV) y de otros tejidos blandos que tiene lugar en la enfermedad renal crónica. Utilizando modelos experimentales de roedores con obesidad y uremia hemos demostrado que la obesidad promueve la CV debido a un incremento de estrés oxidativo, y que la suplementación de vitamina E en la dieta previene el estrés oxidativo y la calcificación. Además, *in vitro*, la vitamina E también redujo el estrés oxidativo y evitó la calcificación y la transformación hacia un fenotipo osteogénico en células de músculo liso vascular. En ratas urémicas calcificadas no se observó correlación entre el contenido de calcio en aorta y el pH sanguíneo, pero la CV correlacionó positivamente con el anión gap plasmático. Por último, en modelos experimentales de ratas nefrectomizadas, el suplemento de magnesio en la dieta no sólo consiguió controlar la hiperfosfatemia sino que además redujo las calcificaciones extraóseas de forma dosis-dependiente sin que se pudieran observar efectos negativos sobre el hueso. Más aún, el incremento del magnesio en la dieta fue capaz de revertir CV en ratas urémicas previamente calcificadas.





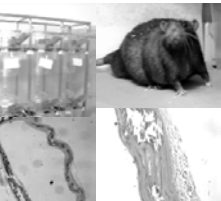
## 9. SUMMARY





This Doctoral Thesis was aimed at evaluating several factors that may influence the pathogenesis (obesity, oxidative stress, altered acid-base balance) and treatment (dietary vitamin E and magnesium supplementation) of vascular calcification (VC) and other extraskeletal calcifications secondary to chronic renal failure. Using rodent models of obesity and uremia we demonstrated that obesity promotes VC through increased oxidative stress, and that dietary vitamin E supplementation decreased oxidative stress and extraskeletal mineral deposits. Moreover, *in vitro*, vitamin E also prevented calcification and phenotypic transition of vascular smooth muscle cells to osteogenic phenotype by reducing oxidative stress. In uremic rats with VC, aortic mineralization did not correlate with blood pH but was positively correlated with plasma anion gap. Finally, in experimental models of nephrectomized rats, dietary magnesium supplementation not only was effective in controlling hyperphosphatemia but also reduced VC in a dose-dependent manner without negative effects on bone. Furthermore, increased dietary magnesium reversed extraskeletal calcifications in uremic rats with preexisting VC.





## 10. REFERENCIAS



1. Abed E, Martineau C, Moreau R. Role of melastatin transient receptor potential 7 channels in the osteoblastic differentiation of murine MC3T3 cells. *Calcif Tissue Int.* 2011; 88: 246–253.
2. Abramowitz MK, Thomas H, Hostetter TH, and Melamed, ML: The serum anion gap is altered in early kidney disease and associates with mortality. *Kidney International.* 2012; 82: 701–709.
3. Abzhanov A, Rodda SJ, McMahon AP, Tabin CJ. Regulation of skeletogenic differentiation in cranial dermal bone. *Development.* 2007; 134: 3133–3144.
4. Adijiang A, Shimizu H, Higuchi Y, Nishijima F, Niwa T. Indoxyl sulfate reduces klotho expression and promotes senescence in the kidneys of hypertensive rats. *J Ren Nutr.* 2011; 21: 105–109.
5. Ahmadi A, Mazooji N, Roozbeh J, Mazloom Z, Hasanzade J. Effect of alpha-lipoic acid and vitamin E supplementation on oxidative stress, inflammation, and malnutrition in hemodialysis patients. *Iran J Kidney Dis.* 2013; 7: 461-7.
6. Al-Aly Z, Shao JS, Lai CF, Huang E, Cai J, Behrmann A, Cheng SL, and Towler DA: Aortic MSX2-Wnt calcification cascade is regulated by TNF-alpha-dependent signals in diabetic Ldlr<sup>-/-</sup> mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27: 2589– 2596.
7. Alam MU, Kirton JP, Wilkinson FL, Towers E, Sinha S, Rouhi M, Vizard TN, Sage AP, Martin D, Ward DT, Alexander MY, Riccardi D, Canfield AE. Calcification is associated with loss of functional calcium-sensing receptor in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 2009; 81: 260–268.
8. Arroyo R: Electrolyte and acid-base balance disorders in advanced chronic kidney disease. *Nefrologia.* 2008; 28 Suppl 3: 87-93 (Article in Spanish).
9. Alexander MP, Patel TV, Farag YM, Florez A, Rennke HG, Singh AK. Kidney pathological changes in metabolic syndrome: a cross-sectional study. *Am J Kidney Dis.* 2009; 53: 751–759.
10. Alfrey AC, Miller NL, Trow R. Effect of age and magnesium depletion on bone magnesium pools in rats. *J Clin Invest.* 1974; 54: 1074-81.
11. Allen DB, Friedman AL, Greer FR, Chesney RW. Hypomagnesemia masking the appearance of elevated parathyroid hormone concentrations in familial pseudohypoparathyroidism. *Am J Med Genet.* 1988; 31: 153–158.
12. Almadén Y, Canalejo A, Hernández A, Ballesteros E, García-Navarro S, Torres A and Rodríguez M. Direct effect of phosphorus on PTH secretion from whole rat parathyroid glands in vitro. *J Bone Miner Res.* 1996; 11: 970-976.
13. Amann K. Media calcification and íntima calcification are distinct entities in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008; 3: 1599-1605.

14. An WS, Kim HJ, Cho KH, Vaziri ND. Omega-3 fatty acid supplementation attenuates oxidative stress, inflammation, and tubulointerstitial fibrosis in the remnant kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009; 297: F895-903.
15. Anast CS, Forte LF. Parathyroid function and magnesium depletion in the rat. *Endocrinology*. 1983; 113: 184-189.
16. Anast CS, Winnacker JL, Forte LR, Burns TW. Impaired release of parathyroid hormone in magnesium deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1976; 42: 707-717.
17. Andrukhova O, Slavic S, Smorodchenko A, Zeitz U, Shalhoub V, Lanske B, Pohl EE, Erben RG. FGF23 regulates renal sodium handling and blood pressure. *EMBO Mol Med*. 2014; 6:744-59.
18. Anilil Y y Brubaker PL. Role of Leptin in the regulation of Glucagon-like peptide-1 secretion. *Diabetes*. 2003; 52: 252- 259.
19. Ankeny RF, Thourani VH, Weiss D, Vega JD, Taylor WR, Nerem RM, Jo H. Preferential activation of SMAD1/5/8 on the fibrosa endothelium in calcified human aortic valves--association with low BMP antagonists and SMAD6. *PLoS One*. 2011; 6: e20969.
20. Arner P. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of thiazolidinediones. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2003; 14: 137-145.
21. Arnett T. Regulation of bone cell function by acid-base balance. *Proc Nutr Soc*. 2003; 62: 511-20.
22. Ascherio A, Rimm EB, Hernán MA, Giovannucci EL, Kawachi I, Stampfer MJ, Willett WC. Intake of potassium, magnesium, calcium, and fiber and risk of stroke among US men. *Circulation*. 1998; 98: 1198-1204.
23. Aschner P. Metabolic syndrome as a risk factor for diabetes. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2010; 8: 407-412.
24. Atamer A, Kocyigit Y, Eceder SA, Selek S, Ilhan N, Eceder T, Atamer Y. Effect of oxidative stress on antioxidant enzyme activities, homocysteine and lipoproteins in chronic kidney disease. *J Nephrol*. 2008; 21: 924-30.
25. Austin LA, Heath H. Calcitonin: physiology and pathophysiology. *N Engl J Med*, 1981; 304: 269-278.
26. Axel DI, Riessen R, Runge H, Viebahn R, Karsch KR. Effects of cerivastatin on human arterial smooth muscle cell proliferation and migration in transfilter cocultures. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000; 35: 619-29.
27. Azzi A, Gysin R, Kempná P, Munteanu A, Negis Y, Villacorta L, Visarius T, Zingg JM. Vitamin E mediates cell signaling and regulation of gene expression. *Ann NY Acad Sci*. 2004; 1031: 86-95.

28. Badman MK, Pissios P, Kennedy AR, Koukos G, Flier JS, Maratos-Flier E. Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab.* 2007; 5: 426-37.
29. Bailey JL. Insulin resistance and muscle metabolism in chronic kidney disease. *ISRN Endocrinol.* 2013; 2013: 329606.
30. Bajwa A, Horst RL, Beckman MJ. Gene profiling the effects of calcium deficiency versus 1, 25-dihydroxyvitamin D induced hypercalcemia in rat kidney cortex. *Arch Biochem Biophys.* 2005; 438: 182–194.
31. Bartlett P, Van Buren J, Bartlett A, Zhou C. Case-Control Study of Risk Factors Associated with Feline and Canine Chronic Kidney Disease. *Veterinary Medicine International.* 2010; 957570.
32. 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.* 2006; 21: 484-490.
33. Becker B, Kronenberg F, Kielstein JT, Haller H, Morath C, Ritz E, Fliser D; MMKD Study Group. Renal insulin resistance syndrome, adiponectin and cardiovascular events in patients with kidney disease: the mild and moderate kidney disease study. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16: 1091-8.
34. Belgardt BF, Brüning JC. CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1212: 97-113.
35. Ben Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, Goetz R, Kuro-o M, Mohammadi M, Sirkis R, Naveh-Many T, Silver J. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest.* 2007; 117: 4003-8.
36. Berg AH y Scherer P E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res.* 2005; 96: 939–949.
37. Bergman RN, Kim SP, Catalano KJ, Hsu IR, Chiu JD, Kabir M, Huckling K, Ader M. Why visceral fat is bad: mechanisms of the metabolic syndrome. *Obesity* (Silver Spring). 2006; 14 (Suppl. 1), 16S–19S.
38. Bhan I, Shah A, Holmes J, Isakova T, Gutierrez O, Burnett SM, Jüppner H, Wolf M. Post-transplant hypophosphatemia: tertiary hyperphosphatoinism? *Kidney Int* 2006; 70: 1486-94
39. Bisbal C, Lambert K, Avignon A. Antioxidants and glucose metabolism disorders. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care.* 2010; 13: 439-446.
40. Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, London GM. Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension.* 2001; 38: 938–942.
41. Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, Safar ME, London GM. Impact of aortic stiffness on survival in end-stage renal disease. *Circulation.* 1999; 99: 2434–2439.

42. Bland R, Walker EA, Hughes SV, Stewart PM, Hewison M. Constitutive expression of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1 $\alpha$ -hydroxylase in a transformed human proximal tubule cell line: evidence for direct regulation of vitamin D metabolism by calcium. *Endocrinology*. 1999; 140: 2027–34.
43. Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie EG, Chertow GM. Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15: 2208-2218.
44. Boenisch O, Ehmke KD, Heddergott A, Naoum C, Frei U, Schindler R. C-reactive-protein and cytokine plasma levels in hemodialysis patients. *J Nephrol*. 2002; 15(5): 547-51.
45. Boskey AL, Rimnac CM, Bansal M, Federman M, Lian J, Boyan BD. Effect of short-term hypomagnesemia on the chemical and mechanical properties of rat bone. *J Orthop Res*. 1992; 10: 774–783.
46. Boström K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest*. 1993; 91: 1800–1809.
47. Boström KI, Rajamannan NM, Towler DA. The regulation of valvular and vascular sclerosis by osteogenic morphogens. *Circ. Res*. 2011; 109: 564–577.
48. Boström K. Proinflammatory vascular calcification. *Circ. Res*. 2005; 96: 1219–1220.
49. Bover J, Jara A, Trinidad P, Rodríguez M, Martín-Malo A, Felsenfeld AJ. The calcemic response to PTH in the rat: effect of elevated PTH levels and uremia. *Kidney Int*. 1994; 46: 310-317.
50. Brandao-Burch A, Utting JC, Orriss IR, Arnett TR. Acidosis inhibits bone formation by osteoblasts in vitro by preventing mineralization. Brandao-Burch A, Utting JC, Orriss IR, Arnett TR. *Calcif Tissue Int*. 2005; 77: 167-74.
51. Brasier AR, Wang CA and Nussbaum SR. Recovery of parathyroid hormone secretion after parathyroid adenomectomy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988; 66: 495- 500.
52. Brent GA, LeBoff MS, Seely EW, Conlin PR and Brown EM. Relationship between the concentration and rate of change of calcium and serum intact parathyroid hormone levels in normal humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988; 67: 944-950.
53. Brewer LC, Michos ED, Reis JP. Vitamin D in atherosclerosis, vascular disease, and endothelial function. *Curr. Drug Targets*. 2011; 12, 54–60.
54. Brigelius-Flohé R. Vitamin E: the shrew waiting to be tamed. *Free Radic Biol Med*. 2009; 46: 543-54.
55. Brown AJ, Zhong M, Finch J, Ritter C, McCracken R, Morrissey J, Slatopolsky E. Rat calcium-sensing receptor is regulated by vitamin D but not by calcium. *Am J Physiol*. 1996; 270: F454–F460.
56. Brown EM and McLeod RJ. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev*. 2001; 81: 239-297.



57. Brown EM, Pollak M, Seidman CE, Seidman JG, Wu Chou YH, Riccardi D and Hebert SC. Calcium-ion-sensing cell-surface receptors. *N Engl J Med.* 1995; 333: 234- 240.
58. Brown EM. Extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of  $\text{Ca}^{2+}$  and other ions as extracellular (first) messengers. *Physiol Rev.* 1991; 71: 371–411.
59. Brown EM. Relationship of 3, 5'-adenosine monophosphate accumulation to parathyroid hormone release in dispersed cells from pathological human parathyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* 1981; 52: 961–968.
60. Brown EM. Homeostatic mechanisms in regulating extracellular and intracellular calcium metabolism. In: Bilezikian, JP, Marcus R and Levine MA, eds. *The parathyroids: basic and clinical concepts*, 15-54. *Raven Press*, New York, 1994.
61. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 2005; 54: 1615–1625.
62. Buendía P, Montes de Oca A, Madueño JA, Merino A, Martín-Malo A, Aljama P, Ramírez R, Rodríguez M, Carracedo J. Endothelial microparticles mediate inflammation-induced vascular calcification. *FASEB J.* 2014; pii: fj.14-249706.
63. Buján J, Bellón JM, Sabater C, Jurado F, García-Honduvilla N, Domínguez B, Jorge E. Modifications induced by atherogenic diet in the capacity of the arterial wall in rats to respond to surgical insult. *Atherosclerosis.* 1996; 122, 141–152.
64. Burke AP, Kolodgie FD, Farb A, Weber D, Virmani R. Morphological predictors of arterial remodeling in coronary atherosclerosis. *Circulation.* 2002; 105, 297–303.
65. Burton GW, Joyce A, Ingold KU. Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch Biochem Biophys.* 1983; 221:281-90.
66. Bustos C, Hernández-Presa MA, Ortego M, Tuñón J, Ortega L, Pérez F, Díaz C, Hernández G, Egido J. HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 1998; 32: 2057-64.
67. Byon CH, Javed A, Dai Q, Kappes JC, Clemens TL, Darley-Usmar VM, McDonald JM, Chen Y. Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *J Biol Chem.* 2008; 283(22):15319-27.
68. Cachofeiro V, Goicochea M, de Vinuesa SG, Oubiña P, Lahera V, Luño J. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney Int Suppl.* 2008; (111):S4-9.
69. Cai Y, Xu MJ, Teng X, Zhou YB, Chen L, Zhu Y, Wang X, Tang CS, Qi YF. Intermedin inhibits vascular calcification by increasing the level of matrix gamma-carboxyglutamic acid protein. *Cardiovasc Res.* 2010; 85: 864–73.
70. Calder PC, Albers R, Antoine JM, Blum S, Bourdet-Sicard R, Ferns GA, Folkerts G, Friedmann PS, Frost GS, Guarner F, Løvik M, Macfarlane S, Meyer PD, M'Rabet L, Serafini

- M, van Eden W, van Loo J, Vas Dias W, Vidry S, Winklhofer-Roob BM, Zhao J. Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *Br J Nutr*. 2009; 101 Suppl 1: S1–S45.
71. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. 1995; 269 (5223): 546-9.
  72. Canaff L, Hendy GN. Human calcium-sensing receptor gene. Vitamin D response elements in promoters P1 and P2 confer transcriptional responsiveness to 1, 25 dihydroxyvitamin D. *J Biol Chem*. 2002; 277: 30337–30350.
  73. Canalejo R, Canalejo A, Martinez-Moreno JM, Rodriguez-Ortiz ME, Estepa JC, Mendoza FJ, Munoz-Castaneda JR, Shalhoub V, Almaden Y, Rodriguez M. FGF23 fails to inhibit uremic parathyroid glands. *J Am Soc Nephrol*. 2010; 21: 1125-35.
  74. Canfield A, Doherty MJ, Wood AC, Farrington C, Ashton B, Begum N, Harvey B, Poole A, Grant ME, Boot-Handford RP. Role of pericytes in vascular calcification: a review. *Z Kardiol*. 2000; 89 (Suppl. 2), 20–27.
  75. Carey RM, Siragy HM. Newly recognised components of the reninangiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev*. 2003; 24: 261–271.
  76. Carrillo-López N, Román-García P, Rodríguez-Rebollar A, Fernández- Martín JL, Naves-Díaz M, Cannata-Andía JB. Indirect regulation of PTH by estrogens may require FGF23. *J Am Soc Nephrol*. 2009; 20:2009-17.
  77. Carvalho LK, Barreto Silva MI, da Silva Vale B, Bregman R, Martucci RB, Carrero JJ, Avesani CM. Annual variation in body fat is associated with systemic inflammation in chronic kidney disease patients Stages 3 and 4: a longitudinal study. *Nephrol Dial Transplant*. 2012; 4: 1423-1428.
  78. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24: 816–823.
  79. Ceriello A. Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism*. 2000; 49: 27–29.
  80. Cha SK, Huang C, Ding Y, Qi X, Huang CL, Miller RT. Calcium-sensing receptor decreases cell surface expression of the inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel Kir4.1. *J Biol Chem*. 2011; 286: 1828–1835.
  81. Chaaya R, Alfaraño C, Guilbeau-Frugier C, Coatrieux C, Kesteman AS, Parini A, Fares N, Gue M, Schanstra JP, Bascands JL. Pargyline reduces renal damage associated with ischaemia-reperfusion and cyclosporin *Nephrol Dial Transplant*. 2011; 26: 489-98.
  82. 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*. 2005; 310: 490–493.

83. Chang W, Pratt S, Chen TH, Nemeth E, Huang Z, Shoback D. Coupling of calcium receptors to inositol phosphate and cyclic AMP generation in mammalian cells and *Xenopus laevis* oocytes and immunodetection of receptor protein by region-specific antipeptide antisera. *J Bone Miner Res.* 1998; 13: 570–580.
84. Chang W, Tu C, Chen TH, Komuves L, Oda Y, Pratt SA, Miller S, Shoback D. Expression and signal transduction of calcium-sensing receptors in cartilage and bone. *Endocrinology.* 1999; 140: 5883–5893.
85. Chen J, Muntner P, Hamm LL, Fonseca V, Batuman V, Whelton PK, He J. Insulin resistance and risk of chronic kidney disease in nondiabetic US adults. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14:469–477.
86. Chen SJ, Yen CH, Huang YC, Lee BJ, Hsia S, Lin PT. Relationships between inflammation, adiponectin, and oxidative stress in metabolic syndrome. *PLoS One.* 2012; 7: e45693.
87. Chertow GM, Correa-Rotter R, Block GA, Drueke TB, Floege J, Goodman WG, Herzog CA, Kubo Y, London GM, Mahaffey KW, Mix TC, Moe SM, Wheeler DC, Parfrey PS. Baseline characteristics of subjects enrolled in the Evaluation of Cinacalcet HCl Therapy to Lower Cardiovascular Events (EVOLVE) trial. *Nephrol Dial Transplant.* 2012; 27: 2872–2879.
88. Cheung WW, Paik KH, Mak RH. Inflammation and cachexia in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2010; 25: 711–724.
89. Choi KM, Ryu OH, Lee KW, Kim HY, Seo JA, Kim SG, Kim NH, Choi DS, Baik SH. Serum adiponectin, interleukin-10 levels and inflammatory markers in the metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007; 75: 235–240.
90. Cholest IN, Steinberg SF, Tropper PJ, Fox HE, Segre GV, Bilezikian JP. The influence of hypermagnesemia on serum calcium and parathyroid hormone levels in human subjects. *N Engl J Med.* 1984; 310: 1221–5.
91. Ciaccio, Bivona G, Di Sciacca R, Iatrino R, Di Natale E, Li Vecchi M, Bellia C. Changes in serum fetuin A and inflammatory markers levels in end-stage renal disease (ESRD): effect of a single session haemodialysis. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2008; 46: 212–214.
92. Clarke MW, Burnett JR, Croft KD. Vitamin E in human health and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2008; 45:417–50.
93. Cola C, Almeida M, Li D, Romeo F. & Mehta JL. Regulatory role of endothelium in the expression of genes affecting arterial calcification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 320, 424–427.
94. Collett GD, Sage AP, Kirton JP, Alexander MY, Gilmore AP, Canfield AE. Axl/phosphatidylinositol 3-kinase signaling inhibits mineral deposition by vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2007; 100: 502–9.
95. Colombo ML. An Update on Vitamin E, Tocopherol and Tocotrienol—Perspectives. *Molecules.* 2010; 15: 2103–2113.

96. Côté M, Mauriège P, Bergeron J, Alméras N, Tremblay A, Lemieux I, Després JP. Adiponectinemia in visceral obesity: impact on glucose tolerance and plasma lipoprotein and lipid levels in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005; 90: 1434–1439.
97. Couser WG, Remuzzi G, Mendis S, Tonelli M. The contribution of chronic kidney disease to the global burden of major noncommunicable diseases. *Kidney International.* 2011; 80: 1258–70.
98. Covic A, Kanbay M, Voroneanu L, Turgut F, Serban DN, Serban IL, Goldsmith DJ. Vascular calcification in chronic kidney disease. *Clin Sci (Lond).* 2010; 119: 111–121.
99. Cozzolino M, Brancaccio D, Gallieni M, Slatopolsky E. Pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2005; 68: 429–436.
100. Crawford A, Fassett RG, Coombes JS, Kunde DA, Ahuja KD, Robertson IK, Ball MJ, Geraghty DP. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase genotypes and activities and the progression of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2011; 26: 2806–13.
101. Cross CE, van der Vliet A, O'Neill CA, Eiserich JP. Reactive oxygen species and the lung. *Lancet.* 1994; 344: 930.
102. Cross HS, Debiec H, Peterlik M. Mechanism and regulation of intestinal phosphate absorption. *Miner Electrolyte Metab.* 1990; 16: 115–124.
103. 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-kappa B activation by tumor necrosis factor- $\alpha$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and high intravascular pressure. *Circulation.* 2005; 111: 2364–72.
104. Cumming WA and Thomas VJ. Hypermagnesemia: a cause of abnormal metaphyses in the neonate. *AJR Am J Roentgenol.* 1989; 152:1071-1072.
105. Cundy T, Dissanayake A. Severe hypomagnesaemia in long-term users of proton-pump inhibitors. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008; 69: 338–341.
106. Cunningham J, Locatelli F, Rodriguez M. Secondary hyperparathyroidism: pathogenesis, disease progression, and therapeutic options. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011; 6: 913–21.
107. Curtis AJ, Bullen M, Piccenna L, McNeil JJ. Vitamin E Supplementation and Mortality in Healthy People: A Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2014. DOI 10.1007/s10557-014-6560-7.
108. D'Amour P. Circulating PTH molecular forms: What we know and what we don't. *Kidney Int.* 2006; 70, S29–S33.
109. da Silva BA, Bjorbaek C, Uotani S, Flier JS. Functional properties of leptin isoforms containing the gln-->pro extracellular mutation of the fatty rat. *Endocrinology.* 1998; 139: 3681–3690.

110. Das U. Is Metabolic Syndrome X an inflammatory condition? *Experimental Biology and Medicine*. 2002; 227: 989-997.
111. De Caterina R, Manes C. Inflammation in early atherogenesis: impact of ACE inhibition. *Eur Heart J Suppl*. 2003; 5 (Suppl. A): 15-A24.
112. de Francisco AL, Leidig M, Covic AC, Ketteler M, Benedyk-Lorens E, Mircescu GM, Scholz C, Ponce P, Passlick-Deetjen J. Evaluation of calcium acetate/magnesium carbonate as a phosphate binder compared with sevelamer hydrochloride in haemodialysis patients: a controlled randomized study (CALMAG study) assessing efficacy and tolerability. *Nephrol Dial Transplant*. 2010; 25: 3707-17.
113. De Groot T, Kovalevskaya NV, Verkaart S, Schilderink N, Felici M, van der Hagen EA, Bindels RJ, Vuister GW, Hoenderop JG. Molecular mechanisms of calmodulin action on TRPV5 and modulation by parathyroid hormone. *Mol Cell Biol*. 2011; 31: 2845-53.
114. De Marchi E, Baldassari F, Bononi A, Wieckowski MR, Pinton P. Oxidative stress in cardiovascular diseases and obesity: role of p66Shc and protein kinase C. *Oxid Med Cell Longev*. 2013; 2013: 564961.
115. De Schutter TM, Behets GJ, Geryl H, Peter ME, Stepan S, Gundlach K, Passlick-Deetjen J, D'Haese PC, Neven E. Effect of a magnesium-based phosphate binder on medial calcification in a rat model of uremia. *Kidney Int*. 2013; 83: 1109-17.
116. de Solís AJ, González-Pacheco FR, Deudero JJ, Neria F, Albalade M, Petkov V, Susanibar L, Fernandez-Sanchez R, Calabria O, Ortiz A, Caramelo C. Alkalinization potentiates vascular calcium deposition in an uremic milieu. *J Nephrol*. 2009; 22: 647-53.
117. de Zeeuw D, Akizawa T, Agarwal R, Audhya P, Bakris GL, Chin M, Krauth M, Lambers Heerspink HJ, Meyer CJ, McMurray JJ, Parving HH, Pergola PE, Remuzzi G, Toto RD, Vaziri ND, Wanner C, Warnock DG, Wittes J, Chertow GM. Rationale and trial design of Bardoxolone Methyl Evaluation in Patients with Chronic Kidney Disease and Type 2 Diabetes: the Occurrence of Renal Events (BEACON). *Am J Nephrol*. 2013; 37: 212-22.
118. Deith EA. Multiple organ failure. *Ann Surg* 1992; 216:117.
119. Delmez JA, Kelber J, Norword KY, Giles KS, Slatopolsky E. Magnesium carbonate as a phosphorus binder: a prospective, controlled, crossover study. *Kidney Int*. 1996; 49: 163-167.
120. Delmez JA. Efficacy and safety of a new kappa-opioid receptor agonist for the treatment of uremic pruritus. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2006; 2: 358-359.
121. Demer LL. y Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation*. 2008; 117: 2938-2948.
122. Denis VW. Phosphate homeostasis. In: Windhager EE ed. Handbook of physiology, section 8: renal physiology, 1785-1816. *Oxford University Press*. New York, 1992.
123. Després JP. Health consequences of visceral obesity. *Ann Med*. 2001; 3: 534-41.

- 
- 124.Després, JP. Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? *Ann. Med.* 2006; 38: 52–63.
- 125.Devaraj S, Jialal I.  $\alpha$ -Tocopherol decreases interleukin-1 $\beta$  release from activated human monocytes by inhibition of 5-lipoxygenase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 1125–1133.
- 126.Devaraj S, Leonard S, Traber MG, Jialal I. Gamma-tocopherol supplementation alone and in combination with alpha-tocopherol alters biomarkers of oxidative stress and inflammation in subjects with metabolic syndrome. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44: 1203–1208.
- 127.Di Leo C , Gallieni M, Bestetti A, Tagliabue L, Cozzolino M, Carpani P, Pozzato C, Tarolo GL, Brancaccio D. Cardiac and pulmonary calcification in a hemodialysis patient: partial regression 4 years after parathyroidectomy. *Clin Nephrol.* 2003; 59: 59-63.
- 128.Di Lisa F, Kaludercic N, Carpi A, Menabò R, Giorgio M. Mitochondria and vascular pathology. *Pharmacol Rep.* 2009; 61: 123-30.
- 129.Dimke H, Hoenderop JG, Bindels RJ. Molecular basis of epithelial Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> transport: insights from the TRP channel family. *J Physiol.* 2011; 1; 589.
- 130.Dixon LJ, Hughes SM, Rooney K, Madden A, Devine A, Leahey W, Henry W, Johnston GD, McVeigh GE. Increased superoxide production in hypertensive patients with diabetes mellitus: role of nitric oxide synthase. *Am J Hypertens.* 2005; 18: 839-43.
- 131.Doelle G. The clinical picture of metabolic syndrome. An update on this complex of conditions and risk factors. *Posgrad Med.* 2004; 116: 30-8.
- 132.Donato J Jr, Cravo RM, Frazão R, Elias CF. Hypothalamic sites of leptin action linking metabolism and reproduction. *NeuroEndocrinology.* 2011; 93: 9-18.
- 133.Driessler F, Baldock PA. Hypothalamic regulation of bone. *J Mol Endocrinol.* 2010; 45: 175-81.
- 134.Egan KP, Kim, JH, Mohler, ER 3rd, Pignolo RJ. Role for circulating osteogenic precursor cells in aortic valvular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011; 31: 2965–2971.
- 135.Elahi MM, Kong YX, Matata BM. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2009; 2: 259-69.
- 136.Elin RJ. Assessment of magnesium status. *Clin Chem.* 1987; 33:1965-70.
- 137.Emanuela F, Grazia M, de Marco R, Maria Paola L, Giorgio F, Marco B. Inflammation as a link between obesity and metabolic syndrome. *J Nutr Metab.* 2012; 2012: 476380.
- 138.Enggard E. Nitric oxide: mediator, murder, and medicine. *Lancet.* 1994; 343:1199.
- 139.Ennever J and Vogel JJ. Magnesium inhibition of apatite nucleation by proteolipid. *J Dent Res.* 1981; 60: 838-41.

- 
140. Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, Quagliario L, Ceriello A, Giugliano D. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation*. 2002; 106 (16): 2067–2072.
141. Estepa JC, Aguilera-Tejero E, López I, Almadén Y, Rodríguez M and Felsenfeld AJ. Effect of phosphate on parathyroid hormone secretion *in vivo*. *J Bone Miner Res*. 1999; 14: 1848–1854.
142. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes*. 2003; 52: 1–8.
143. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 *Diabetes*. *Endocr Rev*. 2002; 23: 599–622.
144. Evans JL, Maddux BA, Goldfine ID. The molecular basis for oxidativ estress-induced insulin resistance. *Antioxid Redox Signal*. 2005; 7 (7–8): 1040–1052.
145. Evenepoel P, Meijers BK, de Jonge H, Naesens M, Bammens B, Claes K, Kuypers D, Vanrenterghem Y. Recovery of hyperphosphatoninism and renal phosphorus wasting one year after successful renal transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008; 3: 1829–36.
146. Evenepoel P, Naesens M, Claes K, Kuypers D, Vanrenterghem Y. Tertiary ‘hyperphosphatoninism’ accentuates hypophosphatemia and sup- presses calcitriol levels in renal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2007; 7: 1193–200.
147. Everhart JE., Pettitt DJ, Knowler WC , Rose FA, Bennett PH. Medial arterial calcification and its association with mortality and complications of diabetes. *Diabetologia*. 1988; 31, 16–23.
148. Facchini FS, Hua NW, Reaven GM, Stoohs RA. Hyperinsulinemia: the missing link among oxidative stress and age-related diseases? *Free Radic Biol Med*. 2000; 29: 1302–6.
149. Fadini, GP. Albiero M, Menegazzo L, Boscaro E, Vigili de Kreutzenberg S, Agostini C, Cabrelle A, Binotto G, Rattazzi M, Bertacco E, Bertorelle R, Biasini L, Mion M, Plebani M, Ceolotto G, Angelini A, Castellani C, Menegolo M, Grego F, Dimmeler S, Seeger F, Zeiher A, Tiengo A, Avogaro A. Widespread increase in myeloid calcifying cells contributes to ectopic vascular calcification in type 2 diabetes. *Circ. Res*. 2011; 108, 1112–21.
150. Farzaneh-Far A, Proudfoot D, Weissberg PL, Shanahan CM. Matrix gla protein is regulated by a mechanism functionally related to the calcium-sensing receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 277: 736–40.
151. Farzaneh-Far A, Weissberg PL, Proudfoot D, Shanahan CM. Transcriptional regulation of matrix gla protein. *Z Kardiol*. 2001; 90 Suppl 3: 38–42.
152. Faul C, Amaral AP, Oskouei B, Hu MC, Sloan A, Isakova T, Gutiérrez OM, Aguillon-Prada R, Lincoln J, Hare JM, Mundel P, Morales A, Scialla J, Fischer M, Soliman EZ, Chen J, Go AS, Rosas SE, Nessel L, Townsend RR, Feldman HI, St John Sutton M, Ojo A, Gadegbeku C, Di Marco GS, Reuter S, Kentrup D, Tiemann K, Brand M, Hill JA, Moe OW, Kuro-O M,

- Kusek JW, Keane MG, Wolf M. FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest.* 2011; 121: 4393-408.
153. Ferment O, Garnier PE, Touitou Y. Comparison of the feedback effect of magnesium and calcium on parathyroid hormone secretion in man. *J Endocrinol* 1987; 113: 117–122.
154. Fernández-Riejos P, Najib S, Santos-Alvarez J, Martín-Romero C, Pérez-Pérez A, González-Yanes C, Sánchez-Margalet V. Role of leptin in the activation of immune cells. *Mediators Inflamm.* 2010; 2010: 568343.
155. Ferrari SL, Bonjour JP, Rizzoli R. Fibroblast growth factor-23 relationship to dietary phosphate and renal phosphate handling in healthy young men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90: 1519-24.
156. Ferré P. The biology of Peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes.* 2004; 53: S43-S50.
157. Ferrè S, Hoenderop JGJ and Biendels R. Sensing mechanism involved in  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  homeostasis. *Kidney Int.* 2012; 82: 1157-66.
158. Fine KD, Santa Ana CA, Porter JL, Fordtran JS. Intestinal absorption of magnesium from food and supplements. *J Clin Invest.* 1991; 88: 396–402.
159. Fischer CP. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc Immunol Rev.* 2006; 12: 6-33.
160. Fisher ffolliott Estall JL, Adams AC, Antonellis PJ, Bina HA, Flier JS, Kharitonov A, Spiegelman BM, Maratos-Flier E. Integrated Regulation of Hepatic Metabolism by Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) *in Vivo.* *Endocrinology.* 2011; 152: 2996-3004.
161. Fliser D, Kollerits B, Neyer U, Ankerst DP, Lhotta K, Lingenhel A, Ritz E, Kronenberg F; MMKD Study Group, Kuen E, König P, Kraatz G, Mann JF, Müller GA, Köhler H, Riegler P. Fibroblast growth factor 23 (FGF23) predicts progression of chronic kidney disease: the Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) Study. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18: 2600-8.
162. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 1998; (12 Suppl): S16-23.
163. Foley RN, Collins AJ. End-stage renal disease in the United States: an update from the United States Renal Data System. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007; 18, 2644–2648.
164. Franciosi M, Pellegrini F, Sacco M, De Berardis G, Rossi MC, Strippoli GF, Belfiglio M, Tognoni G, Valentini M, Nicolucci A; IGLOO (Impaired Glucose tolerance, and Long-term Outcomes Observational Study) Study Group. Identifying patients at risk for microalbuminuria via interaction of the components of the metabolic syndrome: a cross-sectional analytic study. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007; 2: 984–991.
165. Frayn KN. Adipose tissue and the insulin resistente syndrome. *Proc Nutr Soc.* 2001; 60: 375-80.



166. Freeman B. Free radical chemistry of nitric oxide. Looking at the dark side. *Chest*. 1994; 105 (suppl): 79S- 84S.
167. Frick KK, Bushinsky DA. Chronic metabolic acidosis reversibly inhibits extracellular matrix gene expression in mouse osteoblasts. *Am J Physiol*. 1998; 275: F840-7.
168. Frick KK, Jiang L, Bushinsky DA. Acute metabolic acidosis inhibits the induction of osteoblastic egr-1 and type 1 collagen. *Am J Physiol*. 1997; 272: C1450-6.
169. Frühbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzábal FJ y Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001; 280: E827-47.
170. Fudge NJ, Kovacs CS. Physiological studies in heterozygous calcium sensing receptor (CaSR) gene-ablated mice confirm that the CaSR regulates calcitonin release *in vivo*. *BMC Physiol*. 2004. 20; 4: 5.
171. Galassi A, Reynolds K, He J. Metabolic syndrome and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis. *Am. J. Med*. 2006; 119: 812–819.
172. Galitzer H, Ben-Dov IZ, Silver J, Naveh-Many T. Parathyroid cell resistance to fibroblast growth factor 23 in secondary hyperparathyroidism of chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2010; 77: 211-8.
173. Ganong, WF. Review of Medical Physiology. 19. Norwalk, Conn: Appleton & Lange; 1999.
174. Garcia-Bailo B, El-Sohemy A, Haddad PS, Arora P, Benzaied F, Karmali M, Badawi A. Vitamins D, C, and E in the prevention of type 2 Diabetes mellitus: modulation of inflammation and oxidative stress. *Biologics*. 2011; 5: 7-19.
175. Garcia-Bello JA, Gómez-Díaz RA, Contreras-Rodríguez A, Talavera JO, Mondragón-González R, Sanchez-Barbosa L, Diaz-Flores M, Valladares-Salgado A, Gallardo JM, Aguilar-Kitsu A, Lagunas-Munoz J, Wachter NH. Carotid íntima media thickness, oxidative stress, and inflammation in children with chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2014; 29: 273-81.
176. Garg A. Acquired and inherited lipodystrophies. *N. Engl. J. Med*. 2004; 350: 1220–34.
177. Garland JS, Holden RM, Ross R, Adams MA, Nolan RL, Hopman WM, Morton AR. Insulin resistance is associated with Fibroblast Growth Factor-23 in stage 3-5 chronic kidney disease patients. *J Diabetes Complications*. 2014; 61-5.
178. Garvey W, Malanu L, Zhu J, Brechtel-Hook G, Wallace P, Baron A. Evidence of the defects in trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporter in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance. *J Clin Invest*. 1998; 101: 2377–2386.
179. Geibel JP, Hebert SC. The functions and roles of the extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor along the gastrointestinal tract. *Annu Rev Physiol*. 2009; 71: 205–217.
180. Giachelli CM, Speer MY, Li X, Rajachar RM, Yang H. Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin. *Circ Res*. 2005; 96: 717-22.

181. Giachelli CM. The emerging role of phosphate in vascular calcification. *Kidney Int.* 2009; 75: 890 – 897.
182. Gilbert M, Magnan C, Turban S, André J, Guerre-Millo M. Leptin receptor-deficient obese Zucker rats reduce their food intake in response to a systemic supply of calories from glucose. *Diabetes.* 2003; 52: 277-282.
183. Goetz R, Beenken A, Ibrahimi OA, Kalinina J, Olsen SK, Eliseenkova AV, Xu C, Neubert TA, Zhang F, Linhardt RJ, Yu X, White KE, Inagaki T, Kliewer SA, Yamamoto M, Kurosu H, Ogawa Y, Kuro-o M, Lanske B, Razzaque MS, Mohammadi M. Molecular insights into the klotho-dependent, endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members. *Mol Cell Biol.* 2007; 27: 3417-28.
184. Gonella M, Ballanti P, Della Rocca C, Calabrese G, Pratesi G, Vagelli G, Mazzotta A, Bonucci E. Improved bone morphology by normalizing serum magnesium in chronically hemodialyzed patients. *Miner Electrolyte Metab.* 1988; 14: 240-245.
185. Gonzalez-Parra E, Gonzalez-Casaus ML, Galán A, Martinez-Calero A, Navas V, Rodriguez M, Ortiz A. Lanthanum carbonate reduces FGF23 in chronic kidney disease Stage 3 patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2011; 26: 2567-71.
186. Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, Yoon C, Gales B, Sider D, Wang Y, Chung J, Emerick A, Greaser L, Elashoff RM, Salusky IB. Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med.* 2000; 342: 1478–1483.
187. Goossens G, Bizzarri A, Venteclef N, Essers Y, Cleutjens J, Konings E, Jocken J, Cajlakovic M, Ribitsch V, Clément K, Blaak E. Increased adipose tissue oxygen tension in obese compared with lean men is accompanied by insulin resistance, impaired adipose tissue capillarization, and inflammation. *Circulation.* 2011; 124: 67-76.
188. Gorgels TG, Waarsing JH, de Wolf A, ten Brink JB, Loves WJ, Bergen AA. Dietary magnesium, not calcium, prevents vascular calcification in a mouse model for pseudoxanthoma elasticum. *J Mol Med.* 2010; 88: 467-75.
189. Gorn AH, Lin HY, Yamin M, Auron PE, Flannery MR, Tapp DR, Manning CA, Lodish HF, Krane SM, Goldring SR. Cloning, characterization, and expression of a human calcitonin receptor from an ovarian carcinoma cell line. *J Clin Invest.* 1992 90: 1726-35.
190. Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg.* 1994; 81: 637.
191. Greenwald R. Current approaches to the development of oxygen radical scavengers. *Drugs of Today.* 1990; 26: 299-307.
192. Greger R, Schlatter E. Properties of the lumen membrane of the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. *Pflugers Arch.* 1983; 396: 315–324.
193. Groenestege WM, Hoenderop JG, van den Heuvel L, Knoers N, Bindels RJ., The epithelial  $Mg^{2+}$  channel transient receptor potential melastatin 6 is regulated by dietary  $Mg^{2+}$  content and estrogens. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 1035–1043.

194. Groenestege WM, Thébault S, van der Wijst J, van den Berg D, Janssen R, Tejpar S, van den Heuvel LP, van Cutsem E, Hoenderop JG, Knoers NV, Bindels RJ. Impaired basolateral sorting of pro-EGF causes isolated recessive renal hypomagnesemia. *J Clin Invest.* 2007; 117: 2260–2267.
195. Gross ML, Meyer HP, Ziebart H, Rieger P, Wenzel U, Amann K, Berger I, Adamczak M, Schirmacher P, Ritz E. Calcification of coronary íntima and media: immunohistochemistry, backscatter imaging, and x-ray analysis in renal and nonrenal patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007; 2: 121-134
196. Grundy, SM. Metabolic syndrome: connecting and reconciling cardiovascular and diabetes worlds. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006; 47: 1093–100.
197. Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci.* 2005, 6B: 1045–1056.
198. Guerin AP, London GM, Marchais SJ, Metivier F. Arterial stiffening and vascular calcifications in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2000; 15: 1014–1021.
199. Guerrero F, Herencia C, Almadén Y, Martínez-Moreno JM, Montes de Oca A, Rodríguez-Ortiz ME, Díaz-Tocados JM, Canalejo A, Florio M, López I, Richards WG, Rodríguez M, Aguilera-Tejero E, Muñoz-Castañeda JR. TGF- $\beta$  prevents phosphate-induced osteogenesis through inhibition of BMP and Wnt/ $\beta$ -catenin pathways. *PLoS One.* 2014; 9: e89179. doi: 10.1371/journal.pone.0089179.
200. Guerrero F, Montes de Oca A, Rodríguez M, Zafra R, Aguilera-Tejero E, López I. The effect of vitamin D derivatives on vascular calcification associated with inflammation. 2012. *NDT.* 27: 2206-12.
201. Guo LL, Pan Y, Jin HM. Adiponectin is positively associated with insulin resistance in subjects with type 2 diabetic nephropathy and effects of angiotensin II type 1 receptor blocker losartan. *Nephrol Dial Transplant.* 2009; 24: 1876–1883.
202. Gutiérrez OM, Januzzi JL, Isakova T, Laliberte K, Smith K, Collerone G, Sarwar A, Hoffmann U, Coglianese E, Christenson R, Wang TJ, deFilippi C, Wolf M. Fibroblast growth factor 23 and left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease. *Circulation.* 2009; 119: 2545-52.
203. Gutiérrez OM, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain JA, Tamez H, Shah A, Smith K, Lee H, Thadhani R, Jüppner H, Wolf M. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med.* 2008; 359: 584-92.
204. Gutteridge JMC. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun.* 1993; 19: 41.
205. Ha CM, Park S, Choi YK, Jeong JY, Oh CJ, Bae KH, Lee SJ, Kim JH, Park KG, Jun do Y, Lee IK. Activation of Nrf2 by dimethyl fumarate improves vascular calcification. *Vascul Pharmacol.* 2014; 63: 29-36.

- 
- 
- 206.Habener JF, Potts Jr JT. Relative effectiveness of magnesium and calcium on the secretion and biosynthesis of parathyroid hormone in vitro. *Endocrinology*. 1976; 98: 197–202.
- 207.Hada Y, Yamauchi T, Waki H, Tsuchida A, Hara K, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, Kadowaki T. Selective purification and characterization of adiponectin multimer species from human plasma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007. 356: 487–493.
- 208.Hajjar DP, Gotto AM. Biological relevance of inflammation and oxidative stress in the pathogenesis of arterial diseases. *Am J Pathol*. 2013; 182: 1474-1481.
- 209.Hak AE, Pols HA, van Hemert AM, Hofman A, Witteman JC. Progression of aortic calcification is associated with metacarpal bone loss during menopause: a population-based longitudinal study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2000; 20: 1926-31.
- 210.Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Methods Enzimol*. 1990; 186: 1.
- 211.Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev*. 2012; 70: 257-65.
- 212.Halliwell B, Gutteridge JM. Free Radicals in: *Biology and Medicine*, 2nd ed. Clarendon, England: Oxford University Press, 1989, 2.
- 213.Han SN, Adolfsson O, Lee CK, Prolla TA, Ordovas J, Meydani SN. Vitamin E and gene expression in immune cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1031: 96–101.
- 214.Hannan FM, Nesbit MA, Turner JJ, Stacey JM, Cianferotti L, Christie PT, Conigrave AD, Whyte MP, Thakker RV. Comparison of human chromosome 19q13 and syntenic region on mouse chromosome 7 reveals absence, in man, of 11.6 Mb containing four mouse calciumsensing receptor-related sequences: relevance to familial benign hypocalciuric hypercalcaemia type 3. *Eur J Hum Genet*. 2010; 18: 442–447.
- 215.Harris DC, Yuill E, Chesher DW. Correcting acidosis in hemodialysis: effect on phosphate clearance and calcification risk. *J Am Soc Nephrol*. 1995; 6: 1607-12.
- 216.Haruna Y, Kashihara N, Satoh M, Tomita N, Namikoshi T, Sasaki T, Fujimori T, Xie P, Kanwar YS. Amelioration of progressive renal injury by genetic manipulation of Klotho gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 13; 104: 2331-6.
- 217.Hasegawa H, Nagano N, Urakawa I, Yamazaki Y, Iijima K, Fujita T, Yamashita T, Fukumoto S, Shimada T. Direct evidence for a causative role of FGF23 in the abnormal renal phosphate handling and vitamin D metabolism in rats with early-stage chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2010; 78: 975-80.
- 218.Havel PJ. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes*. 2004; 53: S123-S151.
- 219.Havel PJ. Role of adipose tissue in body-weight regulation: mechanisms regulatin leptin production and energy balance. *Proc Nutr Soc*, 2000. 59: 359- 371.

220. Hayden MR, Tyagi SC. Vasa vasorum in plaque angiogenesis, metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atheroscleropathy: a malignant transformation. *Cardiovasc. Diabetol.* 2004; 3: 1.
221. Herbert V, Shaw S, Jayatilleke E, Stopler-Kasdan T. Most free-radical injury is iron-related: it is promoted by iron, hemin, haloferritin and vitamin C, and inhibited by desferioxamine and apoferritin. *Stem Cells.* 1994 (b); 12: 289.
222. Herbert V, Shaw S, Jayatilleke E. Vitamin C supplements are harmful to lethal for over 10% of Americans with high iron stores. *FASEB J.* 1994 (a); 8: A678,
223. Hessle L, Johnson KA, Anderson HC, Narisawa S, Sali A, Goding JW, Terkeltaub R, Millan JL. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(14): 9445-9.
224. Hoenderop JG, Chon H, Gkika D, Bluysen HA, Holstege FC, St-Arnaud R, Braam B, Bindels RJ. Regulation of gene expression by dietary  $\text{Ca}^{2+}$  in kidneys of 25-hydroxyvitamin  $\text{D}_3$ -1 alpha-hydroxylase knockout mice. *Kidney Int.* 2004; 65: 531–539.
225. Hoenderop JG, Müller D, Van Der Kemp AW, Hartog A, Suzuki M, Ishibashi K, Imai M, Sweep F, Willems PH, Van Os CH, Bindels RJ. Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12: 1342–1349.
226. Hoenderop JG, van Leeuwen JP, van der Eerden BC, Kersten FF, van der Kemp AW, Mérillat AM, Waarsing JH, Rossier BC, Vallon V, Hummler E, Bindels RJ. Renal  $\text{Ca}^{2+}$  wasting, hyperabsorption, and reduced bone thickness in mice lacking TRPV5. *J Clin Invest.* 2003; 112: 1906–1914.
227. Hofbauer LC, Brueck CC, Shanahan CM, Schoppet M, Dobnig H. Vascular calcification and osteoporosis--from clinical observation towards molecular understanding. *Osteoporos Int.* 2007; 18: 251-9.
228. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007; 357: 266-81.
229. Hotta K, Funahashi N, Bodkin NL, Ortmeier HK, Arita Y, Hansen BC y Matsuzawa Y. Circulating concentrations of adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes.* 2001; 50: 1126-1133.
230. Hruska K, Mathew S, Lund R, Qiu P, Pratt R. Hyperphosphatemia of chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2008; 74: 148–157.
231. Hruska KA, Choi ET, Memon I, Davis TK, Mathew S. Cardiovascular risk in chronic kidney disease (CKD): the CKD-mineral bone disorder (CKD-MBD). *Pediatr. Nephrol.* 25, 769–778 (2010).
232. Hsu HJ, Wu MS. Fibroblast growth factor 23: a possible cause of left ventricular hypertrophy in hemodialysis patients. *Am J Med Sci.* 2009; 337: 116-22.

233. Hu E, Liang P y Spiegelman BM. Adipo Q is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271: 10697-10703. 1996.
234. Hu MC, Shi M, Zhang J et al., Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2011; 22: 124–136.
235. Hu MC, Shi M, Zhang J, Pastor J, Nakatani T, Lanske B, Razzaque MS, Rosenblatt KP, Baum. Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *FASEB J.* 2010(a); 24(9): 3438-50.
236. Hu MC, Kuro o M, Moe OW. Klotho and kidney disease. *J. Nephrol.* 2010 (b). 23 (Suppl. 16): S136–S144.
237. Huang C, Miller RT. Novel Ca receptor signaling pathways for control of renal ion transport. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2010; 19: 106–112.
238. Huang PH, Chuang HC, Chou CC, Wang H, Lee SL, Yang HC, Chiu HC, Kapuriya N, Wang D, Kulp SK, Chen CS. Vitamin E facilitates the inactivation of the kinase Akt by the phosphatase PHLPP1. *Sci Signal.* 2013; 6 (267): ra19. doi:10.1126/scisignal.2003816.
239. Hulsmans M, Van Dooren E, Holvoet P. Mitochondrial reactive oxygen species and risk of atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2012; 14: 264-76.
240. Idelevich A, Rais Y, Monsonego-Ornan E. Bone Gla protein increases HIF 1 $\alpha$ -dependent glucose metabolism and induces cartilage and vascular calcification. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011; 31, e55–e71.
241. Ikari A, Okude C, Sawada H, Sasaki Y, Yamazaki Y, Sugatani J, Degawa M, Miwa M. Activation of a polyvalent cation-sensing receptor decreases magnesium transport via claudin-16. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1778: 283–290.
242. Ikushima M, Rakugi H, Ishikawa K, Maekawa Y, Yamamoto K, Ohta J, Chihara Y, Kida I, Ogihara T. Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 339: 827-32.
243. Imanishi Y, Inaba M, Nakatsuka K, Nagasue K, Okuno S, Yoshihara A, Miura M, Miyauchi A, Kobayashi K, Miki T, Shoji T, Ishimura E, Nishizawa Y. FGF-23 in patients with end-stage renal disease on hemodialysis. *Kidney Int.* 2004; 65: 1943-6.
244. Imura A, Tsuji Y, Murata M, Maeda R, Kubota K, Iwano A, Obuse C, Togashi K, Tominaga M, Kita N, Tomiyama K, Iijima J, Nabeshima Y, Fujioka M, Asato R, Tanaka S, Kojima K, Ito J, Nozaki K, Hashimoto N, Ito T, Nishio T, Uchiyama T, Fujimori T, Nabeshima Y. Alpha-klotho as a regulator of calcium homeostasis. *Science.* 2007; 316: 1615–1618.
245. Inaba M, Okuno S, Imanishi Y, Nishizawa Y, Morii H. Magnesium deficiency enhances secretion of parathyroid hormone in normal and 5/6-nephrectomized uremic rats. *J Endocrinol Invest.* 1992; 15: 135–142.

246. Inaba M, Okuno S, Imanishi Y, Yamada S, Shioi A, Yamakawa T, Ishimura E, Nishizawa Y. Role of fibroblast growth factor-23 in peripheral vascular calcification in non-diabetic and diabetic hemodialysis patients. *Osteoporos Int.* 2006; 17: 1506-13.
247. Ingenbleek Y, Bernstein L. The stressful condition as a nutritionally dependent adaptive dichotomy. *Nutrition.* 1999; 15: 305-320.
248. Iribarren C, Husson G, Go AS, Lo JC, Fair JM, Rubin GD, Hlatky MA, Fortmann SP. Plasma leptin levels and coronary artery calcification in older adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92: 729-732.
249. Isakova T, Gutierrez O, Shah A, Castaldo L, Holmes J, Lee H, Wolf M. Postprandial mineral metabolism and secondary hyperparathyroidism in early CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2008; 19: 615-23.
250. Isakova T, Wahl P, Vargas GS, Gutierrez OM, Scialla J, Xie H, Appleby D, Nessel L, Bellovich K, Chen J, Hamm L, Gadegbeku C, Horwitz E, Townsend RR, Anderson CA, Lash JP, Hsu CY, Leonard MB, Wolf M. Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2011; 79: 1370-8.
251. Ishimura E, Okuno S, Kitatani K, Tsuchida T, Yamakawa T, Shioi A, Inaba M, Nishizawa Y. Significant association between the presence of peripheral vascular calcification and lower serum magnesium in hemodialysis patients. *Clin Nephrol.* 2007(a); 68: 222-227.
252. Ishimura E, Okuno S, Yamakawa T, Inaba M, Nishizawa Y. Serum magnesium concentration is a significant predictor of mortality in maintenance hemodialysis patients. *Magnes Res.* 2007(b); 20: 237-244.
253. Ishimura, E. Okuno S, Taniwaki H, Kizu A, Tsuchida T, Shioi A, Shoji T, Tabata T, Inaba M, Nishizawa Y. Different risk factors for vascular calcification in end-stage renal disease between diabetics and non diabetics: the respective importance of glycemic and phosphate control. *Kidney Blood Press. Res.* 2008; 31, 10-15.
254. Ivanovski O, Nikolov IG, Joki N, Caudrillier A, Phan O, Mentaverri R, Maizel J, Hamada Y, Nguyen-Khoa T, Fukagawa M, Kamel S, Lacour B, Drüeke TB, Massy ZA. The calcimimetic R-568 retards uremia-enhanced vascular calcification and atherosclerosis in apolipoprotein E deficient (apoE<sup>-/-</sup>) mice. *Atherosclerosis.* 2009; 205: 55-62.
255. Iwasaki Y, Asai M, Yoshida M, Oiso Y, Hashimoto K. Impaired parathyroid hormone response to hypocalcemic stimuli in a patient with hypomagnesemic hypocalcemia. *J Endocrinol Invest.* 2007; 30: 513-516.
256. Jahn-Dechent W, Schinke T, Trindl A, Müller-Esterl W, Sablitzky F, Kaiser S, Blessing M. Cloning and targeted deletion of the mouse fetuin gene. *J Biol Chem.* 1997; 272(50): 31496-503.
257. Jahn-Dechent W, Heiss A, Schäfer C, Ketteler M. Fetuin A regulation of calcified matrix metabolism. *Circ. Res.* 2011; 108: 1494-1509.

258. Jara A, Chacón C, Ibaceta M, Valdivieso A, Felsenfeld AJ. Effect of ammoniumchloride and dietary phosphorus in the azotaemic rat. I. Renal function and biochemical changes. *Nephrol Dial Transplant*. 2004a; 19: 1986-92.
259. Jara A, Chacón C, Ibaceta M, Valdivieso A, Felsenfeld AJ. Effect of ammoniumchloride and dietary phosphorus in the azotaemic rat. Part II--Kidney hypertrophy and calcium deposition. *Nephrol Dial Transplant*. 2004b; 19: 1993-8.
260. Jara A, Felsenfeld AJ, Bover J, Kleeman CR. Chronic metabolic acidosis in azotemic rats on a high-phosphate diet halts the progression of renal disease. *Kidney Int*. 2000; 58: 1023-32.
261. Jean G, Terrat JC, Vanel T, Hurot JM, Lorriaux C, Mayor B, Chazot C.. High levels of serum fibroblast growth factor (FGF)-23 are associated with increased mortality in long haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 2792-6.
262. Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, Morii H. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide. *Circulation*. 1998; 98: 1302-6.
263. Jono S, Shioi A, Ikari Y, Nishizawa Y. Vascular calcification in chronic kidney disease. *J Bone Miner Metab*. 2006; 24: 176-81.
264. Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, Morii H. Parathyroid hormone-related peptide as a local regulator of vascular calcification. Its inhibitory action on in vitro calcification by bovine vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 1997; 17: 1135–1142.
265. Jung S, Querfeld U, Müller D, Rudolph B, Peters H, Krämer S. Submaximal suppression of parathyroid hormone ameliorates calcitriol-induced aortic calcification and remodeling and myocardial fibrosis in uremic rats. *J Hypertens*. 2012; 30: 2182-91.
266. Jüttner R, Ebel H. Characterization of Mg<sup>2+</sup> transport in brush border membrane vesicles of rabbit ileum studied with mag-fura-2. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1370: 51-63.
267. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2006; 116: 1784–1792.
268. Kanbay M, Yilmaz MI, Apetrii M, Saglam M, Yaman H, Unal HU, Gok M, Caglar K, Oguz Y, Yenicesu M, Cetinkaya H, Eyiletten T, Acikel C, Vural A, Covic A. Relationship between serum magnesium levels and cardiovascular events in chronic kidney disease patients. *Am J Nephrol*. 2012; 36: 228-237.
269. Kaplan W, Haymond MW, McKay S, Karaviti LP. Osteopenic effects of MgSO<sub>4</sub> in multiple pregnancies. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2006; 19: 1225-1230.
270. Kawaguchi H, Manabe N, Miyaura C, Chikuda H, Nakamura K, Kuro-o M. Independent impairment of osteoblast and osteoclast differentiation in *kltho* mouse exhibiting low-turnover osteopenia. *J Clin Invest*. 1999; 104: 229-37.



- 
271. Kazory A, Ross EA. Anemia: The point of convergence or divergence for kidney disease and heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2009; 53: 639–647.
272. Kekalainen P, Sarlund H, Pyörälä K, Laakso M. Hyperinsulinemia cluster predicts the development of type 2 diabetes independent of a family history of diabetes. *Diabetes Care.* 1999; 22: 86–92.
273. Kempna P, Reiter E, Arock M, Azzi A, Zingg JM. Inhibition of HMC1 mast cell proliferation by vitamin E: involvement of the protein kinase B pathway. *J. Biol. Chem.* 2004; 279, 50700–50709.
274. Kestenbaum B, Belozeroff V. Mineral metabolism disturbances in patients with chronic kidney disease. *Eur J Clin Invest.* 2007; 37: 607–622.
275. Kestenbaum B. Phosphate metabolism in the setting of chronic kidney disease: significance and recommendations for treatment. *Semin Dial.* 2007; 20: 286–294.
276. Kharitononkov A, Shiyanova TL, Koester A, Ford AM, Micanovic R, Galbreath EJ, Sandusky GE, Hammond LJ, Moyers JS, Owens RA, Gromada J, Brozinick JT, Hawkins ED, Wroblewski VJ, Li DS, Mehrbod F, Jaskunas SR, Shanafelt AB. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest.* 2005; 115: 1627–35.
277. Kiechl S, Schett G, Wenning G, Redlich K, Oberhollenzer M, Mayr A, Santer P, Smolen J, Poewe W, Willeit J. Osteoprotegerin is a risk factor for progressive atherosclerosis and cardiovascular disease. *Circulation.* 2004; 109: 2175–80.
278. Kim S y Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev.* 2000; 52: 11–34.
279. Kircelli F, Peter ME, Sevinc Ok E, Celenk FG, Yilmaz M, Steppan S, Asci G, Ok E, Passlick-Deetjen J. Magnesium reduces calcification in bovine vascular smooth muscle cells in a dose-dependent manner. *Nephrol Dial Transplant.* 2012; 27: 514–521.
280. Kirschbaum B. Effect of high bicarbonate hemodialysis on ionized calcium and risk of metastatic calcification. *Clinica Chimica Acta.* 2004; 343(1-2), 231–6.
281. Kobayashi H, Tokudome G, Hara Y, Sugano N, Endo S, Suetsugu Y, Kuriyama S, Hosoya T. Insulin resistance is a risk factor for the progression of chronic kidney disease. *Clin Nephrol.* 2009; 71: 643–51.
282. Koenig KG, Lindberg JS, Zerwekh JE, Padalino PK, Cushner HM, Copley JB. Free and total 1, 25-dihydroxyvitamin D levels in subjects with renal disease. *Kidney Int.* 1992; 41: 161–165.
283. Koh N, Fujimori T, Nishiguchi S, Tamori A, Shiomi S, Nakatani T, Sugimura K, Kishimoto T, Kinoshita S, Kuroki T, Nabeshima Y. Severely reduced production of klotho in human chronic renal failure kidney. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 280: 1015–1020.

284. Koleganova, N, Piecha G, Ritz E, Schirmacher P, Müller A, Meyer HP, Gross ML. Arterial calcification in patients with chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2009; 24: 2488–2496.
285. Kolek OI, Hines ER, Jones MD, LeSueur LK, Lipko MA, Kiela PR, Collins JF, Haussler MR, Ghishan FK. 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> upregulates FGF23 gene expression in bone: the final link in a renal–gastrointestinal–skeletal axis that controls phosphate transport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005; 289: G1036–G1042.
286. Komaba H, Goto S, Fujii H, Hamada Y, Kobayashi A, Shibuya K, et al. Depressed expression of Klotho and FGF receptor in hyperplastic parathyroid glands from uremic patients. *Kidney Int.* 2010; 77: 232-8.
287. Krajisnik T, Goto S, Fujii H, Hamada Y, Kobayashi A, Shibuya K, Tominaga Y, Otsuki N, Nibu K, Nakagawa K, Tsugawa N, Okano T, Kitazawa R, Fukagawa M, Kita T. Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1 $\alpha$ -hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *J Endocrinol.* 2007; 195: 125–131.
288. Krajisnik T, Olauson H, Mirza MA, Hellman P, Akerström G, Westin G, Larsson TE, Björklund P. Parathyroid Klotho and FGF-receptor 1 expression decline with renal function in hyperparathyroid patients with chronic kidney disease and kidney transplant recipients. *Kidney Int.* 2010; 78: 1024-32.
289. Kramann R, Kunter U, Brandenburg VM, Leisten I, Ehling J, Klinkhammer BM, Knüchel R, Floege J, Schneider RK. Osteogenesis of heterotopically transplanted mesenchymal stromal cells in rat models of chronic kidney disease. *J Bone Miner Res.* 2013; 28: 2523-34.
290. Krieger NS, Frick KK, Bushinsky DA. Mechanism of acid-induced bone resorption. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2004; 13: 423-36.
291. Kumata C, Mizobuchi M, Ogata H, Koiwa F, Nakazawa A, Kondo F, Kadokura Y, Kinugasa E, Akizawa T. Involvement of  $\alpha$ -klotho and fibroblast growth factor receptor in the development of secondary hyperparathyroidism. *Am J Nephrol.* 2010; 31: 230-8.
292. Kupetsky-Rincon EA, Li Q, Uitto J. Magnesium Reduces Carotid Íntima -Media Thickness in a Mouse Model of Pseudoxanthoma Elasticum: A Novel Treatment Biomarker. *Clin Transl Sci.* 2012; 5: 259-264.
293. Kurella M, Lo J, Chertow G. Metabolic syndrome and the risk for chronic kidney disease among nondiabetic adults. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16: 2134–2140.
294. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature.* 1997; 390: (6655) 45–51.
295. Kurosu H, Kuro OM. The Klotho gene family as a regulator of endocrine fibroblast growth factors. *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 299: 72–78.

- 296.Landau M, Kurella-Tamura M, Shlipak MG, Kanaya A, Strotmeyer E, Koster A, Satterfield S, Simsonick EM, Goodpaster B, Newman AB, Fried LF. Health, Aging and Body Composition Study. Correlates of insulin resistance in older individuals with and without kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2011; 26(9):2814-9.
- 297.Larsen MJ, Jensen SJ. The hydroxyapatite solubility product of human dentalemail as a function of pH in the range 4.6-7.6 at 20 degrees C. *Arch Oral Biol*. 1989; 34: 957-61.
- 298.Lasserre, R., Guo XJ, Conchonaud F, Hamon Y, Hawchar O, Bernard AM, Soudja SM, Lenne PF, Rigneault H, Olive D, Bismuth G, Nunès JA, Payrastra B, Marguet D, He HT. Raft nanodomains contribute to Akt/PKB plasma membrane recruitment and activation. *Nat. Chem. Biol*. 2008, 4, 538–547.
- 299.Lastra G, Dhuper S, Johnson MS, Sowers JR. Salt, aldosterone, and insulin resistance: impact on the cardiovascular system. *Nat Rev Cardiol*. 2010, 7: 577–584.
- 300.Lau WL, Ix JH. Clinical detection, risk factors, and cardiovascular consequences of medial arterial calcification: a pattern of vascular injury associated with aberrant mineral metabolism. *Semin Nephrol*. 2013; 33: 93-105.
- 301.Laurin D, Masaki KH, Foley DJ, White LR, Launer LJ. Midlife dietary intake of antioxidants and risk of late-life incident dementia: the Honolulu-Asia aging study, *Am J Epidemiol*. 2004; 159: 959-967.
- 302.Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*. 1996; 379: 632–5.
- 303.Lee KK, Fortmann SP, Fair JM, Iribarren C, Rubin GD, Varady A, Go AS, Quertermous T, Hlatky MA. Insulin resistance independently predicts the progression of coronary artery calcification. *Am Heart J*. 2009; 157: 939–945.
- 304.Lehninger, AL. ed. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular, 2ª ed. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, 1984.
- 305.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*. 1996; 16, 978–983.
- 306.Lei Y, Grover A, Sinha A, Vyavahare N. Efficacy of reversal of aortic calcification by chelating agents. *Calcif Tissue Int* 2013; 93: 426-435.
- 307.LeRoy B, Woolums A, Wass J, Davis E, Gold J, Foreman JH, Lohmann K, Adams J. The relationship between serum calcium concentration and outcome in horses with renal failure presented to referral hospitals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2011; 25: 1426-30.
- 308.Leskinen Y, Salenius JP, Lehtimäki T, Huhtala H, Saha H. The prevalence of peripheral arterial disease and medial arterial calcification in patients with chronic renal failure: requirements for diagnostics. *Am. J. Kidney Dis*. 2002; 40: 472–479.

309. Levey AS, Atkins R, Coresh J, Cohen EP, Collins AJ, Eckardt KU, Nahas ME, Jaber BL, Jadoul M, Levin A, Powe NR, Rossert J, Wheeler DC, Lameire N, Eknoyan G. Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney Int.* 2007; 72: 247-59.
310. Levey AS, Beto JA, Coronado BE, Eknoyan G, Foley RN, Kasiske BL, Klag MJ, Mailloux LU, Manske CL, Meyer KB, Parfrey PS, Pfeffer MA, Wenger NK, Wilson PW, Wright JT Jr. Controlling the epidemic of cardiovascular disease in chronic renal disease: what do we know? What do we need to learn? Where do we go from here? National Kidney Foundation Task Force on Cardiovascular Disease. *Am J Kidney Dis.* 1998; 32: 853-906.
311. Levin A, Bakris GL, Molitch M, Smulders M, Tian J, Williams LA, Andress DL. Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney Int.* 2007; 71: 31-38.
312. Li X, Giachelli CM. Sodium-dependent phosphate cotransporters and vascular calcification. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2007; 16: 325-8.
313. Li X, Yang HY, Giachelli CM. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res.* 2006; 14: 98: 905-12.
314. Li X, Yang HY, Giachelli CM. BMP 2 promotes phosphate uptake, phenotypic modulation, and calcification of human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 2008; 199: 271-277.
315. Liao F, Folsom AR, and Brancati FL. Is low magnesium concentration a risk factor for coronary heart disease? The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am Heart J.* 1998; 136: 480-490.
316. Lin J, Hu FB, Curhan G. Serum adiponectin and renal dysfunction in men with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2007; 30: 239-244.
317. Lin Z, Zhou Z, Liu Y, Gong Q, Yan X, Xiao J, Wang X, Lin S, Feng W, Li X. (). Circulating FGF21 Levels Are Progressively Increased from the Early to End Stages of Chronic Kidney Diseases and Are Associated with Renal Function in Chinese. *PLoS One.* 2011; 6: e18398.
318. Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006; 92: 4-8.
319. Liu H, Li X, Qin F, Huang K. Selenium suppresses oxidative-stress-enhanced vascular smooth muscle cell calcification by inhibiting the activation of the PI3K/AKT and ERK signaling pathways and endoplasmic reticulum stress. *J Biol Inorg Chem.* 2014; 19(3):375-88
320. Liu H, Lu Q, Huang K. Selenium suppressed hydrogen peroxide-induced vascular smooth muscle cells calcification through inhibiting oxidative stress and ERK activation. *J Cell Biochem.* 2010; 111: 1556-64.
321. Liu S, Lee IM, Song Y, Van Denburgh M, Cook NR, Manson JE, Buring JE. Vitamin E and risk of type 2 Diabetes in the women's health study randomized controlled trial. *Diabetes.* 2006; 55: 2856-2862.

- 322.Liu S, Tang W, Zhou J, Stubbs JR, Luo Q, Pi M, Quarles LD. Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17: 1305-15.
- 323.Locatelli F, Pozzoni P, Del Vecchio L. Renal manifestations in the metabolic syndrome. *J Ann Soc Nephrol.* 2006, 17: 81–85.
- 324.Locatelli F, Pozzoni P, Tentori F, Del Vecchio L. Epidemiology of cardiovascular risk in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2003, 18(Suppl 7): vii2–vii9.
- 325.Lomashvili K, Garg P, O'Neill WC. Chemical and hormonal determinants of vascular calcification in vitro. *Kidney Int.* 2006; 69: 1464-70.
- 326.Lomashvili KA, Cobbs S, Hennigar RA, Hardcastle KI, O'Neill WC. Phosphate-induced vascular calcification: role of pyrophosphate and osteopontin. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15: 1392-401.
- 327.Lomashvili KA, Wang X, Wallin R, O'Neill WC. Matrix Gla protein metabolism in vascular smooth muscle and role in uremic vascular calcification. *J Biol Chem.* 2011; 19, 286 (33), 28715-22.
- 328.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.* 2003; 18: 1731–1740.
- 329.London, GM. Cardiovascular calcifications in uremic patients: clinical impact on cardiovascular function. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003; 14 (Suppl. 4): S305–S309.
- 330.London GM, Marty C, Marchais SJ, Guerin AP, Metivier F, de Vernejoul MC. Arterial calcifications and bone histomorphometry in end-stage renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004; 15, 1943–1951.
- 331.López I, Aguilera-Tejero E, Felsenfeld AJ, Estepa JC and Rodríguez M. Direct effect of acute metabolic and respiratory acidosis on parathyroid hormone secretion in the dog. *J Bone Miner Res.* 2002; 17: 1691-1700.
- 332.López 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.* 2006; 17: 795-804.
- 333.López 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.* 2008; 73: 300–307.
- 334.López I, Mendoza FJ, Guerrero F, Almaden Y, Henley C, Aguilera-Tejero E, Rodriguez M., The calcimimetic AMG 641 accelerates regression of extraosseous calcification in uremic rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009; 296: F1376-F1385.

335. López I, Rodríguez M, Felsenfeld AJ, Estepa JC and Aguilera-Tejero E. Direct suppressive effect of acute metabolic and respiratory alkalosis on parathyroid hormone secretion in the dog. *J Bone Miner Res.* 2003; 18: 1478-1485.
336. López I, Rodríguez-Ortiz ME, Almadén Y, Guerrero F, de Oca AM, Pineda C, Shalhoub V, Rodríguez M, Aguilera-Tejero E. Direct and indirect effects of parathyroid hormone on circulating levels of fibroblast growth factor 23 *in vivo*. *Kidney Int.* 2011, 80: 475-82.
337. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation induced immunosuppression. *Nature.* 1998; 394: 897-901.
338. Louvet L, Büchel J, Steppan S, Passlick-Deetjen J, Massy ZA. Magnesium prevents phosphate-induced calcification in human aortic vascular smooth muscle cells. *Nephrol Dial Transplant.* 2013; 28: 869-878.
339. Maachi M, Piéroni L, Bruckert E, Jardel C, Fellahi S, Hainque B, Capeau J, Bastard JP. Systemic low-grade inflammation is related to both circulating and adipose tissue TNF $\alpha$  and adipose tissue TNF $\alpha$ , leptin and IL-6 levels in obese women. *Int J Ob.* 2004, 29: 993-997.
340. Macdonald J, Galley HF, Webster NR. Oxidative stress and gene expression in sepsis. *Br J Anaesth.* 2003, 90: 221-232.
341. Mak RH, Cheung W. Adipokines and gut hormones in end-stage renal disease. *Perit Dial Int.* 2007; 27(Suppl.2): 298-S302.
342. Mantzoros CS, Li T, Manson JE, Meigs JB, Hu FB. Circulating adiponectin levels are associated with better glycemic control, more favorable lipid profile, and reduced inflammation in women with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90: 4542-8.
343. Marcil V, Lavoie JC, Emonnot L, Seidman E, Levy E. Analysis of the effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage, antioxidant response and inflammation in THP-1 macrophages. *Clin Biochem.* 2011; 44(10-11): 873-83.
344. Marino P. Oxidative Enjury. En The veterinary UCI book. Wayne E. Wingfield, Marc R. Raffe editores. Teton NewMedia. 2001.
345. Marsell R, Krajisnik T, Göransson H, Ohlsson C, Ljunggren O, Larsson TE, Jonsson KB. Gene expression analysis of kidneys from transgenic mice expressing fibroblast growth factor-23. *Nephrol Dial Transplant.* 2008; 23: 827-833.
346. Martin A, David V, Quarles LD. Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways. *Physiol Rev.* 2012; 92: 131-155.
347. Massry SG, Coburn JW, Kleeman CR. Evidence for suppression of parathyroid gland activity by hypermagnesemia. *J Clin Invest.* 1970; 49: 1619-1629.
348. Masuyama R, Vriens J, Voets T, Karashima Y, Owsianik G, Vennekens R, Lieben L, Torrekens S, Moermans K, Vanden Bosch A, Bouillon R, Nilius B, Carmeliet. TRPV4-

- mediated calcium influx regulates terminal differentiation of osteoclasts. *Cell Metab.* 2008; 8: 257–265.
349. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology.* 2000; 153(1-3): 83-104.
350. Matsuzawa Y. Therapy Insight: adipocytokines in metabolic syndrome and related cardiovascular disease. *Nature Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 2006; 3, 35–42.
351. Mauriège P, Marette A, Atgié C, Bouchard C, Thériault G, Bukowiecki LK, Marceau P, Biron S, Nadeau A, Després JP. Regional variation in adipose tissue metabolism of severely obese premenopausal women. *J. Lipid. Res.* 1995; 36, 672–684.
352. Mayer-Davis EJ, Costacou T, King I, Zaccaro DJ, Bell RA. Plasma and dietary vitamin E in relation to incidence of type 2 *Diabetes*: the Insulin Resistance and Atherosclerosis Study (IRAS). *Diabetes Care.* 2002; 25: 2172–2177.
353. McCarthy DM. Adverse effects of proton pump inhibitor drug: clues and conclusions. *Curr Opin Gastroenterol.* 2010; 26: 624–631.
354. Mendoza FJ, Lopez I, Canalejo R, Almaden Y, Martin D, Aguilera-Tejero E, Rodriguez M. Direct upregulation of parathyroid calcium-sensing receptor and vitamin D receptor by calcimimetics in uremic rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296: F605-F613.
355. 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.* 2008, 73: 407-14.
356. Mentaverri R, Yano S, Chattopadhyay N, Petit L, Kifor O, Kamel S, Terwilliger EF, Brazier M, Brown EM. The calcium sensing receptor is directly involved in both osteoclast differentiation and apoptosis. *FASEB J.* 2006; 20: 2562–2564.
357. Meydani M. Vitamin E. *Lancet.* 1995; 345: 170.
358. Meydani, M. Nutrition interventions in aging and age-associated disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 928: 226-235.
359. Meyer JL. Can biological calcification occur in the presence of pyrophosphate? *Arch Biochem Biophys.* 1984; 231: 1-8.
360. Milla PJ, Aggett PJ, Wolff OH, Harries JT. Studies in primary hypomagnesaemia: evidence for defective carrier-mediated small intestinal transport of magnesium. *Gut.* 1979; 20: 1028-33.
361. Miller ER, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E. Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med.* 2005; 142: 37-46.
362. Mirza MA, Larsson A, Lind L, Larsson TE. Circulating fibro-blast growth factor-23 is associated with vascular dysfunction in the community. *Atherosclerosis.* 2009a; 205: 385-90.

363. Mirza MA, Larsson A, Melhus H, Lind L, Larsson TE. Serum intact FGF23 associate with left ventricular mass, hypertrophy and geometry in an elderly population. *Atherosclerosis*. 2009b; 207: 546-51.
364. Mittelman SD, Van Citters GW, Kirkman EL, Bergman, R N. Extreme insulin resistance of the central adipose depot *in vivo*. *Diabetes*. 2002; 51, 755–761.
365. Mizobuchi M, Towler D, Slatopolsky E. Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2009; 20, 1453–1464.
366. Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med*. 2001; 31: 509-519.
367. Moe S, Drüeke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, Ott S, Sprague S, Lameire N, Eknoyan G; Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: A position statement from kidney disease: improving global outcomes (KDIGO). *Kidney Int*. 2006, 69: 1945–1953.
368. Moe SM, Radcliffe JS, White KE, Gattone VH 2nd, Seifert MF, Chen X, Aldridge B, Chen NX. The pathophysiology of early stage chronic kidney disease-mineral bone disorder (CKD–MBD) and response to phosphate binders in the rat. *J. Bone Miner. Res*. 2011; 26: 2672–2681.
369. Moe SM, Chen NX. Inflammation and vascular calcification. *Blood Purif*. 2005; 23(1): 64-71
370. Moe SM, Chen NX. Pathophysiology of vascular calcification in chronic kidney disease. *Circ Res*. 2004; 95: 560–567.
371. Moe SM, Duan D, Doehle BP, O'Neill KD, Chen NX. Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels. *Kidney Int*. 2003; 63: 1003–1011.
372. Moe SM, O'Neill KD, Duan D, Ahmed S, Chen NX, Leapman SB, Fineberg N, Kopecky K. Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins. *Kidney Int*. 2002; 61: 638–647.
373. Moe SM. Disorders involving calcium, phosphorus, and magnesium. *Prim Care*. 2008; 35: 215-37.
374. Moe SM, Drüeke T, Lameire N, Eknoyan G. Chronic kidney disease mineral bone disorder: a new paradigm. *Adv. Chronic Kidney Dis*. 2007; 14, 3–12.
375. Molostvov G, Bland R, Zehnder D. Expression and role of the calcium-sensing receptor in the blood vessel wall. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2009; 10: 282-8.
376. Molostvov G, James S, Fletcher S, Bennett J, Lehnert H, Bland R, Zehnder D. Extracellular calcium-sensing receptor is functionally expressed in human artery. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 293: F946–F955.
377. Mondon CE, Dolkas CB, Reaven GM. Effect of acute uremia on insulin removal by the isolated perfused rat liver and muscle. *Metabolism*. 1978; 27: 133-42.



378. Montes de Oca A, Guerrero F, Martinez-Moreno JM, Madueño JA, Herencia C, Peralta A, Almaden Y, Lopez I, Aguilera-Tejero E, Gundlach K, Büchel J, Peter ME, Passlick-Deetjen J, Rodriguez M, Muñoz-Castañeda JR. Magnesium inhibits Wnt/ $\beta$ -catenin activity and reverses the osteogenic transformation of vascular smooth muscle cells. *PLoS One*. 2014 Feb 25; 9: e89525.
379. Montes de Oca A, Madueño JA, Martinez-Moreno JM, Guerrero F, Muñoz-Castañeda J, Rodriguez-Ortiz ME, Mendoza FJ, Almaden Y, Lopez I, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E. High-phosphate-induced calcification is related to SM22 $\alpha$  promoter methylation in vascular smooth muscle cells. *J Bone Miner Res*. 2010; 25(9): 1996-2005.
380. Montezano AC, Zimmerman D, Yusuf H, Burger D, Chignalia AZ, Wadhwa V, van Leeuwen FN, Touyz RM. Vascular smooth muscle cell differentiation to an osteogenic phenotype involves TRPM7 modulation by magnesium. *Hypertension*. 2010; 56: 453-462.
381. Moradi H, Sica DA, Kalantar-Zadeh K. Cardiovascular burden associated with uremic toxins in patients with chronic kidney disease. *Am J Nephrol*. 2013; 38: 136-148.
382. Morley S, Cecchini M, Zhang W, Virgulti A, Noy N, Atkinson J, Manor D. Mechanisms of ligand transfer by the hepatic tocopherol transfer protein. *J Biol Chem*. 2008; 283(26): 17797-804.
383. Mullen MJ, Wright D, Donald AE, Thorne S, Thomson H, Deanfield JE. Atorvastatin but not L-arginine improves endothelial function in type I diabetes mellitus: a double-blind study. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 36: 410-6.
384. Munteanu A, Zingg JM. Cellular, molecular and clinical aspects of vitamin E on atherosclerosis prevention. *Mol Aspects Med*. 2007; 28(5-6): 538-90.
385. Muteliefu G, Enomoto A, Jiang P, Takahashi M, Niwa T. Indoxyl sulphate induces oxidative stress and the expression of osteoblast-specific proteins in vascular smooth muscle cells. *Nephrol Dial Transplant*. 2009; 24: 2051-2058.
386. Nadra, Mason JC, Philippidis P, Florey O, Smythe CD, McCarthy GM, Landis RC, Haskard DO. 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*. 2005; 96, 1248-1256.
387. Nagai T, Yamada K, Kim HC, Noda Y, Nabeshima Y, Nabeshima T. Cognition impairment in the klotho gene mutant mice and oxidative stress. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*. 2003; 23: 211-7.
388. Nagamori K, Ishibashi M, Shiraishi T, Oomura Y, Sasaki K. Effects of leptin on hypothalamic arcuate neurons in Wistar and Zucker rats: an *in vitro* study. *Exp Biol Med*. 2003; 228: 1162-1167.
389. Naggert J, Fricker L, Varlamov O, Nishina P, Rouille Y, Steiner De, Carrol R, Paigen B y Leiter E. Hiperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxipeptidase E mutation wich reduces enzyme activity. *Nat Genet*. 1995; 10: 135- 142.

390. Nascimento MM, Hayashi SY, Riella MC, Lindholm B. Elevated levels of plasma osteoprotegerin are associated with all-cause mortality risk and atherosclerosis in patients with stages 3 to 5 chronic kidney disease. *Braz J Med Biol Res.* 2014; 22; 0:0.
391. Nasrallah MP, Ziyadeh FN. Overview of the physiology and pathophysiology of leptin with special emphasis on its role in the kidney. *Semin Nephrol.* 2013; 33:54-65. doi: 10.1016/j.semnephrol.2012.12.005.
392. Natanson C, Hoffman WD, Suffredini AF, Eichacker PQ, Danner RL. Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. *Ann Intern Med.* 1994; 120: 771.
393. Navarro JF, Macía ML, Gallego E, Méndez ML, Chahín J, García-Nieto V, García JJ. Serum magnesium concentration and PTH levels. Is long-term chronic hypermagnesemia a risk factor for adynamic bone disease? *Scand J Urol Nephrol.* 1997; 31: 275–280.
394. Navarro JF, Mora C, Jiménez A, Torres A, Macía M, García J. Relationship between serum magnesium and parathyroid hormone levels in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1999(a); 34: 43–48.
395. Navarro JF, Mora C, Macia M, Garcia J. Serum magnesium concentration is an independent predictor of parathyroid hormone levels in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int.* 1999(b); 19: 455–461.
396. Navarro-Gonzalez JF, Mora-Fernandez C, Garcia-Perez J. Clinical implications of disordered magnesium homeostasis in chronic renal failure and dialysis. *Semin Dial.* 2009; 22: 37-44.
397. Naveh-Many T, Friedlaender MM, Mayer H and Silver J. Calcium regulates parathyroid hormone messenger ribonucleic acid (mRNA), but not calcitonin mRNA *in vivo* in the rat. Dominant role of 1,25-dihydroxyvitamin D. *Endocrinology.* 1989; 125: 275-280.
398. Nelson RG, Gohdes DM, Everhart JE, Hartner JA, Zwemer FL, Pettitt DJ, Knowler WC. Lower-extremity amputations in NIDDM. 12 yr follow-up study in Pima Indians. *Diabetes Care.* 1988; 11: 8–16.
399. Neven E, Dauwe S, De Broe ME, D'Haese PC, Persy V. Endochondral bone formation is involved in media calcification in rats and in men. *Kidney Int.* 2007; 72: 574-81.
400. Neven E, De Schutter TM, Dams G, Gundlach K, Stepan S, Büchel J, Passlick-Deetjen J, D'Haese PC, Behets GJ. A magnesium based phosphate binder reduces vascular calcification without affecting bone in chronic renal failure rats. *PLoSOne.* 2014 Sep 17; 9(9): e107067. doi: 10.1371/journal.pone.0107067.
401. Neven E, De Schutter TM, De Broe ME, D'Haese PC. Cell biological and physicochemical aspects of arterial calcification. *Kidney Int.* 2011; 79: 1166-77.
402. Neven E, Persy V, Dauwe S, De Schutter T, De Broe ME, D'Haese PC. Chondrocyte rather than osteoblast conversion of vascular cells underlies medial calcification in uremic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; (9): 1741-50.

403. Nguyen-Yamamoto L, Rousseau L, Brossard JH, Lepage R, D'Amour P. Synthetic carboxyl-terminal fragments of parathyroid hormone (PTH) decrease ionized calcium concentration in rats by acting on a receptor different from the PTH/PTH-related peptide receptor. *Endocrinology*. 2001; 142: 1386-1392.
404. Nielsen PK, Feldt-Rasmussen U, Olgaard K. A direct effect in vitro of phosphate on PTH release from bovine parathyroid tissue slices but not from dispersed parathyroid cells. *Nephrol Dial Transplant*. 1996; 11: 1762-1768.
405. O'Rourke MF, Hashimoto J. Mechanical factors in arterial aging: a clinical perspective. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 50:1-13.
406. Oda Y, Tu CL, Pillai S, Bikle DD. The calcium sensing receptor and its alternatively spliced form in keratinocyte differentiation. *J Biol Chem*. 1998; 273: 23344–23352.
407. Oh J, Weng S, Felton SK, Bhandare S, Riek A, Butler B, Proctor BM, Petty M, Chen Z, Schechtman KB, Bernal-Mizrachi L, Bernal-Mizrachi C. 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin D inhibits foam cell formation and suppresses macrophage cholesterol uptake in patients with type 2 diabetes. *Circulation*. 2009; 120: 687-698.
408. Ohnuki T, Takahashi W, Ohnuki Y, Kawada S, Takizawa S. Significance of the presence of metabolic syndrome in patients with asymptomatic arteriosclerosis affecting the aorta and the cerebral, extra-cranial carotid and coronary arteries. *Intern Med*. 2013; 52: 523-7.
409. Ohyama Y, Kurabayashi M, Masuda H, Nakamura T, Aihara Y, Kaname T, Suga T, Arai M, Aizawa H, Matsumura Y, Kuro-o M, Nabeshima Yi, Nagail R.. Molecular cloning of rat klotho cDNA: markedly decreased expression of klotho by acute inflammatory stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 251: 920–925.
410. Olesen P, Nguyen K, Wogensen L, Ledet T, Rasmussen LM. Calcification of human vascular smooth muscle cells: associations with osteoprotegerin expression and acceleration by high-dose insulin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 292: H1058–1064.
411. O'Neill WC, Lomashvili KA, Malluche HH, Faugere MC, Riser BL. Treatment with pyrophosphate inhibits uremic vascular calcification. *Kidney Int*. 2011; 79, 512-7.
412. Orrico C, Pasquinelli G, Foroni L, Muscarà D, Tazzari PL, Ricci F, Buzzi M, Baldi E, Muccini N, Gargiulo M, Stella A. Dysfunctional vasa vasorum in diabetic peripheral artery obstructive disease with critical lower limb ischaemia. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg*. 2010; 40: 365–374.
413. Palamada J, Kehrer J. Inhibition of protein carbonyl formation and lipid peroxidation by glutathione in rat liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1992; 293: 103-109.
414. Parhami F, Tintut Y, Ballard A, Fogelman A, Demer L, Leptin enhances the calcification of vascular cells: artery wall as a target of leptin. *Circulation Research*. 2001; 88: 9: 954-960.
415. Parhami, F. Morrow AD, Balucan J, Leitinger N, Watson AD, Tintut Y, Berliner JA, Demer LL. 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.* 1997; 17, 680–687.
416. Perlstein TS, Gerhard-Herman M, Hollenberg NK, Williams GH, Thomas A. Insulin induces renal vasodilatation, increases plasma rennin activity and sensitizes the renal vasculature to angiotensin receptor blockade in healthy subjects. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18: 944–951.
417. Perwad F, Azam N, Zhang MY, Yamashita T, Tenenhouse HS, Portale AA. Dietary and serum phosphorus regulate fibroblast growth factor 23 expression and 1, 25-dihydroxyvitamin D metabolism in mice. *Endocrinology.* 2005; 146: 5358–5364.
418. Pignolo RJ, Shore EM. Circulating osteogenic precursor cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2010; 20: 171–180.
419. Plesková M, Beck KF, Behrens MH, Huwiler A, Fichtlscherer B, Wingerter O, Brandes RP, Mülsch A, Pfeilschifter J. Nitric oxide down-regulates the expression of the catalytic NADPH oxidase subunit Nox1 in rat renal mesangial cells. *FASEB J.* 2006; 20: 139–41.
420. Pollak MR, Brown EM, Chou YH, Hebert SC, Marx SJ, Steinmann B, Levi T, Seidman CE, Seidman JG. Mutations in the human Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor gene cause familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Cell.* 1993; 75: 1297–1303.
421. Pollak MR, Brown EM, Estep HL, McLaine PN, Kifor O, Park J, Hebert SC, Seidman CE, Seidman JG. Autosomal dominant hypocalcaemia caused by a Ca<sup>(2+)</sup>-sensing receptor gene mutation. *Nat Genet.* 1994; 8: 303–307.
422. Polzin DJ. Chronic kidney disease in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2011; 41: 15–30.
423. Potts JT Jr, Bringham FR, Gardella T, Nussbaum S, Segre GV, Kronenberg HM. Parathyroid hormone: physiology, chemistry, biosynthesis, secretion, metabolism and mode of action. In: DeGroot LJ, ed. *Endocrinology*, 3rd ed. 1995; 920–966. WB Saunders Company. Philadelphia.
424. Price PA, Faus SA, and Williamson MK. Warfarin-induced artery calcification is accelerated by growth and vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 317–327.
425. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 2: 817–24.
426. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18 (9):1400–7.
427. Price PA, Williamson, MK, Nguyen T, Than, TN. Serum levels of the fetuin-mineral complex correlate with artery calcification in the rat. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 1594–1600.
428. Prie D, Urena TP, Friedlander G. Latest findings in phosphate homeostasis. *Kidney Int.* 2009; 75: 882–9.

- 429.Prokop JW, Duff RJ, Ball HC, Copeland DL, Londraville RL. Leptin and leptin receptor: analysis of a structure to function relationship in interaction and evolution from humans to fish. *Peptides*. 2012; 38: 326-36.
- 430.Proudfoot D, Davies JD, Skepper JN, Weissberg PL, Shanahan CM. Acetylated low-density lipoprotein stimulates human vascular smooth muscle cell calcification by promoting osteoblastic differentiation and inhibiting phagocytosis. *Circulation*. 2002; 106(24): 3044-50.
- 431.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*. 2000; 87: 1055–1062.
- 432.Proudfoot D, Skepper JN, Shanahan CM, Weissberg PL. Calcification of human vascular cells *in vitro* is correlated with high levels of matrix Gla protein and low levels of osteopontin expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; 379-88.
- 433.Quinn SJ, Bai M, Brown EM. PH sensing by the calcium-sensing receptor. *J Biol Chem*. 2004; 279: 37241-37249.
- 434.Quinn SJ, Kifor O, Trivedi S, Diaz R, Vassilev P, Brown E. Sodium and ionic strength sensing by the calcium receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998; 31; 273(31): 19579-86.
- 435.Quiroz Y, Ferrebuz A, Vaziri ND, Rodriguez-Iturbe B. Effect of chronic antioxidant therapy with superoxide dismutase-mimetic drug, tempol, on progression of renal disease in rats with renal mass reduction. *Nephron Exp Nephrol*. 2009; 112: e31-42.
- 436.Quitterer U, Hoffmann M, Freichel M, Lohse MJ. Paradoxical block of parathormone secretion is mediated by increased activity of G alpha subunits. *J Biol Chem* 2001; 276: 6763–6769.
- 437.Rabbani SA, Mitchell J, Roy DR, Hendy GN, Goltzman D. Influence of the amino-terminus on *in vitro* and *in vivo* biological activity of synthetic parathyroid hormone-like peptides of malignancy. *Endocrinology*. 1988; 123: 2709-16.
- 438.Ramos LF, Kane J, McMonagle E, Le P, Wu P, Shintani A, Ikizler TA, Himmelfarb J. Effects of combination tocopherols and alpha lipoic acid therapy on oxidative stress and inflammatory biomarkers in chronic kidney disease. *J Ren Nutr*. 2011; 21: 211-8.
439. Raines EW, Lane TF, Iruela-Arispe ML, Ross R, Sage EH. The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor (PDGF)-AB and -BB and inhibits the binding of PDGF to its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89: 1281-5.
- 440.Rasol TJ, Capen CC. Calcium-regulating hormones and diseases of abnormal mineral (calcium, phosphorus, magnesium) metabolism. En Keneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, editores: *Clinical biochemistry of domestic animals*, San Diego, Academic Press. 1997.
- 441.Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988; 37: 1595–1607.

- 442.Reaven PD, Sacks J. Coronary artery and abdominal aortic calcification are associated with cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2005; 48: 379–385.
- 443.Renkema KY, Alexander RT, Bindels RJ, Hoenderop JG. Calcium and phosphate homeostasis: concerted interplay of new regulators. *Ann Med*. 2008; 40: 82–91.
- 444.Renkema KY, Velic A, Dijkman HB, Verkaart S, van der Kemp AW, Nowik M, Timmermans K, Doucet A, Wagner CA, Bindels RJ, Hoenderop JG.The calcium-sensing receptor promotes urinary acidification to prevent nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol*. 2009; 20: 1705–1713.
- 445.Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, Jahnen-Dechent W, Weissberg PL, Shanahan CM. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15: 2857–2867.
- 446.Reynolds JL, Skepper JN, McNair R, Kasama T, Gupta K, Weissberg PL, Jahnen-Dechent W, Shanahan CM.et al., Multifunctional roles for serum protein fetuin a in inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification. *J. Am. Soc. Nephrol*.2005; 16: 2920–2930.
- 447.Riccardi D, Park J, Lee WS, Gamba G, Brown EM, Hebert SC. Cloning and functional expression of a rat kidney extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 131–135.
- 448.Riccardi D, Traebert M, Ward DT, Kaissling B, Biber J, Hebert SC, Murer H. Dietary phosphate and parathyroid hormone alter the expression of the calcium-sensing receptor (CaR) and the Na<sup>+</sup>-dependent Pi transporter (NaPi-2) in the rat proximal tubule. *Pflugers Arch*. 2000; 441: 379–387.
- 449.Ricciarelli, R.,Tasinato A, Clément S, Ozer NK, Boscoboinik D, Azzi A. Alpha-tocopherol specifically inactivates cellular protein kinase C alpha by changing its phosphorylation state. *Biochem. J*. 1998; 334: 243–249.
- 450.Rigoulet M, Yoboue ED, Devin A. Mitochondrial ROS generation and its regulation: mechanisms involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 14: 459-68.
- 451.Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med*. 1993; 20; 328(20):1450-6.
- 452.Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehntopf M, Stumvoll M, Kahn CR, Blüher M. Antioxidants prevent healthpromoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci. U S A*. 2009; 106 (21): 8665–8670.
- 453.Robbins SL, Cotran RS. Kumar V. Pathologic Basis of Disease (Saunders, Philadelphia, 1984).
- 454.Rodríguez-Ortíz ME, Canalejo A, Herencia C, Martínez-Moreno J, Peralta-Ramírez A, Pérez-Martínez P, Navarro-González JF, Rodríguez M, Peter M, Gundlach K, Steppan S,

- Passlick-Deetjen J, Muñoz-Castañeda JR y Almaden Y. Magnesium modulate parathyroid hormone secretion and upregulates parathyroid receptor expressions at moderately low calcium concentration. *Nephrol Dial Transplant*. 2014; 29:282-289.
455. Rodríguez-Ortiz ME, Lopez I, Muñoz-Castañeda JR, Martínez-Moreno JM, Peralta Ramírez A, Pineda C, Canalejo A, Jaeger P, Aguilera-Tejero E, Rodríguez M, Felsenfeld Arnold y Almaden Y. Calcium deficiency reduces circulating levels of FGF23. *J Am Soc Nephrol*. 2012; 23: 1190-1197.
456. Rodríguez M, López I, Muñoz J, Aguilera-Tejero E, Almaden Y. FGF23 and mineral metabolism, implications in CKD-MBD. *Nefrologia*. 2012; 14; 32: 275-8.
457. Rogers M, Goettsch C, Aikawa E. Medial and Íntima I Calcification in Chronic Kidney Disease: Stressing the Contributions. *J Am Heart Assoc*. 2013; 2: e000481.
458. Rojas-Rivera J, Ortiz A, Egido J. Antioxidants in kidney diseases: the impact of bardoxolone methyl. *Int J Nephrol*. 2012; 2012: 321714.
459. Roman-García P, Barrio-Vázquez S, Fernández-Martin JL, Ruiz-Torres MP, Cannata-Andía JB. Natural antioxidants and vascular calcification: a possible benefit. *J Nephrol*. 2011; 24: 669-672.
460. Rossi M, Campbell KL, Johnson DW, Stanton T, Vesey DA, Coombes JS, Weston KS, Hawley CM, McWhinney BC, Ungerer JP, Isbel N. Protein-bound uremic toxins, inflammation and oxidative stress: a cross-sectional study in stage 3-4 chronic kidney disease. *Arch Med Res*. 2014; 45: 309-17.
461. Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor- $\alpha$ , overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem*. 2003; 278: 45777-45784.
462. Royer MC, Lemaire-Ewing S, Desrumaux C, Monier S, Pais de Barros JP, Athias A, Néel D, Lagrost L. 7-ketocholesterol incorporation into sphingolipid/ cholesterol-enriched (lipid raft) domains is impaired by Vitamin E: a specific role for  $\alpha$ -tocopherol with consequences on cell death. *J. Biol. Chem*. 2009; 284, 15826-15834.
463. Rude RK, Gruber HE. Magnesium deficiency and osteoporosis: animal and human observations. *J Nutr Biochem*. 2004; 15: 710-716.
464. Ruiz-Ramírez A, Ortiz-Balderas E, Cardozo-Saldaña G, Diaz-Diaz E, El-Hafidi M. Glycine restores glutathione and protects against oxidative stress in vascular tissue from sucrose-fed rats. *Clin Sci (Lond)*. 2013; 126(1): 19-29.
465. Russell J, Lettieri D, Sherwood LM. Suppression by 1,25(OH) $_2$ D $_3$  of transcription of the pre-parathyroid hormone gene. *Endocrinology*. 1986; 119: 2864-2866.
466. Sabeel A, Al-Homrany M. Complete resorption of massive soft tissue calcification in a hemodialysis patient after parathyroidectomy. *Am J Nephrol*. 2000; 20: 421-424.

467. Sakaguchi Y, Fujii N, Shoji T, Hayashi T, Rakugi H, Isaka Y. Hypomagnesemia is a significant predictor of cardiovascular and non-cardiovascular mortality in patients undergoing hemodialysis. *Kidney Int.* 2014; 85: 174-181.
468. Salem S, Bruck H, Bahlmann FH, Peter M, Passlick-Deetjen J, Kretschmer A, Steppan S, Valsek M, Kribben A, Nierhaus M, Jankowski V, Zidek W, Jankowski J. Relationship between magnesium and clinical biomarkers on inhibition of vascular calcification. *Am J Nephrol.* 2012; 35: 31-39.
469. Salonen JT, Nyyssönen K, Tuomainen TP, Mäenpää PH, Korpela H, Kaplan GA, Lynch J, Helmrich SP, Salonen R. Increased risk of non-insulin dependent *Diabetes* mellitus at low plasma vitamin E concentrations: a four year follow up study in men. *BMJ.* 1995; 311(7013): 1124–1127.
470. Sando K, Hoki M, Nezu R, Takagi Y, Okada A. Platelet glutathione peroxidase activity in long term total parenteral nutrition with and without selenium supplementation. *JPEN J Parenter Enteral Nutri.* 1992; 16:54.
471. Sarafidis P, Ruilope L. Insulin resistance, hyperinsulinemia and renal injury: mechanisms and implications. *Am J Nephrol.* 2006; 26: 232–244.
472. Satokata, I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, Maeda T, Takano Y, Uchiyama M, Heaney S, Peters H, Tang Z, Maxson R, Maas R. Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat. Genet.* 2000; 24, 391–395.
473. Savini I, Catani MV, Evangelista D, Gasperi V, Avigliano L. Obesity-Associated Oxidative Stress: Strategies Finalized to Improve Redox State. *International Journal of Molecular Sciences.* 2013; 14: 10497-10538.
474. Scherer PE. The rol of adiponectina in carbohydrate and lipid metabolism. *Endocrine Abstract.* 2003; 5: S20.
475. Schlingmann KP, Weber S, Peters M, Niemann Nejsum L, Vitzthum H, Klingel K, Kratz M, Haddad E, Ristoff E, Dinour D, Syrrou M, Nielsen S, Sassen M, Waldegger S, Seyberth HW, Konrad M. Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat Genet.* 2002; 31: 166–170.
476. Schoppet M, Al-Fakhri N, Franke FE, Katz N, Barth PJ, Maisch B, Preissner KT, Hofbauer LC. Localization of osteoprotegerin, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligandin Mönckeberg's sclerosis and atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 4104-12.
477. Schott HC 2<sup>nd</sup>. Chronic renal failure in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2007; 23: 593-612.
478. Schulze MB, Rimm EB, Shai I, Rifai N, Hu FB. Relationship between adiponectin and glycemic control, blood lipids, and inflammatory markers in men with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2004; 27: 1680-7.



- 479.Schürks M, Glynn RJ, Rist PM, Tzourio C, Kurth T. Effects of vitamin E on stroke subtypes: meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ*. 2010; 341: c570.
- 480.Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 1996; 98: 1101–6.
- 481.Schwille PO, Schmiedl A, Schwille R, Brunner P, Kissler H, Cesnjevar R, Gepp H. Media calcification, low erythrocyte magnesium, altered plasma magnesium, and calcium homeostasis following grafting of the thoracic aorta to the infrarenal aorta in the rat—differential preventive effects of long-term oral magnesium supplementation alone and in combination with alkali. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 2003; 57: 88-97.
- 482.See LC, Kuo CF, Chuang FH, Li HY, Chen YM, Chen HW, Yu KH. Serum uric acid is independently associated with metabolic syndrome in subjects with and without a low estimated glomerular filtration rate. *J Rheumatol*. 2009; 36: 1691–1698.
- 483.Serra D, Mera P, Malandrino MI, Mir JF, Herrero L. Mitochondrial Fatty Acid oxidation in obesity. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 19: 269-84.
- 484.Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM. Arterial Calcification in Chronic Kidney Disease: Key Roles for Calcium and Phosphate. *Circ Res*. 2011; 109: 697–711.
- 485.Shao JS, Cai J, Towler DA. Molecular mechanisms of vascular calcification: lessons learned from the aorta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2006; 26, 1423–1430.
- 486.Shao JS, Cheng SL, Pingsterhaus JM, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *J. Clin. Invest*. 2005; 115, 1210–1220.
- 487.Shao JS, Cheng SL, Sadhu J, Towler DA. Inflammation and the osteogenic regulation of vascular calcification: a review and perspective. *Hypertension*. 2010; 55: 579–592.
- 488.Shen B, Hagiwara M, Yao YY, Chao L, Chao J. Salutary effect of kallistatin in salt-induced renal injury, inflammation, and fibrosis via antioxidative stress. *Hypertension*. 2008; 51: 1358-65.
- 489.Shen YY, Charlesworth JA, Kelly JJ, Loi KW, Peake PW: Up-regulation of adiponectin, its isoforms and receptors in end-stage kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2007; 22 :171–178.
- 490.Shetty GK, Economides PA, Horton ES, Mantzoros CS, Veves A. Circulating adiponectin and resistin levels in relation to metabolic factors, inflammatory markers, and vascular reactivity in diabetic patients and subjects at risk for diabetes. *Diabetes Care*. 2004; 27: 2450-7.
- 491.Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, Fujita T, Nakahara K, Fukumoto S, Yamashita T. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res*. 2004a; 19: 429-35.

492. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Tomizuka K, Yamashita T. Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest*. 2004b; 113: 561–568.
493. Shimada T, Takeshita Y, Murohara T, Sasaki K, Egami K, Shintani S, Katsuda Y, Ikeda H, Nabeshima Y, Imaizumi T. Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the precocious-aging Klotho mouse. *Circulation*. 2004c; 110: 1148–1155.
494. Shimada T, Yamazaki Y, Takahashi M, Hasegawa H, Urakawa I, Oshima T, et al. Vitamin D receptor-independent FGF23 actions in regulating phosphate and vitamin D metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005; 289: F1088-F1095.
495. Shimoishi K, Anraku M, Kitamura K, Tasaki Y, Taguchi K, Hashimoto M, Fukunaga E, Maruyama T, Otagiri M. An oral adsorbent, AST-120 protects against the progression of oxidative stress by reducing the accumulation of indoxyl sulfate in the systemic circulation in renal failure. *Pharm Res*. 2007; 24: 1283-9.
496. Shroff RC, McNair R, Figg N, Skepper JN, Schurgers L, Gupta A, Hiorns M, Donald AE, Deanfield J, Rees L, Shanahan CM. Dialysis accelerates medial vascular calcification in part by triggering smooth muscle cell apoptosis. *Circulation*. 2008; 118, 1748–1757.
497. Shroff RC, McNair R, Skepper JN, Figg N, Schurgers LJ, Deanfield J, Rees L, Shanahan CM. Chronic mineral dysregulation promotes vascular smooth muscle cell adaptation and extracellular matrix calcification. *J Am Soc Nephrol*. 2010; 21: 103 – 112.
498. Siew ED, Ikizler TA. Insulin resistance and protein energy metabolism in patients with advanced chronic kidney disease. *Semin Dial*. 2010, 23: 378–382.
499. Singh U, Jialal I. Anti-inflammatory effects of alpha-tocopherol. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1031: 195–203.
500. Skalicky J, Muzakova V, Kandar R, Meloun M, Rousar T, Palicka V: Evaluation of oxidative stress and inflammation in obese adults with metabolic syndrome. *Clin Chem Lab Med*. 2008; 46: 499-505.
501. Slatopolsky E, Finch J, Denda M, Ritter C, Zhong M, Dusso A, MacDonald PN, Brown AJ. Phosphorus restriction prevents parathyroid gland growth: high phosphorus directly stimulates PTH secretion in vitro. *J Clin Invest*. 1996; 97: 2534- 2540.
502. Slee A. Exploring metabolic dysfunction in chronic kidney disease. *Nutrition & Metabolism*. 2012, 9: 36.
503. Smith CV. Correlations and apparent contradictions in assessment of oxidant stress *in vivo*. *Free Radic Biol Med*. 1991; 10: 217.
504. Soetikno V, Sari FR, Lakshmanan AP, Arumugam S, Harima M, Suzuki K, Kawachi H, Watanabe K. Curcumin alleviates oxidative stress, inflammation, and renal fibrosis in remnant kidney through the Nrf2-keap1 pathway. *Mol Nutr Food Res*. 2013; 57(9): 1649-59.

- 
- 505.Son BK, Kozaki K, Iijima K, Eto M, Nakano T, Akishita M, Ouchi Y. Gas6/Axl-PI3K/Akt pathway plays a central role in the effect of statins on inorganic phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 2007; 556(1-3): 1-8.
- 506.Soor GS, Vukin I, Leong SW, Oreopoulos G, Butany J. Peripheral vascular disease: who gets it and why? A histomorphological analysis of 261 arterial segments from 58 cases. *Pathology* 2008; 40: 385–391.
- 507.Soriano S, Carmona A , Triviño F, Rodriguez M, Alvarez-Benito M, Martin-Malo A, Alvarez-Lara MA, Ramirez R, Aljama P, Carracedo J.Endothelial damage and vascular calcification in patients with chronic kidney disease.*Am J Physiol Renal Physiol.* 2014; ajprenal.00114.2014. doi: 10.1152/ajprenal.00114.2014.
- 508.Sowers JR, Whaley-Connell A, Epstein M: The emerging clinical implication of the role of aldosterone in the metabolic syndrome and resistant hypertension. *Ann Intern Med.* 2009; 150:776–783.
- 509.Speer MY, Li X., Hiremath PG, Giachelli CM. Runx2/Cbfa1, but not loss of myocardin, is required for smooth muscle cell lineage reprogramming toward osteochondrogenesis. *J. Cell. Biochem.* 2010; 110, 935–947.
- 510.Speer MY, Yang HY, Brabb T, Leaf E, Look A, Lin WL, Frutkin A, Dichek D, Giachelli CM. Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. *Circ Res.* 2009; 104: 733-41.
- 511.Spiegel DM, Farmer B. Long-term effects of magnesium carbonate on coronary artery calcification and bone mineral density in hemodialysis patients: a pilot study. *Hemodial Int.* 2009; 13:453-459.
- 512.Spiegel DM, Farmer B, Smits G, Chonchol M. Magnesium carbonate is an effective phosphate binder for chronic hemodialysis patients: a pilot study. *J Ren Nutr.* 2007; 17: 416-422.
- 513.Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women.*N Engl J Med.* 1993; 20; 328: 1444-9.
- 514.Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15: 1512-31.
- 515.Stefanyk LE, Dyck DJ. The interaction between adipokines, diet and exercise on muscle insulin sensitivity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010; 13: 255-9.
- 516.Steitz SA, Speer MY, Curinga G, et al., Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res.* 2001; 89: 1147-1154.

517. Stephens JM, Lee J, Pilch PF. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem.* 1997; 272: 971–976.
518. Stubbs JR, Liu S, Tang W, Zhou J, Wang Y, Yao X, Quarles LD. Role of hyperphosphatemia and 1,25-dihydroxyvitamin D in vascular calcification and mortality in fibroblastic growth factor 23 null mice. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 2116-24.
519. Sugiura H, Yoshida T, Tsuchiya K, Mitobe M, Nishimura S, Shiota S, Akiba T, Nihei H. Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 2005; 20: 2636-45.
520. Sun CY, Chan SC, Wu MS. Suppression of Klotho expression by protein-bound uremic toxins is associated with increased DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation. *Kidney Int.* 2012; 8: 640-650.
521. Sutra T, Morena M, Bargnoux AS, Caporiccio B, Canaud B, Cristol JP. Superoxide production: a procalcifying cell signalling event in osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells exposed to calcification media. *Free Radic Res.* 2008; 42(9):789-797.
522. Takada T, Suzuki H. Mol. Molecular mechanisms of membrane transport of vitamin E Nutr. Food Res. 2010, 54, 616–622.
523. Tanimura A, McGregor DH, Anderson HC. Calcification in atherosclerosis. II. Animal studies. *J. Exp. Pathol.* 1986a; 2: 275–297.
524. Tanimura A, McGregor DH, Anderson HC. Calcification in atherosclerosis. I. Human studies. *J. Exp. Pathol.* 1986b; 2: 261–273.
525. Tapia E, Soto V, Ortiz-Vega KM, Zarco-Márquez G, Molina-Jijón E, Cristóbal-García M, Santamaría J, García-Niño WR, Correa F, Zazueta C, Pedraza-Chaverri J. Curcumin induces Nrf2 nuclear translocation and prevents glomerular hypertension, hyperfiltration, oxidant stress, and the decrease in antioxidant enzymes in 5/6 nephrectomized rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2012; 2012: 269039.
526. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark . Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell.* 1995; 83: 1263-71.
527. Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell.* 1981; 26(1 Pt 1):99-105.
528. The ADHR Consortium. Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nat Genet.* 2000; 26: 345-348.
529. Thomas G, Sehgal AR, Kashyap SR, Srinivas TR, Kirwan JP, Navaneethan SD. Metabolic syndrome and kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *CJASN.* 2011; 6:2364–2373.

- 530.Thornalley PJ, Vasak M. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1985; 827: 36-44.
531. Titan SM, Zatz R, Gracioli FG, dos Reis LM, Barros RT, Jorgetti V, Moysés RM. FGF-23 as a predictor of renal outcome in diabetic nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011; 6: 241-7.
- 532.Tintut Y, Patel J, Territo M, Saini T, Parhami F, Demer LL. Monocyte/macrophage regulation of vascular calcification in vitro. *Circulation*. 2002; 105: 650–655.
- 533.Topala CN, Schoeber JP, Searchfield LE et al., Activation of the  $Ca^{2+}$ -sensing receptor stimulates the activity of the epithelial  $Ca^{2+}$  channel TRPV5. *Cell Calcium*. 2009; 45: 331–339.
- 534.Touyz RM. Transient receptor potential melastatin 6 and 7 channels, magnesium transport, and vascular biology: implications in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008; 294: H1103–H1118.
- 535.Towler DA, Bidder M, Latifi T, Coleman T, Semenkovich CF. Diet-induced diabetes activates an osteogenic gene regulatory program in the aortas of low density lipoprotein receptor-deficient mice. *J. Biol. Chem*. 1998; 273: 30427–30434.
- 536.Towler DA. Oxidation, inflammation, and aortic valve calcification peroxide paves an osteogenic path. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 52: 851-854.
- 537.Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med*. 2007; 43: 4-15.
- 538.Traber MG, Kayden HJ Preferential incorporation of alpha-tocopherol vs gamma-tocopherol in human lipoproteins. *Am J Clin Nutr*. 1989; 49: 517-26.
- 539.Trayhurn, P. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiological Reviews*, 2013; 93: 1-21.
- 540.Tsirpanlis G. Is inflammation the link between atherosclerosis and vascular calcification in chronic kidney disease? *Blood Purif*. 2007; 25: 179-82.
- 541.Turgut F, Kanbay M, Metin MR, Uz E, Akcay A, Covic A. Magnesium supplementation helps to improve carotid intima media thickness in patients on hemodialysis. *Int Urol Nephrol*. 2008; 40: 1075-1082.
- 542.Tzanakis I, Pras A, Kounali D, Mamali V, Kartsonakis V, Mayopoulou-Symvoulidou D, Kallivretakis N. Mitral annular calcifications in haemodialysis patients: a possible protective role of magnesium. *Nephrol Dial Transplant*. 1997; 12: 2036–2037.
- 543.Tzanakis IP, Papadaki AN, Wei M, Kagia S, Spadidakis VV, Kallivretakis NE, Oreopoulos DG. Magnesium carbonate for phosphate control in patients on hemodialysis. A randomized controlled trial. *Int Urol Nephrol*. 2008; 40: 193-201.

- 
544. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature*. 2006; 444 (7120): 770-4.
545. van Abel M, Hoenderop JG, van der Kemp AW, van Leeuwen JP, Bindels RJ. Regulation of the epithelial  $\text{Ca}^{2+}$  channels in small intestine as studied by quantitative mRNA detection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G78–G85.
546. van der Eerden BC, van der Eerden BC1, Hoenderop JG, de Vries TJ, Schoenmaker T, Buurman CJ, Uitterlinden AG, Pols HA, Bindels RJ, van Leeuwen JP. The epithelial  $\text{Ca}^{2+}$  channel TRPV5 is essential for proper osteoclastic bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 17507–17512.
547. van der Eerden BC, Weissgerber P, Fratzl-Zelman N, Olausson J, Hoenderop JG, Schreuders-Koedam M, Eijken M, Roschger P, de Vries TJ, Chiba H, Klaushofer K, Flockerzi V, Bindels RJ, Freichel M, van Leeuwen JP. The transient receptor potential channel TRPV6 is dynamically expressed in bone cells but is not crucial for bone mineralization in mice. *J Cell Physiol*. 2011; 227: 1951–1959.
548. Van der Wijst J, Bindels RJ, Hoenderop JG.  $\text{Mg}^{2+}$  homeostasis: the balancing act of TRPM6. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2014; 23: 361-369.
549. Villa-Bellosta R, Levi M, Sorribas V. Vascular smooth muscle cell calcification and SLC20 inorganic phosphate transporters: effects of PDGF, TNF- $\alpha$ , and Pi. *Pflugers Arch*. 2009; 458, 1151–1161.
550. Virchow, R. Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI—Atheromatous affection of arteries. 1858. *Nutr. Rev.* 1989; 47, 23–25.
551. Wada T, McKee MD, Steitz S, Giachelli CM. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by osteopontin. *Circ Res*. 1999; 84: 166-78.
552. Wahba IM, Mak RH: Obesity and Obesity-Initiated Metabolic Syndrome: Mechanistic Links to Chronic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007, 2: 550-562.
553. Walder RY, Landau D, Meyer P et al., Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nat Genet*. 2002; 31: 171–174.
554. Wang CC, Sorribas V, Sharma G, Levi M, Draznin B. Insulin attenuates vascular smooth muscle calcification but increases vascular smooth muscle cell phosphate transport. *Atherosclerosis*. 2007; 195: 65–75.
555. Wang Y, Lam KS, Yau MH, Xu A. Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications. *Biochem J*, 2008. 409: 623–633.
556. Ward NC, Wu JH, Clarke MW, Puddey IB, Burke V, Croft KD, Hodgson JM. The effect of vitamin E on blood pressure in individuals with type 2 *Diabetes*: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Hypertens*. 2007; 25: 227-34.

557. Ward MR, Pasterkamp G, Yeung AC, Borst C. Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications. *Circulation*. 2000; 102, 1186–1191.
558. Wardle EN Cellular oxidative processes in relation to renal disease. *Am J Nephrol*. 2005; 25: 13-22.
559. Weinberg J. Lipotoxicity. *Kidney Int*. 2006; 70: 1560–1566.
560. Weitz ZW, Birnbaum AJ, Sobotka PA, Zarling EJ, Skosey JL. High breath pentane concentrations during acute myocardial infarction. *Lancet*. 1991; 337: 933.
561. Wesson DE and Simoni J. Acid retention during kidney failure induces endothelin and aldosterone production which lead to progressive GFR decline, a situation ameliorated by alkali diet. *Kidney Int*. 2010; 78: 1128-35.
562. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE y Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in Obesity and type 2 Diabetes: close association with Insuline Resistance and hiperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86: 1930- 1935.
563. Więcek A, Adamczak M, Chudek J: Adiponectin-an adipokine with unique metabolic properties. *Nephrol Dial Transplant*. 2007; 22: 981–988.
564. Wu JH, Ward NC, Indrawan AP, Almeida CA, Hodgson JM, Proudfoot JM, Puddey IB, Croft KD. Effects of alpha-tocopherol and mixed tocopherol supplementation on markers of oxidative stress and inflammation in type 2 *Diabetes*. *Clin Chem*. 2007; 53: 511–519.
565. Yamada S, Taniguchi M, Tokumoto M, Toyonaga J, Fujisaki K, Suehiro T, Noguchi H, Iida M, Tsuruya K, and Kitazono T. The antioxidant tempol ameliorates arterial medial calcification in uremic rats: important role of oxidative stress in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2012; 27: 474-85.
566. Yao, Y. Bennett BJ, Wang X, Rosenfeld ME, Giachelli C, Lusis AJ, Boström KI. Inhibition of bone morphogenetic proteins protects against atherosclerosis and vascular calcification. *Circ. Res*. 2010; 107: 485–494.
567. Yonova DH, Vazlov ES, Trendafilov II, Stoinova VV, Nedevska MT, Antonov SA. First impressions of cardiovascular calcification treatment in hemodialysis patients with a new dialysis fluid containing sodium thiosulphate (STS). *Int J Artif Organs*. 2014; 37: 308-314.
568. Yuan LQ, Zhu JH, Wang HW, Liang QH, Xie H, Wu XP, Zhou H, Cui RR, Sheng ZF, Zhou HD, Zhu X, Liu GY, Liu YS, Liao EY. RANKL is a downstream mediator for insulin-induced osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *PLoS One*. 2011; 6: e29037.
569. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 1999; 19: 972–978.

- 570.Zeadin MG, Butcher MK, Shaughnessy SG, Werstuck GH. Leptin promotes osteoblast differentiation and mineralization of primary cultures of vascular smooth muscle cells by inhibiting glycogen synthase kinase (GSK)-3 $\beta$ . *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 425: 924-930.
- 571.Zebboudj AF, Imura M, Boström K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem.* 2002; 277: 4388-94.
- 572.Zebboudj AF, Shin V, Boström K. Matrix GLA protein and BMP-2 regulate osteoinduction in calcifying vascular cells. *J Cell Biochem.* 2003; 90: 756-65.
- 573.Zhan CD, Sindhu RK, Pang J, Ehdai A, Vaziri ND. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the spontaneously hypertensive rat kidney: effect of antioxidant-rich diet. *J Hypertens.* 2004; 22: 2025-33.
- 574.Zhang L, Fujii S, Igarashi J, Kosaka H. Effects of thiol antioxidant on reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in hypertensive Dahl salt-sensitive rats. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37: 1813-20.
- 575.Zhang L, Zalewski A, Liu Y, Mazurek T, Cowan S, Martin JL, Hofmann SM, Vlassara H, Shi Y. Diabetes-induced oxidative stress and low-grade inflammation in porcine coronary arteries. *Circulation.* 2003; 108: 472-478.
- 576.Zhang M, Zhou SH, Li XP, Shen XQ, Fang ZF, Liu QM, Qiu SF, Zhao SP. Atorvastatin downregulates BMP 2 expression induced by oxidized low-density lipoprotein in human umbilical vein endothelial cells. *Circ J.* 2008; 72: 807-812.
- 577.Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L y Friedman JM. Positional cloning of mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994; 372: 425 - 432.
- 578.Zhao M-M, Xu M-J, Cai Y, Zhao G, Guan Y, Kong W, Tang C, Wang X. Mitochondrial reactive oxygen species promote p65 nuclear translocation mediating high-phosphate-induced vascular calcification in vitro and *in vivo*. *Kidney Int.* 2011; 79: 1071-1079.
- 579.Zhao W, Swanson SA, Ye J, Li X, Shelton JM, Zhang W, Thomas GD. Reactive oxygen species impair sympathetic vasoregulation in skeletal muscle in angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension.* 2006, 48: 637-643.
- 580.Ziobro A, Duchnowicz P, Mulik A, Koter-Michalak M, Broncel M. Oxidative damages in erythrocytes of patients with metabolic syndrome. *Mol Cell Biochem.* 2013; 378 (1-2): 267-73.





