

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
INSTITUTO MAIMÓNIDES DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE CÓRDOBA
(IMIBIC)
HOSPITAL UNIVERSITARIO REINA SOFÍA

**INFLUENCIA DEL SUPLEMENTO DE
MAGNESIO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO, LA
INFLAMACIÓN Y LA DISFUNCIÓN VASCULAR
ASOCIADA A LA ENFERMEDAD RENAL
CRÓNICA: ESTUDIOS IN VIVO E IN VITRO**

INFLUENCE OF MAGNESIUM
SUPPLEMENTATION ON OXIDATIVE STRESS,
INFLAMMATION AND VASCULAR
DYSFUNCTION ASSOCIATED TO CHRONIC
KIDNEY DISEASE: IN VIVO AND IN VITRO
STUDIES

Doctorando: **Rodrigo López Baltanás**

Directores: Yolanda Almadén Peña

Juan Rafael Muñoz Castañeda

María Encarnación Rodríguez Ortiz

Programa: Doctorado en Biomedicina

12 de Abril del 2023

TITULO: *INFLUENCIA DEL SUPLEMENTO DE MAGNESIO SOBRE EL ESTRES OXIDATIVO, LA INFLAMACION Y LA DISFUNCION VASCULAR ASOCIADA A LA ENFERMEDAD RENAL CRONICA: ESTUDIOS IN VIVO E IN VITRO*

AUTOR: *Rodrigo López Baltanás*

© Edita: UCOPress. 2023
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es>



TÍTULO DE LA TESIS: Influencia del suplemento de magnesio sobre el estrés oxidativo, la inflamación y la disfunción vascular asociada a la enfermedad renal crónica: Estudios in vivo e in vitro

DOCTORANDO/A: Rodrigo López Baltanás

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 inició la inscripción en el grupo “Metabolismo del Calcio y Calcificación Vascular” del IMIBIC en el 2017 en el programa de Doctorado en Biomedicina con título de tesis doctoral:” Influencia del suplemento de magnesio sobre los procesos de inflamación y disfunción endotelial en un modelo experimental de síndrome metabólico o arteriosclerosis y enfermedad renal” en el IMIBIC bajo la dirección de los directores Yolanda Almadén Peña, Juan Rafael Muñoz Castañeda y María Encarnación Rodríguez Ortiz. Durante la realización de la tesis, el doctorando ha podido conocer en profundidad el trabajo de laboratorio aprendiendo técnicas de biología celular, manipulación de animales de laboratorio, cultivos celulares y la obtención de resultados de investigación de calidad. De hecho, la investigación realizada ha derivado en una patente relativa al uso de Mg para inhibir la inflamación en la pared vascular. Durante este período tuvo la oportunidad de realizar investigación clínica participando en los ensayos clínicos del grupo realizando mediciones de presión sanguínea, medida de velocidad de onda de pulso, y valoración de la función endotelial de pacientes con enfermedad renal crónica incluidos en los ensayos clínicos del grupo. Durante este tiempo ha podido también colaborar con otros miembros del grupo de investigación participando de sus investigaciones. Durante el año 2021, el doctorando se ha desplazado al Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS) para realizar una estancia con el grupo “Fisipatología vascular” del Dr. Juan Ureña López. El objetivo de esta movilidad ha sido evaluar el efecto del suplemento de Mg sobre la rigidez arterial en un modelo experimental de síndrome metabólico (ratas Zucker) e

insuficiencia renal/CV. Fruto de su vinculación al grupo y de su trabajo ha publicado 5 artículos. En 2 de ellos, el doctorando figura como primer autor.

Desde 2018 al 2019 disfrutó de un contrato de obra y servicio como titulado superior por la UCO en el marco de un acuerdo de colaboración entre el IP del grupo (Juan Rafael Muñoz Castañeda) y la empresa biotecnológica SANIFIT. En este tiempo se responsabilizó de evaluar in vitro el efecto del producto sintetizado por SANIFIT (SNF472) sobre la calcificación de células de músculo liso vascular. Del mismo modo fue responsable de la cuantificación de distintos biomarcadores (inflamación, función renal, calcificación) en el plasma de pacientes en diálisis tratados con el producto SNF472 dentro de un ensayo clínico realizado por la empresa. Lamentablemente los interesantes datos que se generaron no son de momento objeto de publicaciones científicas dado que se encuentran sujetos al acuerdo de confidencialidad firmado entre la empresa e IMIBIC por lo que no se puede cuantificar en forma de publicaciones científicas la labor investigadora que realizó.

Actualmente, desde 2020, realiza un contrato predoctoral de formación en investigación de la salud (PFIS), expediente FI19/00317, titulado "Estudios Básicos y Clínicos acerca de la disfunción vascular inducida por altos niveles de FGF23 en pacientes urémicos" dirigido por Juan Rafael M.C. El objetivo principal de esta línea es identificar biomarcadores plasmáticos y urinarios con capacidad para predecir el avance y la progresión de la enfermedad renal crónica (ERC). En esta línea se incluye el uso de modelos in vitro, modelos experimentales en animales y ensayos clínicos con pacientes usando técnicas de proteómica y genómica en plasma y orina dirigidas a la detección precoz de marcadores de progresión de ERC. Dentro de esta línea el doctorando participa en la realización de estudios de investigación básica dirigidos a la identificación de biomarcadores de progresión del deterioro renal durante la ERC; estos trabajos contribuirán a esclarecer los mecanismos de progresión de ERC y a identificar nuevas dianas terapéuticas. Esta línea de investigación cuenta con financiación de proyectos de investigación ya existentes FIS PI14/0638, PI17/1010 y PI18/0138. Todos estos proyectos contienen investigación clínica con pacientes de nuestro hospital y otros centros de Andalucía además de investigación básica con modelos experimentales animales y cultivos celulares.

Además, ha colaborado en el desarrollo de actividades docentes tales como impartir clases prácticas de la asignatura Bases Celulares y Moleculares de las Enfermedades Renales del Máster de Investigación Biomédica Traslacional de la Universidad de Córdoba en el IMIBIC. Además, contribuyó a la formación de alumnos en prácticas pertenecientes al módulo de formación profesional del Ciclo Formativo de Grado Superior de Laboratorio clínico y biomédico de la Fuensanta.

La presente Tesis Doctoral, llevada a cabo bajo nuestra dirección, se ha desarrollado durante el período comprendido entre el 2017 y 2023 y está encuadrada en el programa de Doctorado en Biomedicina de la Universidad de Córdoba.

A continuación, se detalla la producción científica derivada del programa de doctorado del doctorando:

Publicaciones científicas indexadas:

1. Rodríguez-Ortiz ME, Díaz-Tocados JM, Muñoz-Castañeda JR, Herencia C, Pineda C, Martínez-Moreno JM, Montes de Oca A, López-Baltanás R, Alcalá-Díaz J, Ortiz A, Aguilera-Tejero E, Felsenfeld A, Rodríguez M, Almadén Y. Inflammation both increases and causes resistance to FGF23 in normal and uremic rats. *Clin Sci (Lond)*. 2020 Jan 17;134(1):15-32. doi: 10.1042/CS20190779. PMID: 31860056.
2. Pendón-Ruiz de Mier MV, Vergara N, Rodelo-Haad C, López-Zamorano MD, Membrives-González C, López-Baltanás R, Muñoz-Castañeda JR, Caravaca F, Martín-Malo A, Felsenfeld AJ, De la Torre EJ, Soriano S, Santamaría R, Rodríguez M. Assessment of Inorganic Phosphate Intake by the Measurement of the Phosphate/Urea Nitrogen Ratio in Urine. *Nutrients*. 2021 Jan 20;13(2):292. doi: 10.3390/nu13020292. PMID: 33498560; PMCID: PMC7909516.
3. López-Baltanás R, Encarnación Rodríguez-Ortiz M, Canalejo A, Díaz-Tocados JM, Herencia C, Leiva-Cepas F, Torres-Peña JD, Ortíz-Morales A, Muñoz-Castañeda JR, Rodríguez M, Almadén Y. Magnesium supplementation reduces inflammation in rats with induced chronic kidney disease. *Eur J Clin Invest*. 2021 Aug;51(8):e13561. doi: 10.1111/eci.13561. Epub 2021 Apr 18. PMID: 33870500.
4. López-Baltanás R, Rodríguez-Ortiz ME, Díaz-Tocados JM, Martínez-Moreno JM, Membrives C, Rodelo-Haad C, Pendón Ruiz de Mier MV, Rodríguez M, Canalejo A, Almadén Y, Muñoz-Castañeda JR. Dietary Mg Supplementation Decreases Oxidative Stress, Inflammation, and Vascular Dysfunction in an Experimental Model of Metabolic Syndrome with Renal Failure. *Antioxidants (Basel)*. 2023 Jan 27;12(2):283. doi: 10.3390/antiox12020283. PMID: 36829843; PMCID: PMC9952257.
5. Vergara N, de Mier MVP, Rodelo-Haad C, Revilla-González G, Membrives C, Díaz-Tocados JM, Martínez-Moreno JM, Torralbo AI, Herencia C, Rodríguez-Ortiz ME, López-Baltanás R, Richards WG, Felsenfeld A, Almadén Y, Martín-Malo A, Ureña J, Santamaría R, Soriano S, Rodríguez M, Muñoz-Castañeda JR. The direct effect of fibroblast growth factor 23 on vascular smooth muscle cell phenotype and function. *Nephrol Dial Transplant*. 2023 Feb 13;38(2):322-343. doi: 10.1093/ndt/gfac220. PMID: 35867864; PMCID: PMC9923714.

Comunicaciones a Congresos Nacionales e Internacionales:

1. XLV Congreso de la Sociedad Andaluza de Nefrología 2017. “¿Existe una relación entre la filtración glomerular y niveles intactos de FGF-23 en fases tempranas de la enfermedad crónica renal?”.

2. XLVII Congreso nacional de Sociedad Española de Nefrología 2017. "Comportamiento de FGF23 intacto y c-terminal FGF23 en fases iniciales de enfermedad renal crónica: efectos diferentes".
3. XLIX Congreso nacional de Sociedad Española de Nefrología 2019. "En estadios tempranos de enfermedad renal crónica el exceso de FGF23 incrementa el remodelado óseo y retrasa la maduración de osteoblastos".
4. American Society of Nephrology 2019. "Effect of magnesium on the processes of inflammation and oxidative stress associated with chronic kidney disease".
5. L Congreso de la Sociedad Española de Nefrología 2020. "Efecto del suplemento de magnesio en la dieta sobre la disfunción endotelial en un modelo de síndrome metabólico y enfermedad renal".

Proyectos

1. Estudio del papel de FGF23 como inductor de hipertensión arterial y disfunción vascular en pacientes con enfermedad renal crónica. Cristian Rodelo Haad. (FIBICO). 01/01/2021-31/12/2023. 149.988,75.
2. Ensayo clínico fase II, abierto, para evaluar en pacientes con enfermedad renal crónica grado 3b-4 la eficacia del suplemento de magnesio sobre la calcificación vascular y la densidad ósea. Sociedad Española de Nefrología. Mariano Rodríguez Portillo. 01/01/2019-31/12/2020. 24.000

Premios:

1. Premio a la mejor comunicación oral en el XLIX Congreso nacional de Sociedad Española de Nefrología 2019. "En estadios tempranos de enfermedad renal crónica el exceso de FGF23 incrementa el remodelado óseo y retrasa la maduración de osteoblastos".

Apoyo en Actividades Docentes:

1. Participación en la formación de alumnos en prácticas del ciclo formativo "LABORATORIO CLÍNICO Y BIOMÉDICO bajo el convenio UCOIMIBIC-Instituto de la Fuensanta.
2. Formación de los alumnos del Máster en "Investigación Biomédica Traslacional" en el seno del grupo "Metabolismo del calcio. Calcificación vascular". "LABORATORIO CLÍNICO Y BIOMÉDICO"

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

Córdoba, 11 de Abril de 2023

Firma del/de los director/es

ALMADEN
PEÑA
YOLANDA -
30532724V

Firmado digitalmente
por ALMADEN PEÑA
YOLANDA -
30532724V
Fecha: 2023.04.11
17:37:30 +02'00'

Fdo.: Yolanda Almadén Peña

MUÑOZ
CASTAÑEDA
JUAN RAFAEL
- 30821424K

Firmado digitalmente
por MUÑOZ
CASTAÑEDA JUAN
RAFAEL - 30821424K
Fecha: 2023.04.11
12:24:31 +02'00'

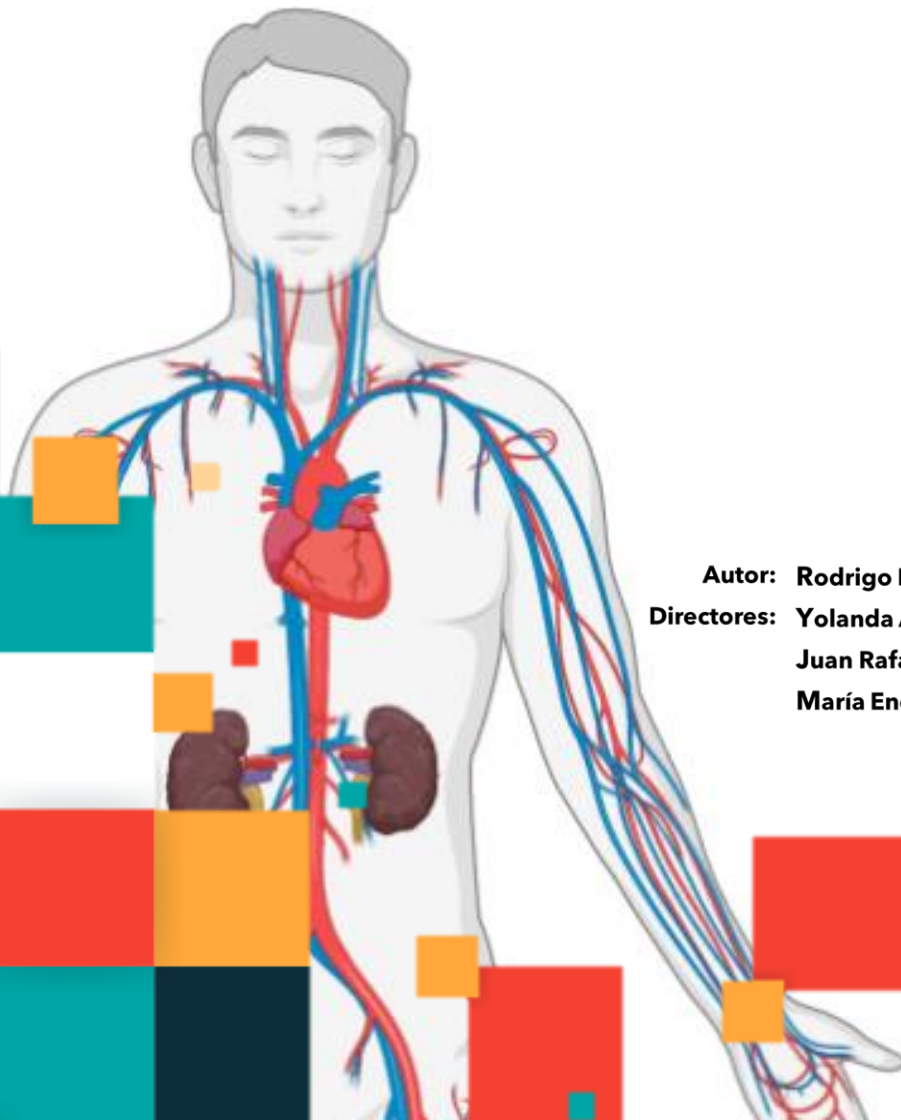
Fdo.: Juan Rafael Muñoz Castañeda

RODRIGUEZ
ORTIZ MARIA
ENCARNACION
- 30949148A

Firmado digitalmente
por RODRIGUEZ ORTIZ
MARIA ENCARNACION -
30949148A
Fecha: 2023.04.11
14:11:39 +02'00'

Fdo.: María Encarnación Rodríguez Ortiz_

INFLUENCIA DEL SUPLEMENTO DE MAGNESIO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO, LA INFLAMACIÓN Y LA DISFUNCIÓN VASCULAR ASOCIADA A LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA: ESTUDIOS IN VIVO E IN VITRO



Autor: Rodrigo López Baltanás
Directores: Yolanda Almadén Peña
Juan Rafael Muñoz Castañeda
María Encarnación Rodríguez Ortiz

AGRADECIMIENTOS

Durante estos 6 años que ha durado la tesis me gustaría agradecer a todas aquellas personas que de una forma u otra han formado parte de ella.

Primero de todo, me gustaría agradecer a todos mis compañeros del Grupo GC13 “Metabolismo del calcio. Calcificación vascular”: Julio Martínez, Cristina Membrives, Anabel Torralbo y Ana Muñoz-Reja por todas las horas de risas, de desahogos y de trabajo echadas que no son pocas. Al Grupo GC07 “Nefrología. Daño celular en la inflamación crónica”: Fátima Guerrero, Andrés Carmona, Teresa Obrero y M^a José Jiménez porque empezaron siendo vecinos y ahora trabajamos juntos, en resumen, que me han soportado. A Cristina García por cada una de las dosis de cafeína tomadas, a Raquel García por ser un pollito ejemplar, a Pablo Álvarez y Fakhri Hassouneh el dúo Zipi y Zape, a Pedro López, Raquel Fernández, Miriam Ruiz, Ana Salinas y a todos los demás (que sois demasiados y no me entráis todos) gracias por todos estos años. También a UCAIB (Unidad Central de Apoyo a la Investigación) y Anatomía Patológica por ayudarme en la tesis.

Agradecer a mis padres M^a Dolores y Juan José, mis hermanos, Arturo y Ramiro, a mi tía M^a Elisa, mis primas Vero y Eli y su marido Mateo, y a la favorita de la familia, mi sobrina Jimena, por aguantar mis quejas y cansancio, por escucharme, aunque no entendáis de lo que hable, por animarme y darme apoyo en todas las decisiones, os quiero con toda el alma que este cuerpo escombro puede contener. A mi abuela Dolores, aunque esa enfermedad te hizo despistada y olvidadiza, espero que te acuerdes de verme en la tesis junto con tu perro Keko allá donde estéis. A mi familia de Toro, Zamora, a mis tíos Nines y Luis, y a mis primos Pedro y Rafa, por acogerme en el pueblo y ayudarme en la tesis engordándome. A mis amigos de la carrera, Abel, Esther e Iván, quien nos diría hace años hasta donde hemos llegado.

Quisiera agradecer a mi tutor Mariano por la oportunidad de poder trabajar a su lado y por enseñarme con la sabiduría que le corresponde.

Y sobre todo agradecer a mis directores de tesis: Marién Rodríguez, Juan Muñoz y Yolanda Almadén. A Marién por tu apoyo incondicional, por el cariño que me has dado, por todas las horas y horas que me has escuchado y enseñado, me has demostrado que con esfuerzo y dedicación se puede llegar a donde sea y te mereces estar donde estas. A Juan Muñoz, por motivarme y hacerme disfrutar con la investigación, por divagar horas y horas de resultados con ejemplos no muy técnicos. Y por último a ti, Yolanda, donde todo esto empezó en 2015 en una clase de inglés con un niño repelente que quería investigar en tu grupo. Te volcaste totalmente conmigo, me apoyaste cada vez que un resultado no salía y me animabas a seguir. Me siento orgulloso de haber podido formar parte de tu enseñanza estos años. Gracias por cada rato de risas, bailoteos y “cervezas” que no hemos echado, gracias por contar conmigo en momentos importantes para ti. Me preguntaron una vez a que mujer científica admiro, respondí: a mi jefa Yolanda, que, aunque esté un poco cegata y me chantajeé con no firmarme la tesis, es mi ejemplo a seguir. De tu niño puto, de tu partner, gracias de todo corazón.

ÍNDICE



ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	1
SUMMARY	13
INTRODUCCIÓN	16
1. ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA	16
1.1. Definición de ERC	16
1.2. Metabolismo mineral	17
1.2.1. Calcio.....	21
1.2.2. Fósforo.....	24
1.2.3. FGF23 y Klotho.....	26
1.2.4. Vitamina D.....	29
1.2.5. Hormona Paratiroidea (PTH).....	30
2. MAGNESIO	31
2.1. Homeostasis del magnesio	32
2.2. Déficit de Mg²⁺	36
3. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR EN LA ERC	41
3.1. Estructura de los vasos sanguíneos	42
3.2. Calcificación Vascular	43
3.3. Disfunción Endotelial	45
4. INFLAMACIÓN y ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ERC	49
4.1. La inflamación en la ERC	49
4.1.1. Citoquinas.....	51
4.2. Estrés oxidativo	54
4.2.1. Síndrome Metabólico en la ERC.....	56
4.2.2. Hipertensión.....	58
5. Hipótesis	62
6. Objetivos	62
MATERIAL Y MÉTODOS	64
7. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	64

7.1.	Cultivo celular de CMLV	64
7.2.	Diseño y tratamientos experimentales	65
7.3.	Determinación de la expresión génica de marcadores inflamatorios mediante RT-PCR	66
7.3.1.	Extracción del ARN.....	66
7.3.2.	Cuantificación del ARN.....	67
7.3.3.	Tratamiento con DNasa	67
7.3.4.	RT-PCR a tiempo real.....	68
7.4.	Citometría de flujo	69
7.5.	Determinación de citoquinas inflamatorias por Bio-Plex	69
7.6.	Mecanismos intracelulares: implicación de la vía de señalización NF-κB ...	70
7.6.1.	Extracción de proteínas.....	70
7.6.2.	Cuantificación de las proteínas	71
7.6.3.	Western blot.....	72
7.6.4.	Microscopía confocal.....	73
7.7.	Determinación de parámetros de estrés oxidativo	74
7.8.	Ensayo de proliferación celular	74
7.9.	Ensayo de muerte celular	75
8.	ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	75
8.1.	Animales	75
8.1.1.	Nefrectomía	76
8.2.	Diseño experimental	77
8.2.1.	Modelo experimental de inflamación y EO asociado a la CV	77
8.2.2.	Modelo experimental de SMet-ERC.....	78
8.3.	Medición de la tensión arterial	79
8.4.	Determinaciones bioquímicas	80
8.4.1.	ELISA	81
8.4.2.	Niveles de calcitriol	82
8.5.	Determinación de la expresión génica de marcadores inflamatorios por RT-PCR	83
8.6.	Determinación de la expresión proteica de marcadores inflamatorios en aorta y Klotho renal	84

8.6.1.	Extracción proteica	84
8.6.2.	Western blot	85
8.7.	Determinación de los niveles de óxido nítrico	85
8.8.	Estrés oxidativo.....	86
8.8.1.	Actividad glutatión peroxidasa	86
8.8.2.	Ensayo de lipoperoxidación lipídica	86
8.9.	Análisis histológico	87
8.9.1.	Tinción de H&E.....	87
8.9.2.	Tinción de tricrómico de Masson.....	88
8.9.3.	Tinción de PAS	88
8.10.	Análisis proteómico	89
8.10.1.	Preparación de las muestras	89
8.10.2.	Espectrometría de masas	89
8.10.3.	Análisis de los datos.....	90
9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	90
RESULTADOS.....	93
10. EFECTO DEL SUPLEMENTO DE Mg²⁺ SOBRE LA INFLAMACIÓN Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.....	93
10.1. Estudios <i>in vitro</i>.....	93
10.2. Estudios <i>in vivo</i>	98
11. EFECTO DEL SUPLEMENTO DIETÉTICO DE Mg²⁺ SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO, LA INFLAMACIÓN Y LA DISFUNCIÓN VASCULAR EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE SÍNDROME METABÓLICO CON ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.....	105
DISCUSIÓN.....	134
CONCLUSIONES	153
REFERENCIAS.....	155

LISTA DE ABREVIATURAS



LISTA DE ABREVIATURAS

ADNc	ADN complementario
Agt	Angiotensinógeno
Ang	Angiotensina
AngII	Angiotensina 2
ApoB	Apolipoproteína B
Apob	Apolipoproteína B-100
ARIC	Atherosclerosis Risk in Communities
ATP	Adenosín trifosfato
AVP	Vasopresina
BHT	Butilhidroxitolueno
BSA	Albúmina de suero bovino
C1QTNF9	Complemento C1q y proteína 9 relacionada con factor de necrosis tumoral
Ca	Calcio
Ca²⁺	Calcio iónico
Ca₃(PO₄)₂	Fosfato cálcico
Cai	Calcio ionizado
CaM	Calmodulina
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CaSR	Receptor sensor de Ca ²⁺
Cav1.3	Subunidad alfa 1D del canal de Ca ²⁺ dependiente del voltaje tipo L
CBS	Cistationina β-sintasa
Ces1c	Carboxilasterasa 1C
Cfd	Factor del complemento D
cGMP	Guanosín monofosfato cíclico
CKD-MBD	Chronic Kidney Disease- Mineral and Bone Disorder
CML	Célula del músculo liso

ABREVIATURAS

CMLV	Célula del músculo liso vascular
CNNM2	Canal mediador de transporte de cationes metálicos divalentes de dominio ciclina y CBS 2
CNNM3	Canal mediador de transporte de cationes metálicos divalentes de dominio ciclina y CBS 3
CNNM4	Canal mediador de transporte de cationes metálicos divalentes de dominio ciclina y CBS 4
CO₂	Dióxido de carbono
CORDIOPREV	The CORonary Diet Intervention with Olive oil and cardiovascular PREvention
CSF-1	Factor estimulante de colonias macrófagos
Cst3	Cistatina-C
CTR	Calcitriol
Ctsb	Catepsina B
CV	Calcificación vascular
CXCR1	Receptor de quimioquinas con motivo C-X-C 1
CXCR2	Receptor de quimioquinas con motivo C-X-C 2
CYP24A1	24-hidroxilasa
D₂	Ergocalciferol
D₃	Colecalciferol
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DBP	Proteína fijadora de vitamina D o transcalciferina
DDA	Adquisición dependiente de datos
DIA-SWATH	Adquisición dependiente de información – adquisición secuencial de ventanas de todos los iones de fragmentos teóricos
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
Dnasa	Desoxirribonucleasa
DO	Densidad óptica
DT2	Diabetes tipo 2
DTT	Ditiotreitol
EAC	Enfermedad arterial coronaria

ABREVIATURAS

ECE	Enzima convertidora de endotelina
ECV	Enfermedad cardiovascular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido egtazico
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
EO	Estrés oxidativo
ERC	Enfermedad renal crónica
ERK1/2	Quinasa-1/2 regulada por señales extracelulares
EROs	Especies reactivas de oxígeno
ERT	Enfermedad renal en etapa terminal
ET-1	Endotelina-1
ETA	Receptor de endotelina tipo A
ETB	Receptor de endotelina tipo B
F13b	Cadena B del factor de coagulación XIII
FAM20C	Miembro de la familia de quinasas extracelulares 20C
FBS	Suero fetal bovino
FDR	Tasa de descubrimiento falso
Fetub	Fetuina B
FG	Filtrado glomerular
FGF23	Factor de crecimiento de fibroblastos 23
FGFR	Receptor de FGF
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FRS2α	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos substrato 2 α
GALNT3	N-acetilgalactosaminiltransferasa 3
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GF	Fraccionamiento en fase gaseosa
GPCR	Receptor acoplado a proteína G de clase-A
Gpld1	Fosfolipasa D específica de fosfatidilinositol-glicano

ABREVIATURAS

GPX	Glutación peroxidasa
Gpx3	Glutación peroxidasa 3
H	Hidrógeno
H&E	Hematoxilina y eosina
H₂DCFDA	Diacetato de 2', 7'dihidro-dicloro-fluoresceína
HBSS	Solución salina equilibrada de Hank
HDL	Lipoproteína de alta densidad
hEGF	Factor de crecimiento epidérmico recombinante humano
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico
hFGF-B	Factor de crecimiento de fibroblastos básico humano
Hg	Mercurio
HOMA-IR	Índice de resistencia a la insulina
HPTS	Hiperparatiroidismo secundario
HRP	Peroxidasa de rábano picante
HTA	Hipertensión arterial
IC	Insuficiencia cardiaca
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular
IGF	Factor de crecimiento insulínico
IGFBP	Proteína de la unión al factor de crecimiento insulínico
IL-1	Interleuquina 1
IL-12	Interleuquina 12
IL-1R	Receptor de interleuquina-1
IL-1RacP	Proteína accesoria de interleuquina-1
IL-1RI	Receptor de interleuquina-1 tipo I
IL-1RII	Receptor de interleuquina-1 tipo II
IL-1α	Interleuquina 1 α
IL-1β	Interleuquina-1 β
IL-2	Interleuquina 2
IL-4	Interleuquina 4

ABREVIATURAS

IL-5	Interleuquina 5
IL-6	Interleuquina-6
IL-6R	Receptor de la interleuquina-6
IL-8	Interleuquina-8
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IPP	Interacción proteína-proteína
iPTH	Hormona paratiroidea intacta
Itih3	Cadena pesada del inhibidor de la inter- α -tripsina H3
K	Potasio
KCl	Cloruro de potasio
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
Kn1	Cininógeno-1
Kn2	Cininógeno-2
L-Arg	L-arginina
Lcat	Fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa
LC-MS	Cromatografía líquida con espectrometría de masas
LDH	Lactato deshidrogenasa
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LFA-1	Antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos
L-NAME	Éster metílico de N-nitro-L-arginina
LPS	Lipopolisacárido
Lyz2	Lisozima
Map1	T-cininógeno-1
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MBC	Membrana del borde en cepillo
MDA	Malondialdehído
Mg²⁺	Magnesio
MgCl₂	Cloruro de Mg ²⁺
MMP	Metaloproteinasa de la matriz extracelular

ABREVIATURAS

MRS2	Empalme de ARN mitocondrial 2
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
Mug1	Muroglobulina-1
Na	Sodio
Na₂HPO₄³⁻	Fosfato dibásico
NaCl	Cloruro sódico
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido-oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido-reducida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
NaH₂PO₄³⁻	Fosfato monobásico
NaOH	Hidróxido de sodio
NaPi2a	Transportador de fosfato dependiente de sodio 2a
NaPi2b	Transportador de fosfato dependiente de sodio 2b
NaPi2c	Transportador de fosfato dependiente de sodio 2c
NED	Dicloruro de N-(1-naftil)-etilendiamina
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
NF-κB	Factor de transcripción nuclear κ B
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
NHANESIII	Third National Health and Nutrition Examination Survey
NHE3	Intercambiador de hidrógeno/sodio 3
NHERF1	Factor regulador del intercambio de sodio/hidrógeno 1
NKCC2	Cotransportador Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOX	NADPH oxidasa
oxLDL	Lipoproteína de baja densidad oxidada
P	Fósforo

ABREVIATURAS

PA	Presión arterial
PAD	Presión arterial diastólica
PAD	Presión arterial diastólica
PAS	Presión arterial sistólica
PAS	Ácido 7eriódico de Schiff
PAS	Presión arterial sistólica
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Proteína C reactiva
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PKC	Proteína quinasa C
PLCγ	Fosfolipasa-C γ
PMN	Leucocito polimorfonuclear
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPARα	Receptor α activado por proliferador peroxisomal
PPBP	Proteína básica pro-plaquetaria
PRL2	Fosfatasa de hígado-2 en regeneración
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
PTH	Hormona paratiroidea
RIA	Radioinmunoensayo
ROI	Región de interés
RT	Retrotranscripción
SA-PE	Ficoeritrina-estreptavidina
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Error estándar de las medias
Serpina6	Globulina transportadora de corticoides
Serpinc1	Antitrombina III
Serpinf1	α -2 antiplasmina
Serping1	Inhibidor de la proteasa plasmática C1
SF	Suero fisiológico

ABREVIATURAS

SGK1	Quinasa-1 regulada por glucocorticoides/sérica
sKlotho	Klotho soluble
SLC41A1	Familia de transportadores de solutos 41 miembro 1
SLC41A2	Familia de transportadores de solutos 41 miembro 2
SmBM	Medio basal de células del músculo liso
SMet	Síndrome metabólico
sPLS-DA	Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales dispersos
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TACE	Enzima convertidora del factor de necrosis tumoral α
TALH	Túbulo ascendente del asa de Henle
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCD	Túbulo contorneado distal
TCR	Receptor específico de linfocito T
TFIIB	Factor de transcripción II B
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TLR	Receptor tipo Toll
TMB	Tetrametilbencidina
TNF-R1	Receptor del factor de necrosis tumoral tipo 1
TNF-R2	Receptor del factor de necrosis tumoral tipo 2
TNFα	Factor de necrosis tumoral- α
TRPM6	Canal catiónico potencial del receptor transitorio de la subfamilia M 6
TRPM7	Canal catiónico potencial del receptor transitorio de la subfamilia M 7
TRPV5	Canal catiónico de potencial transitorio, subfamilia V miembro 5
TTBS	Solución salina tamponada con Tris-Tween
TWEAK	Inductor débil de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral
VCAM-1	Molécula de adhesión de célula vascular 1
VDR	Receptor de vitamina D
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

ABREVIATURAS

WST-1	Sal sódica de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio
XLH	Raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X
ZnSO₄	Sulfato de zinc

RESUMEN/SUMMARY



RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) se mantienen como la principal causa de muerte en todo el mundo, superando incluso las debidas a todos los tumores combinados. En particular, la ECV es la principal causa de muerte en enfermos con alteraciones del metabolismo mineral, como son los pacientes con enfermedad renal crónica (ERC). La integridad funcional y estructural de la vasculatura es crítica en el mantenimiento de la homeostasis cardiovascular. La disfunción vascular aparece como el denominador común que conecta a ésta con los factores de riesgo cardiovascular y algunas patologías como la diabetes y el Síndrome Metabólico (SMet). El estrés oxidativo (EO) y la inflamación son procesos que invariablemente se asocian con las diferentes fases de la disfunción vascular. La sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (EROs) contribuyen al deterioro vascular alterando el tono y el crecimiento vascular, además aumenta la regulación de mediadores proinflamatorios, como NF- κ B. Mientras el aumento de marcadores inflamatorios juega un papel clave en la formación de lesiones vasculares junto con la inducción de EO, que a su vez potencia el proceso inflamatorio. De hecho, el EO y la inflamación son características comunes de la ERC. Los pacientes con ERC tienen sistemas antioxidantes gravemente deteriorados y suelen sufrir inflamación crónica, que empeoran progresivamente con el grado de insuficiencia renal. Las alteraciones en el metabolismo mineral presentes en la ERC pueden ser también un estímulo adicional en la respuesta inflamatoria y en el aumento de producción de EROs. Además, en los últimos años se viene abordando la posibilidad de considerar como posibles factores de riesgo cardiovascular algunos parámetros del metabolismo mineral (Fósforo (P), Magnesio (Mg^{2+}), Factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23) /Klotho y vitamina D (Vit D)). El conocimiento de las moléculas y las rutas esenciales en la preservación de la integridad y función de la vasculatura debe proporcionar la base para el descubrimiento de dianas terapéuticas eficaces para el tratamiento de la disfunción vascular.

Nuestra hipótesis de trabajo establece que puede existir una asociación entre algunas alteraciones del metabolismo mineral, relacionadas con los niveles de P, Mg^{2+} , FGF23/Klotho, Vit D, y el inicio y progresión de la disfunción vascular. Asimismo, pensamos que una intervención dietética rica en Mg^{2+} puede modular favorablemente estos parámetros del metabolismo mineral y, por tanto, resultar en un efecto protector frente a la disfunción vascular.

El trabajo de investigación fue desarrollado en dos bloques. En el primer bloque, con el fin de evaluar del efecto del Mg^{2+} en la inflamación y el EO en la ERC, se realizó un estudio *in vitro* de células del músculo liso vascular (CMLV) cultivadas en P para promover EO e inflamación. Se

estudiaron 3 grupos experimentales: un grupo control con niveles normales de P (0,9 mM) y Mg^{2+} (0,8 mM), un grupo con alto P (AP) (3,3 mM) y Mg^{2+} normal, y un grupo AP con adición de Mg^{2+} (1,6 mM) (AP+ Mg^{2+}). Además, se realizó un estudio *in vivo* en un modelo de rata Wistar con nefrectomía 5/6 (Nx5/6) para inducir la ERC donde fueron alimentados con una dieta alta en P (1,2%) que contenía un 0,1% de Mg^{2+} (Nx- Mg^{2+} 0,1%) o con una dieta suplementada con 0,6% de Mg^{2+} (Nx- Mg^{2+} 0,6%); usando como controles Wistar operadas de forma simulada que recibieron 0,1% de Mg^{2+} . En el segundo bloque se evaluó el efecto del suplemento de Mg^{2+} dietético sobre el EO, la inflamación y la disfunción vascular en un modelo de rata de SMet (cepa Zucker) con ERC (Nx5/6). Los animales nefrectomizados fueron con un moderado contenido en P (0,9%) y con un contenido de Mg^{2+} 0,1% (SMet+Nx- Mg^{2+} 0,1%) o de 0,6% (SMet+Nx- Mg^{2+} 0,6%). Del mismo modo, se utilizaron de control ratas Zucker operadas de forma simulada que recibieron 0,1% de Mg^{2+} .

En el primer bloque, los resultados *in vitro* de las CMLV cultivadas en un medio proinflamatorio con alto P, se observó un aumento de la producción de EROs, incremento de la expresión de citoquinas y activación de la señalización NF- κ B. La incubación con Mg^{2+} inhibió el aumento de la producción de EROs y de citoquinas, así como la activación de NF- κ B. *In vivo*, las ratas Nx alimentadas con una dieta normal de Mg^{2+} (0,1%) mostraron una respuesta inflamatoria sistémica evidenciada por la elevación en plasma de las citoquinas proinflamatorias, y de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx), un marcador de EO. También se observó un aumento de la expresión de estas citoquinas en el tejido aórtico. Por el contrario, el suplemento dietético de Mg^{2+} (0,6%) previno en gran medida el EO y la actividad proinflamatoria. En cuanto al segundo bloque, el modelo *in vivo* de SMet-ERC, en comparación con los controles, el grupo SMet+Nx- Mg^{2+} 0,1% mostró un aumento significativo de los biomarcadores de EO e inflamación (peroxidación lipídica y expresión aórtica de citoquinas) y de los niveles de endotelina-1 (ET-1), una disminución del óxido nítrico (NO) y un empeoramiento de la uremia y de la patología asociada al SMet, como la hipertensión, glucosa y un perfil lipídico anormal. Además, la evaluación proteómica reveló cambios relacionados principalmente con el metabolismo lipídico y en marcadores de ECV. Por el contrario, en el grupo MetS+Nx- Mg^{2+} 0,6%, estos parámetros se mantuvieron en gran medida similares a los controles.

En conclusión, el suplemento con Mg^{2+} redujo la inflamación y el EO, ejerciendo un efecto directo sobre las células vasculares. Además, el suplemento dietético con Mg^{2+} no solo redujo la inflamación y el EO asociados a la ERC, sino que mejoró la función vascular. En conjunto, estos hallazgos apoyan un posible efecto beneficioso del suplemento de Mg^{2+} en el manejo clínico de los pacientes con ECV y ERC.

SUMMARY

Cardiovascular diseases (CVD) remain the leading cause of death worldwide, even exceeding those due to all tumors combined. In particular, CVD is the leading cause of death in patients with alterations in mineral metabolism, such as patients with chronic kidney disease (CKD). The functional and structural integrity of the vasculature is critical in the maintenance of cardiovascular homeostasis. Vascular dysfunction appears as the common denominator that connects this with cardiovascular risk factors and some pathologies such as diabetes and metabolic syndrome (MetS). Oxidative stress (OS) and inflammation are processes that are invariably associated with the different phases of vascular dysfunction. Overproduction of reactive oxygen species (ROS) contributes to vascular deterioration by altering vascular tone and growth, in addition upregulation of proinflammatory mediators, such as NF- κ B. While the increase in inflammatory markers plays a key role in the formation of vascular lesions along with the induction of OS, which in turn potentiates the inflammatory process. Indeed, OS and inflammation are common features of CKD. Patients with CKD have severely impaired antioxidant systems and often suffer from chronic inflammation, which progressively worsen with the degree of renal failure. The alterations in mineral metabolism present in CKD may also be an additional stimulus in the inflammatory response and in the increased production of ROS. Furthermore, in recent years some parameters of mineral metabolism (phosphorus (P), magnesium (Mg^{2+}), fibroblast growth factor 23 (FGF23)/Klotho and vitamin D (Vit D)) have been considered as possible cardiovascular risk factors. Knowledge of the molecules and pathways essential in preserving the integrity and function of the vasculature should provide the basis for the discovery of effective therapeutic targets for the treatment of vascular dysfunction.

Our hypothesis states that there may be an association between some alterations in mineral metabolism, related to P, Mg^{2+} , FGF23/Klotho, Vit D levels, and the onset and progression of vascular dysfunction. Likewise, we believe that a dietary intervention rich in Mg^{2+} may favorably modulate these parameters of mineral metabolism and, therefore, result in a protective effect against vascular dysfunction.


The research work was developed in two sections. In the first section, in order to evaluate the effect of Mg^{2+} on inflammation and OS in CKD, an *in vitro* study of vascular smooth muscle cells (VSMC) cultured in P to promote OS and inflammation was performed. Three experimental groups were studied: a control group with normal P (0.9 mM) and Mg^{2+} (0.8 mM) levels, a high P (AP) (3.3 mM) and normal Mg^{2+} group, and an AP group with addition of Mg^{2+} (1.6 mM) (AP+ Mg^{2+}). In addition, an *in vivo* study was performed in a Wistar rat model with 5/6 nephrectomy (Nx5/6) to induce

CKD where they were fed a high P diet (1.2%) containing 0.1% Mg^{2+} (Nx- $Mg^{2+}0.1\%$) or a diet supplemented with 0.6% Mg^{2+} (Nx- $Mg^{2+}0.6\%$); using sham-operated Wistar receiving 0.1% Mg^{2+} as controls. In the second section, the effect of dietary Mg^{2+} supplementation on OS, inflammation and vascular dysfunction was evaluated in a rat model of MetS (Zucker strain) with CKD (Nx5/6). Nephrectomized animals were moderately P (0.9%) and Mg^{2+} 0.1% (SMet+Nx- $Mg^{2+}0.1\%$) or 0.6% (SMet+Nx- $Mg^{2+}0.6\%$). Similarly, sham-operated Zucker rats receiving 0.1% Mg^{2+} were used as controls.

In the first section, *in vitro* results of VSMCs cultured in proinflammatory medium with high P, increased production of ROS, increased cytokine expression, and activation of NF- κ B signaling were observed. Incubation with Mg^{2+} inhibited increased ROS and cytokine production, as well as NF- κ B activation. *In vivo*, Nx rats fed a normal Mg^{2+} diet (0.1%) showed a systemic inflammatory response evidenced by elevation in plasma proinflammatory cytokines, and of glutathione peroxidase (GPx) activity, a marker of oxidative stress. Increased expression of these cytokines was also observed in aortic tissue. In contrast, dietary supplementation of Mg^{2+} (0.6%) largely prevented oxidative stress and proinflammatory activity. Regarding the second section, the *in vivo* MetS-CKD model, compared with controls, the MetS+Nx- $Mg^{2+}0.1\%$ group showed a significant increase in biomarkers of oxidative stress and inflammation (lipid peroxidation and aortic cytokine expression) and endothelin-1 (ET-1) levels, a decrease in nitric oxide (NO), and a worsening of uremia and MetS-associated pathology, such as hypertension, glucose, and an abnormal lipid profile. In addition, proteomic evaluation revealed changes mainly related to lipid metabolism and in CVD markers. In contrast, in the MetS+Nx- $Mg^{2+}0.6\%$ group, these parameters remained largely similar to controls.

In conclusion, Mg^{2+} supplementation reduced inflammation and OS, exerting a direct effect on vascular cells. Furthermore, dietary supplementation with Mg^{2+} not only reduced CKD-associated inflammation and EO, but also improved vascular function. Taken together, these findings support a possible beneficial effect of Mg^{2+} supplementation in the clinical management of patients with CVD and CKD.

INTRODUCCIÓN

A decorative graphic consisting of a horizontal row of colored squares in shades of orange, black, white, red, and teal. Below this row, several smaller squares of the same color palette are scattered, creating a pixelated or mosaic-like effect.

INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

La ERC es un problema de salud pública mundial. La incidencia actual en España de la ERC está próxima al 12%. A este dato preocupante se une un continuo aumento en la prevalencia. La ERC es la segunda causa de muerte que más ha crecido en el período de tiempo analizado entre 2006 y 2016. Hoy día se sitúa en octavo lugar del listado de causas de muerte más frecuentes. De acuerdo con el crecimiento de esta patología se estima que la ERC será la segunda causa de muerte a nivel mundial en 2100. El coste derivado de la atención al paciente con ERC es muy elevado. Los pacientes con necesidad de terapia renal sustitutiva, principalmente diálisis (46.000 pacientes, un 0,1% de la población española), consumen el 2,5% del gasto sanitario total. Estos datos son aún más alarmantes cuando se consideran las tendencias demográficas de envejecimiento y los patrones de estilo de vida en los países desarrollados, que se asocian con un mayor riesgo de ERC [1]. Por tanto, estos números y previsiones hacen necesaria la investigación en torno a esta enfermedad con la intención de prevenir su progresión y dilatar la cronicidad para evitar la necesidad de terapia renal sustitutiva.

La ERC no sólo abarca la pérdida de la función renal *per se*, sino también diversas complicaciones, entre las que se encuentra la ECV.

1.1. Definición de ERC

La guía KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) define a la ERC en el adulto como la presencia de una alteración estructural o funcional renal que persiste más de 3 meses, con o sin deterioro de la función renal, o un filtrado glomerular (FG) inferior a 60 ml/min/1,73 m² sin otros signos de enfermedad renal. Dicha guía ha introducido a los pacientes trasplantados renales, independientemente del grado de fallo renal que presenten [2].

En los últimos años se ha puesto de manifiesto que las alteraciones del metabolismo mineral asociadas a la ERC se relacionan con un aumento de la morbimortalidad por causas cardiovasculares. Por ello, el enfoque terapéutico actual del enfermo urémico debe abordarse tomando en consideración las alteraciones del hueso, del metabolismo mineral y de la ECV asociada. Teniendo en cuenta estas consideraciones la Fundación KDIGO ha propuesto la definición del trastorno mineral y óseo asociado

a la ERC como todas aquellas alteraciones bioquímicas, esqueléticas y calcificaciones extraóseas que ocurren como consecuencia de la ERC.

La ERC es una enfermedad progresiva, que evoluciona en diferentes estadios en los que se van agravando las manifestaciones clínicas. Dichos estadios se basan en el grado de función renal medida por el FG estimado. La ERC se estratifica en cinco estadios, desde el estadio 1, es la forma más leve de ERC y puede pasar desapercibida debido a que las personas que la padecen no presentan ningún signo o síntoma con un FG igual o superior a $90 \text{ ml/min/1,73m}^2$, hasta la insuficiencia renal completa en la etapa 5, también denominado fallo renal, donde el FG es inferior a $15 \text{ ml/min/1,73 m}^2$. (Figura 1).

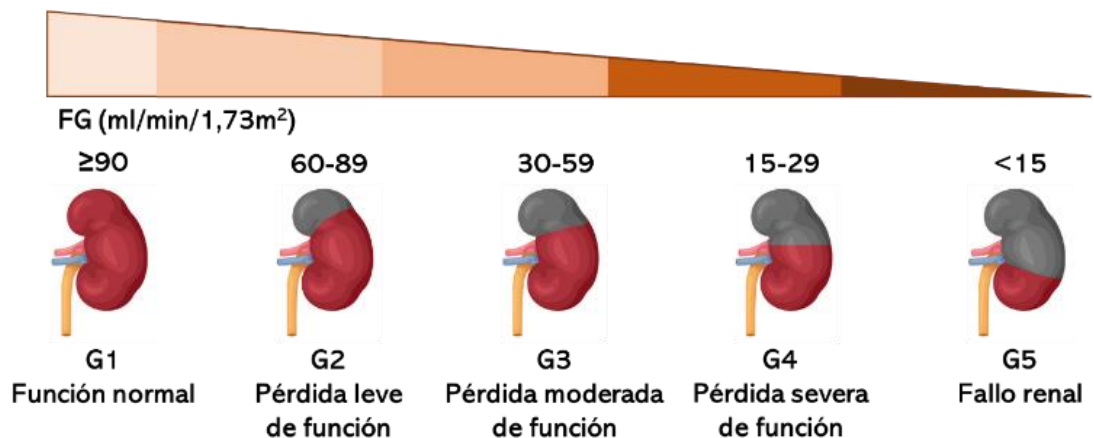


Figura 1. Clasificación de los grados de ERC en función del FG. Se distinguen cinco estadios de ERC, en función de la cifra de FG: (estadio 1) con FG normal o aumentado (FG superior o igual a $90 \text{ ml/min/1,73m}^2$); (estadio 2) coexistencia de daño renal con una cifra de FG ligeramente disminuida (FG: 60-89); (estadio 3) con disminución moderada del FG (FG 30-59); (estadio 4) reducción severa del FG (FG 15-29) y (estadio 5) con necesidad de inicio de tratamiento de soporte con diálisis o trasplante (FG < 15).

1.2. Metabolismo mineral

Se entiende por metabolismo mineral como el conjunto de reacciones hormonales fisiológicas responsables del mantenimiento de la homeostasis de minerales básicos para el organismo y de especial relevancia en el contexto del riñón como son el calcio (Ca) o el P. El sistema homeostático regulador del metabolismo mineral es capaz de detectar variaciones mínimas en la concentración de Ca iónico (Ca^{2+}) extracelular. Durante la hipocalcemia, la respuesta fisiológica tiene como objetivo restaurar la concentración de Ca^{2+} sérico. La hormona paratiroidea (PTH) es producida por las células principales de la glándula paratiroides en respuesta a una disminución en la concentración del Ca^{2+} . La PTH tiene

INTRODUCCIÓN

un papel central en la homeostasis del Ca^{2+} , y pequeñas oscilaciones del Ca^{2+} extracelular inducen grandes variaciones en la producción de PTH. Para modular la función paratiroidea, el Ca^{2+} requiere la presencia del receptor sensor de Ca^{2+} (CaSR) en la superficie de las células paratiroideas. La relación entre PTH y Ca^{2+} es inversa y sigmoidea, es decir, la disminución de la concentración de Ca^{2+} produce un aumento en la secreción de PTH hasta que alcanza un máximo; por el contrario, el aumento de la concentración de Ca^{2+} reduce la secreción de PTH hasta un mínimo. La PTH aumenta el Ca^{2+} sérico a través de los siguientes mecanismos, como se muestra en la Figura 2: a) estimulación de la resorción ósea, que promueve la salida de Ca^{2+} y P a la sangre, b) aumento de la reabsorción tubular de Ca^{2+} a nivel renal, c) indirectamente, al aumentar la producción renal del metabolito biológicamente activo de la vit D 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$ o calcitriol (CTR), que posteriormente estimula la absorción intestinal de Ca^{2+} y P.

Una serie de factores u hormonas denominados fosfatoninas participan de forma activa y específica en la homeostasis del P. La fosfatonina mejor caracterizada hasta el momento es el FGF23. Este induce un descenso en la fosfatemia promoviendo la excreción renal de P, ya que produce la internalización de los transportadores de P dependiente de sodio (Na) 2a y 2c (NaPi2a y NaPi2c respectivamente) e inhibe la producción de 1 α -hidroxilasa (descrito detalladamente en el apartado 1.3.3), lo que mejora la fosfaturia y reduce la producción renal de CTR, respectivamente [3].

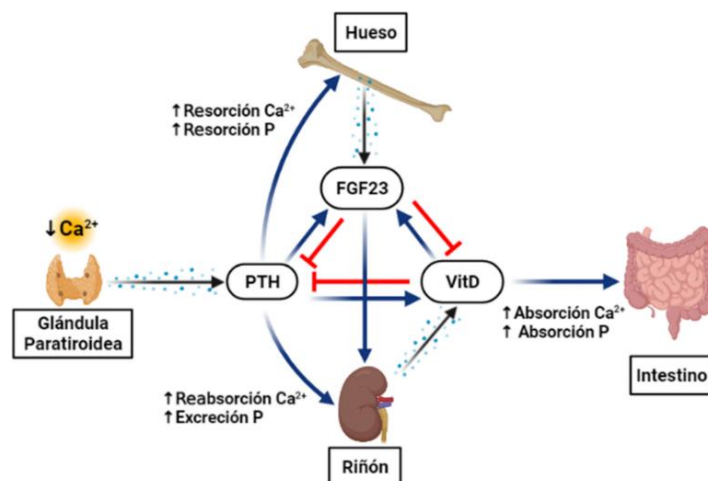


Figura 2. Cambios en el metabolismo mineral durante la ERC. El sistema homeostático regulador del metabolismo mineral es capaz de detectar variaciones mínimas en la concentración de Ca^{2+} extracelular.

INTRODUCCIÓN

En una situación de hipercalcemia se desencadena un mecanismo contrapuesto al descrito anteriormente. La secreción de PTH se encuentra inhibida debido a un mecanismo de “feed-back” negativo a través del cual niveles elevados de CTR inhiben la síntesis y secreción de PTH, lo cual reduce la salida de Ca^{2+} y P desde el hueso al torrente circulatorio, aumenta la calciuria y disminuye la absorción de ambos iones a nivel intestinal, ya que desaparece el efecto estimulador de la secreción del CTR inducido por la PTH.

En los últimos años, se ha demostrado que las alteraciones del metabolismo mineral asociadas al fallo renal tienen dos dianas principales: el esqueleto y el sistema cardiovascular, existiendo una conexión estrecha entre ambas alteraciones. Todas las alteraciones bioquímicas, esqueléticas y calcificaciones extraóseas, englobadas en el término CKD-MBD (Chronic Kidney Disease- Mineral and Bone Disorder) [4], ocurren como consecuencia de las alteraciones del metabolismo mineral en la ERC manifestándose de la siguiente forma:

- Anormalidades del Ca^{2+} , P, PTH, Vit D y FGF23: desencadenantes del hiperparatiroidismo secundario (HPTS), caracterizado por la hipersecreción de PTH y la proliferación de las células paratiroides [5].
- Alteraciones en el remodelado, mineralización, volumen, crecimiento o fragilidad del esqueleto: estas alteraciones de la morfología ósea en pacientes con ERC son conocidas como ODR y es una medida del trastorno sistémico en el componente esquelético del CKD-MBD [6].
- Calcificaciones cardiovasculares y/o de otros tejidos blandos: a medida que avanza la ERC, la reducción en la tasa de filtración glomerular conducen a una hiperfosfatemia, siendo ésta el mecanismo primario por el cual se produce la mineralización extraesquelética [7].

Las alteraciones de los parámetros bioquímicos relacionados con el metabolismo mineral ocurren progresivamente y en paralelo al deterioro de FG, tal como se describe sucintamente a continuación (Figura 3) [8].

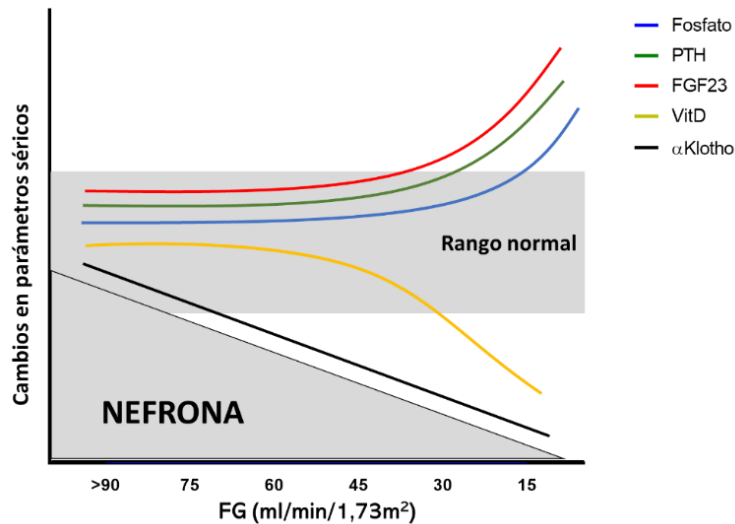


Figura 3. Alteraciones del metabolismo mineral en la ERC. El gráfico resume la evolución de las alteraciones del metabolismo mineral a lo largo de la progresión de la ERC. El eje X representa la FG. El eje Y representa los niveles circulantes de los analitos P (línea azul), PTH (línea verde), FGF23 (línea roja), VitD (línea amarilla) y α Klotho (línea negra).

- La primera anomalía detectada en el transcurso de la ERC coincide con la elevación de niveles de FGF23, acompañada posteriormente de la deficiencia de Vit D. Estos acontecimientos, junto con una disminución de Klotho urinario, se observan en los estadios 1-2 de la ERC [9]. La proteína Klotho participa en la regulación de varias actividades biológicas, incluida la regulación de la homeostasis del P, de Ca^{2+} y la PTH, así como del metabolismo de la Vit D y actúa como un receptor obligatorio para la familia de FGF [10]. Existen tres subfamilias de Klotho: α -Klotho, β -Klotho, y γ -Klotho. En este texto y de forma general cuando no se especifica una subfamilia determinada, la palabra “Klotho” generalmente se refiere a la subfamilia α -Klotho. En estos primeros estadios de la ERC los niveles de Ca^{2+} y P se mantienen dentro del rango normal.
- Posteriormente, debido a una mayor pérdida de nefronas, la retención de P y la deficiencia de Vit D causan hipocalcemia por descenso de la absorción intestinal de Ca^{2+} , formación de complejos Ca-P y resistencia esquelética a la PTH. La CKD-MBD generalmente se manifiesta en el estadio G3 de la ERC, es decir, con una tasa de filtración glomerular entre 60 y 30 ml/min/1,73 m².
- El descenso de Vit D y la retención de P aumentan directamente la síntesis y secreción de PTH e inducen hiperplasia paratiroidea. Las dianas sobre las que actúa el Ca^{2+} y la Vit D son el

CaSR y el receptor de la Vit D (VDR), respectivamente. Altos niveles de P inducen proliferación de células paratiroides y disminuyen la expresión de los CaSR y Vit D [11].

- Gracias al aumento de FGF23 y PTH no se aprecia hiperfosfatemia ya que favorece la excreción urinaria de P, manteniendo niveles normales de P sérico hasta los estadios 3-4 de la ERC donde el FG desciende por debajo de 20 ml/min/1,73 m² [12]. A pesar de los aumentos compensatorios de la PTH, es bien sabido que en la ERC existe actualmente una resistencia a la PTH que limita su acción [13]. En los estadios 4 y 5 de la ERC, las concentraciones de P comienzan a aumentar a pesar de las elevaciones de FGF23 y PTH, lo que indica que los mecanismos compensatorios ya no son suficientes para mantener el equilibrio de P y prevenir la hiperfosfatemia. La producción de FGF23 es estimulada, fundamentalmente, por el exceso de P. El incremento de FGF23 ayuda a excretar este exceso de P (marcado descenso de la reabsorción tubular de P por debajo de los valores normales de 80-95%) pero también suprime la producción de calcitriol, mecanismo que contribuye al desarrollo del hiperparatiroidismo secundario. Las glándulas paratiroides tienen receptores de FGF23 y Klotho y el FGF23 reduce la síntesis de PTH. Sin embargo, este efecto no es capaz de prevenir el hiperparatiroidismo secundario entre otras razones porque la hiperplasia paratiroidea se asocia a una disminución de los receptores de FGF23 y de Klotho. Además, el FGF23 también favorece el hiperparatiroidismo indirectamente al reducir la producción renal de CTR.

1.2.1. Calcio

El Ca es el cuarto componente más abundante en el organismo después del agua, las proteínas y los lípidos. De ahí se deduce la importancia de este mineral en todos los sistemas biológicos. El Ca participa en procesos fundamentales para el mantenimiento de la vida tales como la secreción y acción hormonal, fecundación, permeabilidad de membranas, excitabilidad neuronal, liberación de neurotransmisores, contracción muscular, coagulación de la sangre y procesos de transducción de señales al actuar como segundo mensajero intracelular [14].

La cantidad total de Ca en el cuerpo humano varía de 1.000 a 1.200 g. Aunque más del 99% del Ca corporal total se encuentra en los huesos, el Ca es un catión clave tanto en el espacio extracelular como en el intracelular. La concentración de Ca sérico se mantiene en un rango muy estrecho en ambos espacios. Del Ca presente en la sangre aproximadamente el 45% se encuentra unido a proteínas,

INTRODUCCIÓN

principalmente albúmina. Un 5-10% forma complejos con ácidos débiles (bicarbonato, citrato, P, etc.) y el resto (alrededor de un 50%), se encuentra en forma iónica (Ca^{2+}), suponiendo una concentración fisiológica extracelular de 1,25 mM, siendo éste el único que tiene actividad biológica [15]. El mantenimiento de una homeostasis adecuada del Ca^{2+} y por tanto de la calcemia, es un proceso complejo y dinámico que implica la absorción y excreción de Ca^{2+} en el intestino, la filtración y reabsorción en el riñón y su almacenamiento y movilización en el esqueleto. La absorción intestinal de Ca^{2+} ocurre a través de vías transcelulares y paracelulares [16].

El CTR es la principal hormona de control del transporte intestinal de Ca^{2+} . Aumenta la expresión de genes y proteínas de la mayoría de las moléculas implicadas en ambas vías a través de su unión con el VDR. La PTH, las hormonas tiroideas, los estrógenos, la prolactina, la hormona del crecimiento y los glucocorticoides aparentemente regulan el transporte de Ca^{2+} por acción directa, aunque por mecanismos indirectos también regulan a través de un aumento en la producción renal de CTR.

Aproximadamente 10.000 mg de Ca^{2+} se filtran diariamente en el glomérulo en personas sanas, pero sólo 200 mg aproximadamente se excretan en la orina [17]. Del 60 al 70% del Ca^{2+} filtrado se reabsorbe pasivamente en el túbulo proximal, del 20 al 30% se reabsorbe en el túbulo ascendente del asa de Henle (TALH) y el 10% en el túbulo contorneado distal (TCD). En el TALH, la reabsorción del Ca^{2+} está regulada por el CaSR, localizado basolateralmente, y por TRPV5 (canal catiónico de potencial transitorio, subfamilia V miembro 5) en el TCD. Estudios recientes han demostrado que la activación de CaSR protege contra el desarrollo de la hipercalcemia por el aumento de la excreción de Ca^{2+} en el TALH y estimula la secreción de calcitonina que disminuye la salida de Ca^{2+} del hueso (Figura 4).

Como la absorción intestinal de Ca^{2+} excede la excreción renal de Ca^{2+} durante los primeros 30 años de vida, un balance de Ca^{2+} positivo da como resultado el crecimiento óseo. Después de la tercera o cuarta década, un balance de Ca^{2+} negativo induce la pérdida de masa ósea. Además, otros factores pueden acelerar la pérdida ósea durante el envejecimiento, entre ellos la función renal reducida.

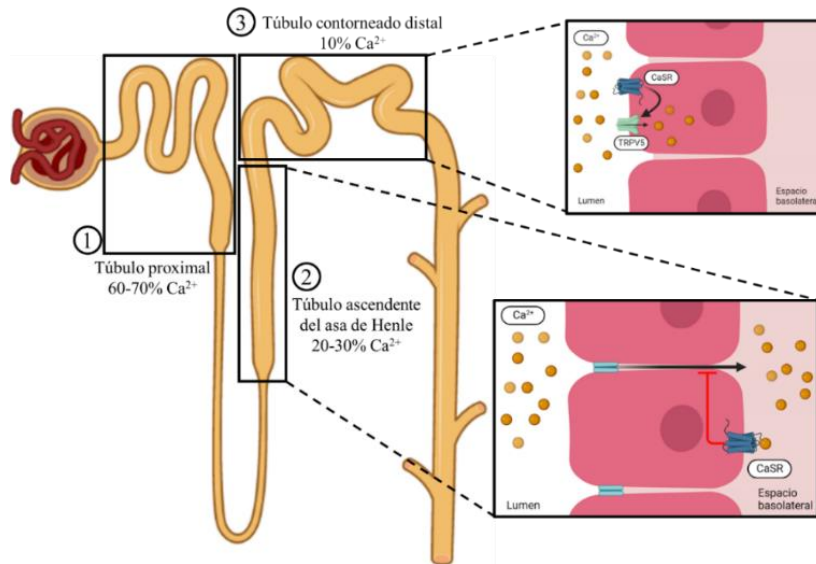


Figura 4. Ilustración de la absorción y regulación de Ca^{2+} a nivel renal. El Ca^{2+} se reabsorbe a lo largo de la nefrona, paracelularmente en el túbulo proximal y en TALH y transcelularmente en los TCD.

Los factores que controlan los niveles de Ca^{2+} séricos son CTR, PTH, Klotho y calcitonina [18]. El CTR favorece la absorción intestinal de Ca^{2+} , reduce la excreción urinaria de Ca^{2+} e incrementa la resorción ósea incrementando los niveles séricos de Ca^{2+} . La PTH, incrementa los niveles de Ca^{2+} séricos de forma indirecta al estimular la actividad de 1α -hidroxilasa en el riñón, incrementando así la producción de CTR y de forma directa inhibiendo la excreción urinaria de Ca^{2+} y promoviendo la resorción ósea. Finalmente, Klotho también mantiene los niveles séricos de Ca^{2+} estimulando la reabsorción de Ca^{2+} en las células renales [19]. Por el contrario, la calcitonina es una hormona hipocalcemiante que estimula la excreción urinaria de Ca^{2+} e inhibe la reabsorción ósea.

En los enfermos renales, bajos niveles de CTR conducen a una situación de hipocalcemia (nivel sérico de Ca total $<8,5$ mg/dL o $2,1$ mmol/L y $\text{Ca}^{2+} <4,6$ mg/dl o $1,15$ mmol/L en seres humanos) [20]. La hipocalcemia junto con la hiperfosfatemia estimula la secreción de PTH originando el desarrollo del hiperparatiroidismo secundario.

1.2.2. Fósforo

El P es un macromineral nutricionalmente esencial y participa en la mayoría, si no en todas, las reacciones metabólicas del organismo, incluyendo el metabolismo energético, la formación de huesos y dientes, el equilibrio osmótico y ácido-base, el transporte de electrolitos y numerosos sistemas enzimáticos. Además, es un constituyente de ácidos nucleicos. Su concentración sérica, a nivel fisiológico, oscila en el adulto aproximadamente entre 2,5 y 4,5 mg/dL, aunque varía dependiendo de la edad (más alto en niños que en adultos), el momento del día (los valores más bajos se obtienen a mediodía), la estación del año, el pH o el tipo de dieta (una ingesta rica en carbohidratos o un aporte de soluciones glucosadas en pacientes en ayunas puede disminuir la fosfatemia al inducir la entrada de P a la célula).

Se estima que el contenido total de P en el organismo es de unos 700-800 g, de los cuales el 85% se encuentran en el hueso en forma de depósitos de hidroxiapatita y el resto se distribuye en tejidos blandos, bien de forma inorgánica, bien formando parte de macromoléculas como fosfolípidos, fosfoproteínas o nucleótidos. En la sangre, el P puede circular de tres formas: ionizado (55%), formando complejos de sales de Na^+ , Ca^{2+} y/o Mg^{2+} (35%) o unido a proteínas (10%).

La mayor parte del P no esquelético se localiza a nivel intracelular. El organismo controla las concentraciones extracelulares de P principalmente mediante la regulación de la excreción urinaria, pero también mediante la absorción intestinal y el depósito y liberación de fuentes unidas en los huesos y otros tejidos. La homeostasis del P se mantiene a través de la absorción/secreción en el tracto gastrointestinal, la filtración/absorción en los riñones y los cambios constantes de reabsorción y formación del hueso a través del remodelado óseo.

Todo el tracto intestinal absorbe P, aunque la absorción ocurre en mayor proporción en el intestino delgado. Las dos vías principales para la absorción intestinal de P son una vía paracelular pasiva y una vía transcelular activa. La vía paracelular pasiva tiende a depender de la ingesta total, aumentando proporcionalmente su papel a medida que aumenta la ingesta de P [21], realizándose a través de uniones estrechas por medio de las proteínas ocludinas y claudinas. Éstas, no sólo forman parte del complejo de proteínas de adhesión que unen células adyacentes, sino que también regulan el flujo de iones que atraviesan los espacios intercelulares. El transporte paracelular de P también está regulado por la concentración de protones en el enterocito, controlado por el intercambiador de hidrógeno (H) y Na^+ 3 (NHE3) [22]. Cuando las concentraciones de P en la dieta se reducen por debajo del requerimiento, domina la absorción transcelular. La absorción transcelular está acoplado al flujo

de Na^+ (NaPi2b) y depende de la presencia de un potencial de membrana negativo en el interior de la célula. Esta vía también puede ser estimulada por la Vit D. Un transportador dependiente de Na^+ de tipo III, PiT1, también puede desempeñar un papel en la regulación intestinal del P, aunque no parece estar influenciado por cambios en la ingesta de P.

El P plasmático ingresa al líquido extracelular y se transporta a las células y al esqueleto y se filtra en el riñón, y la reabsorción en el túbulo proximal renal proporciona el control final del equilibrio del P.

La excreción renal neta de P está entre 600 y 1.500 mg/dL, lo que significa que entre el 75% y el 85% de la carga filtrada diaria es reabsorbida por los túbulos renales. Dentro de la nefrona, aproximadamente el 85% de la reabsorción de P ocurre dentro del túbulo proximal, mientras el resto juega un papel menor en dicha regulación. Dentro del túbulo proximal, el transporte de P desde el ultrafiltrado a través del epitelio del túbulo proximal se realiza con los cotransportadores de Na^+/P renal (NaPi2a, NaPi2c y PiT-2), localizados en la membrana del borde en cepillo apical de las células del túbulo proximal renal. Un aumento en la abundancia de cotransportadores de Na^+/P del borde en cepillo aumenta la absorción de P de la orina, mientras que una disminución en la abundancia de cotransportadores conduce al incremento de la fosfaturia. El transporte de P desde el túbulo proximal a los capilares peritubulares se produce a través de un transportador basolateral, aunque actualmente se desconoce el mecanismo de extrusión basolateral de P.

En los estadios de ERC estadios 4-5 la hiperfosfatemia es frecuente debido a la retención de P provocada por la pérdida progresiva de nefronas funcionales, además de la creciente dificultad para aumentar la ultrafiltración glomerular de P y reducir aún más su reabsorción tubular cuando ya se encuentra inhibida al máximo por niveles séricos elevados de FGF23 y PTH. Estudios clínicos han demostrado que el P sérico elevado es un factor de riesgo de calcificación vascular (CV) y mortalidad y morbilidad cardiovascular en la población con ERC y, en particular, en pacientes en diálisis. Más recientemente, incluso los niveles de P en el extremo superior del rango normal se han correlacionado con un mayor riesgo de mortalidad cardiovascular en la población general, lo que indica la toxicidad potencial de P. Los estudios clínicos han demostrado que en la ERC la hiperfosfatemia está estrechamente relacionada con la CV avanzada; de hecho, múltiples estudios experimentales han demostrado que la carga de P promueve la CV en roedores con daño renal. Además, la hiperfosfatemia contribuye a la disfunción endotelial al aumentar la apoptosis, incrementar la generación de EROs, alterar la producción de NO y disminuir la expresión de anexina II [22].

1.2.3. FGF23 y Klotho

El FGF23 es una hormona fosfatúrica que pertenece a la subfamilia de FGF endocrinos [23]. El FGF23 es secretado por osteoblastos maduros y osteocitos hacia la circulación sistémica y actúa en riñón, paratiroides, corazón, hueso y posiblemente también en otros órganos [24]. FGF23 es una proteína de 251 aminoácidos y 32 kDa. La fosforilación de FGF23 a través del miembro de la familia de quinasas extracelulares 20C (FAM20C) en el aminoácido S180 evita la O-glicosilación postraduccional por el polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 3 (GALNT3). La falta de O-glicosilación hace que FGF23 sea susceptible a la proteólisis por la proteína convertasa furina. La proteólisis de FGF23 da como resultado la secreción de fragmentos de FGF23 inactivos. [23]. Por el contrario, la fosforilación y la proteólisis de furina se evitan mediante la O-glicosilación en la posición T178 a través de GALNT3, lo que da como resultado la secreción del FGF23 intacto biológicamente activo [25].

La secreción ósea de FGF23 es estimulada por Vit D y por el aumento de P extracelular, formando así un eje de retroalimentación entre el riñón y el hueso. Las funciones específicas de FGF23 dependen de la presencia en los tejidos diana del receptor de FGF (FGFR) y, en algunos casos, de su cofactor Klotho, formando el complejo Klotho/FGF23/FGFR. Se han reconocido cuatro FGFR diferentes, FGFR1 a 4. Estudios de unión bioquímica han demostrado que la presencia de Klotho aumenta la afinidad de FGF23 por FGFR en unas 20 veces [26], si bien la presencia de Klotho no es un requisito previo para la capacidad de respuesta a FGF23. Mientras que las células que expresan Klotho responden a FGF23 activando la cascada FRS2 α /Ras/MAPK (receptor del factor de crecimiento de fibroblastos sustrato 2 α /Ras/proteína quinasa activada por mitógeno), FGF23 estimula PLC γ /calcineurina/NFAT (fosfolipasa-C γ /calcineurina/factor nuclear de células T activadas) en células que carecen de Klotho [27]. Además, mientras que FGFR1 actúa como el principal receptor de FGF23 en los órganos diana “clásicos” de FGF23 que expresan Klotho [28], los efectos de FGF23 independientes de Klotho parecen estar mediados fundamentalmente por el receptor FGFR4 [29].

El FGF23 disminuye la reabsorción de P en los túbulos proximales a través de la internalización de los cotransportadores de Na⁺/P, NaPi2a y NaPi2c desde la membrana del borde del cepillo al citoplasma, desencadenando con ello un aumento de la fosfatúria [30]. FGF23 suprime la reabsorción de P en el epitelio tubular proximal renal mediante un mecanismo de señalización predominantemente mediado por FGFR1 dependiente de Klotho, que implica la activación de la quinasa-1/2 regulada por señales extracelulares (ERK1/2) y de la quinasa-1 regulada por

glucocorticoides/sérica (SGK1), lo que conduce a la fosforilación del factor regulador del intercambio de Na^+/H^+ 1 (NHERF1) y posterior internalización y degradación de los cotransportadores de Na^+/P (Figura 5) [31]. Además de su acción fosfatúrica, FGF23 también regula a la baja la expresión tubular proximal renal de 1α -hidroxilasa, la enzima catalizadora de la síntesis de CTR [32]. La señalización de FGF23 también regula directamente al alza la 24-hidroxilasa (CYP24A1), enzima que inicia la degradación de CTR [32]. Por lo tanto, FGF23 no solo aumenta la excreción urinaria de P, sino que al mismo tiempo suprime indirectamente la absorción intestinal de P al disminuir la producción de Vit D activa. El efecto neto de ambas acciones hormonales es reducir las concentraciones de P circulante previniendo los efectos nocivos de la hiperfosfatemia.

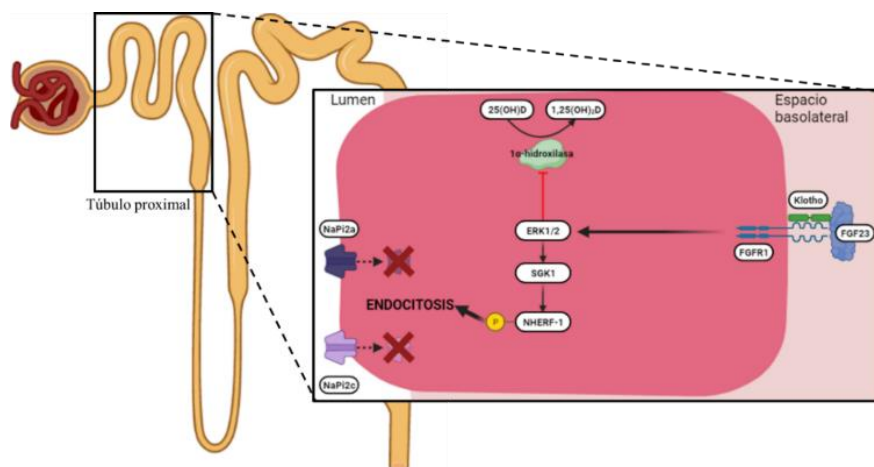


Figura 5. Efecto del FGF23 sobre la fosfaturia y la síntesis de CTR. En los túbulos renales proximales, el FGF23 transportado por la sangre se une a un complejo receptor formado por FGFRs y Klotho y activa una cascada de señalización en la que participan ERK1/2 y SGK1. A su vez, SGK1 fosforila NHERF-1, lo que conduce a la internalización y degradación de NaPi2a/NaPi2c. La fosforilación de NHERF-1 inducida por el FGF23 disminuye la abundancia de NaPi2a y NaPi2c en la membrana y conduce a un aumento de la excreción urinaria de P. FGF23 suprime la transcripción de 1α -hidroxilasa en túbulos renales proximales mediante la activación de ERK1/2.

Otro órgano diana de FGF23 son las glándulas paratiroides. FGF23 regula directamente la producción de PTH inhibiéndola a través de FGFR y Klotho [33]. Altos niveles de FGF23 intacto en el torrente sanguíneo, como las que se encuentran en pacientes con raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante, raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X (XLH) u osteomalacia inducida por tumores, conducen a la pérdida renal de P y alteraciones de la mineralización ósea [31]. En pacientes con ERC, los niveles elevados de FGF23 se asocian clínicamente con disfunción endotelial y rigidez arterial, además de mayores índices de calcificación aórtica y coronaria [34].

Hay que señalar también que, en la población general con función renal normal, un FGF23 más alto se asocia de forma independiente con un mayor riesgo de eventos cardiovasculares [35]. Por lo tanto, un aumento de FGF23 es un determinante independiente de ECV. Por lo tanto, FGF23 puede

causar disfunción endotelial y contribuir a la disfunción cardiovascular [36]. Existe una estrecha asociación entre los niveles elevados de FGF23, mortalidad por cualquier causa y fallo cardíaco en individuos mayores de 65 años [37]. Curiosamente, esta asociación parece ser más fuerte en pacientes con ERC. De hecho, un estudio realizado en pacientes con ERC, demostraron que niveles elevados de FGF23 causan directamente hipertrofia del ventrículo izquierdo [38]. Del mismo modo, resultados de nuestro grupo de investigación demostraron que los altos niveles de FGF23 presentes en los pacientes con ERC aumentan la rigidez arterial y deterioran la función vascular, lo que en última instancia podría empeorar la ECV [39].

El mayor estímulo para la síntesis de FGF23 es el P, estando este elemento presente en altas concentraciones en los enfermos con ERC [40]. Niveles elevados de FGF23 parecen estar asociados de forma independiente con la mortalidad entre los pacientes en hemodiálisis [41]. Un control sobre el P sérico reduciría estos niveles de FGF23 [42]. También se observó que los pacientes con concentraciones más elevadas de P y FGF23, presentaban niveles más altos de parámetros inflamatorios. Nuestros datos respaldan el concepto de que el P sérico, los niveles de FGF23 y la inflamación están estrechamente relacionados. Resultados propios del grupo demostraron que la inflamación inducida por la administración de lipopolisacáridos (LPS) incrementó la producción de FGF23 tanto en ratas normales como en ratas con ERC y restricción dietética de P [43]. Se ha demostrado que las citoquinas inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral- α (TNF α) y la interleuquina-1 β (IL-1 β), la deficiencia de hierro y la eritropoyetina, también promueven la producción de FGF23 [44], [45]. Estos factores se consideran mediadores potenciales de FGF23 elevado en pacientes con ERC.

En cuanto a α -Klotho, se expresa predominantemente en el riñón y en el plexo coroideo (sistema nervioso central), aunque su expresión también se ha descrito en la glándula paratiroides, la glándula pituitaria, la placenta, el músculo esquelético, el páncreas y los testículos, entre otros tejidos [46].

Klotho puede presentarse como una isoforma asociada a la membrana o bien en forma soluble (sKlotho), y se requiere para posibilitar la unión de FGF23 con FGFR fundamentalmente en el túbulo distal, aunque su efecto biológico se desarrolla fundamentalmente en el túbulo proximal [47]. El dominio extracelular en la membrana de Klotho, que consta de 2 secuencias repetidas (KL1 y KL2), puede ser eliminado por secretasas para producir un fragmento completo y un fragmento KL1 del dominio extracelular, respectivamente, y liberado a la circulación como sKlotho [48]. Otra forma de proteína Klotho, al que se denominó Klotho secretado, se generaba mediante corte y empalme

alternativo de la transcripción del fragmento KL1; sin embargo, actualmente existe controversia acerca de la existencia de esta forma, ya que el ARNm que lo produce no se somete a traducción [49]. Klotho modula muchas vías involucradas en los procesos de envejecimiento, como la regulación de la homeostasis del P, la señalización de la insulina y de Wnt [50]. Además, Klotho también afecta a las vías de señalización intracelular que incluyen p53/p21, adenosín monofosfato cíclico (cAMP), proteína quinasa C (PKC) y factor de crecimiento transformante β (TGF- β) [51].

sKlotho no sólo incrementa la afinidad para la unión de FGFR a FGF23, sino que también actúa como un andamio para permitir una mayor proximidad entre FGFR y FGF23, lo que aumenta la estabilidad del complejo. Algunos autores han sugerido que los niveles séricos y urinarios de sKlotho pueden servir como indicadores de la expresión renal de Klotho [50].

Los niveles de expresión de Klotho y su concentración circulante disminuyen con el envejecimiento. En humanos, la deficiencia de Klotho se relaciona con calcificación medial, hiperplasia de la íntima, disfunción endotelial, rigidez arterial, HTA, alteración de la angiogénesis y vasculogénesis, todas ellas características del envejecimiento vascular temprano [52]. En suma, Klotho tiene un efecto protector en la vasculatura [53]. Los ratones con deficiencia de Klotho exhiben hiperfosfatemia debido a la alteración de la excreción urinaria de P, además de desarrollar un fenotipo progerico complejo que incluye crecimiento deficiente, atrofia de múltiples órganos, CV, sarcopenia, hipertrofia y fibrosis cardíacas, deterioro cognitivo y vida más corta [50, 54, 55]. En consecuencia, los ratones knock-out para Klotho muestran una enfermedad vascular grave, con CV generalizada, disfunción endotelial y aterosclerosis progresiva acompañada de hipervitaminosis D, hipercalcemia e hiperfosfatemia [56].

1.2.4. Vitamina D

La Vit D es un secoesteroide liposoluble cuyo receptor actúa como factor de transcripción al translocarse al núcleo. Este sistema hormonal está involucrado en la regulación de casi el 3% del genoma humano. Los seres humanos adquieren la mayor parte de su Vit D a partir de la síntesis cutánea inducida por la luz solar (aproximadamente el 80%), mientras que el resto proviene de la dieta y los suplementos [57]. Las fuentes vegetales proporcionan ergocalciferol (D_2) y las fuentes animales proporcionan colecalciferol (D_3), ambos con metabolismo similar. Tanto la Vit D_3 como la D_2 son precursores y, por tanto, biológicamente inactivos. Estos precursores son transportados en el hígado por la proteína fijadora de Vit D o transcalfiferina (DBP). Luego, la Vit D es hidroxilada en la posición

C25 por una hidroxilasa específica codificada por el gen *CYP2R1*. La 25-hidroxivitamina D (25(OH)D) o calcidiol es la principal forma circulante de Vit D. Ha sido considerada precursora de la forma activa 1,25(OH)₂-D₃ y a muy alta concentración tiene la capacidad de unirse al VDR. Luego se metaboliza en los riñones a través de la 1- α -hidroxilasa a su forma más activa, el CTR.

La Vit D realiza sus funciones a través del VDR que se expresa universalmente en células nucleadas. Su función biológica más importante es promover la diferenciación de enterocitos y la absorción intestinal de Ca²⁺, facilitando su homeostasis [58].

Durante la hipocalcemia, el nivel plasmático de Ca²⁺ ionizado cae y esto es detectado por los receptores de Ca²⁺ de las glándulas paratiroides. La PTH es secretada por la glándula paratiroides en respuesta a la hipocalcemia y estimula la 1- α -hidroxilación en los riñones para producir más Vit D a partir del calcidiol circulante. La elevación de Vit D aumenta el transporte de Ca²⁺ dentro de los intestinos, los huesos y los riñones, y regula aún más la actividad de los osteoblastos y los osteoclastos. A medida que el Ca²⁺ plasmático vuelve a la normalidad, la secreción de PTH se inhibe. La Vit D es un potente regulador negativo de la producción de PTH. Se une al complejo VDR en las células paratiroides y regula a la baja la expresión del gen *PTH*, aumenta la expresión de VDR y aumenta la transcripción del CaSR [59]. Este bucle fisiológico de la homeostasis de la Vit D y el Ca²⁺ demuestra que es esencial una cantidad suficiente de calcidiol circulante para una síntesis adecuada de Vit D y mantener los niveles fisiológicos de Ca²⁺ [60].

Los osteoclastos maduros mantienen los niveles de Ca²⁺ y el P promoviendo el remodelado óseo. Los osteoblastos expresan tanto la 25-hidroxilasa como los sistemas enzimáticos 1- α hidroxilasa y pueden funcionar como células productoras independientes de Vit D [61].

La insuficiencia de Vit D (<16-30 ng/mL) es común entre los pacientes con ERC o sometidos a diálisis [62]. Los niveles de CTR también disminuyen progresivamente debido a la deficiencia de calcidiol, al aumento de FGF23 y a la disminución del tejido renal funcional. Esta disminución progresiva de CTR sérico conduce al HPTS y sus complicaciones.

1.2.5. Hormona Paratiroidea (PTH)

La PTH es uno de los elementos clave para el mantenimiento del metabolismo mineral. Se produce en las células paratiroides y está compuesta por 84 aminoácidos, cuyo peso molecular es de unos 9.600 Daltons. La secreción de las células paratiroides está constituida fundamentalmente por la

molécula completa de PTH, de 84 aminoácidos (Figura 6). No obstante, en el torrente sanguíneo se pueden encontrar fragmentos inmunorreactivos de PTH carboxi (C-) y N-terminales, que provienen del metabolismo sistémico de la proteína de PTH, aunque en menor medida son también secretados por las glándulas paratiroides. Durante la hipocalcemia la secreción hormonal está constituida fundamentalmente por moléculas de PTH intacta (iPTH), mientras que en hipercalcemia los fragmentos C-terminales suponen la mayor parte del material inmunorreactivo secretado [63].

A pesar de que FGF23 y PTH tienen efectos sinérgicos en relación con la excreción renal de P, tienen efectos opuestos sobre la síntesis de CTR. FGF23 inhibe la 1- α -hidroxilasa y, por tanto la síntesis de CTR, mientras que la PTH estimula la producción de 1- α -hidroxilasa, y con ello la de CTR. FGF23 y PTH aumentan la excreción de P al reducir la concentración de los cotransportadores NaPi2a y NaPi2c, a través de las vías dependientes de la proteína quinasa A y C [12].

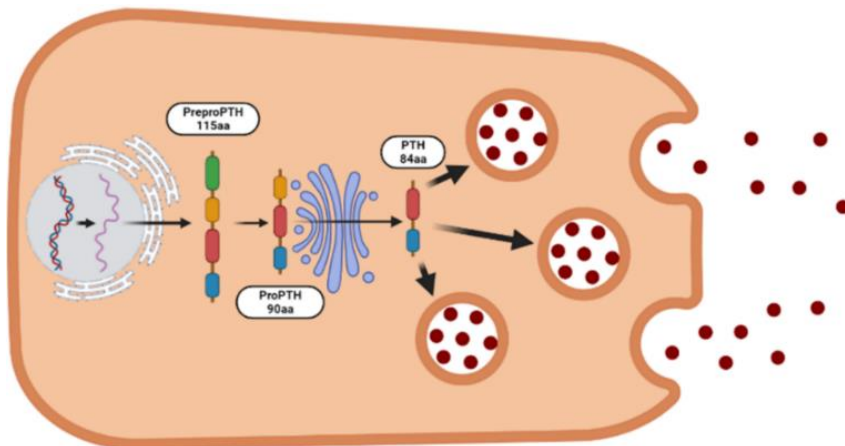


Figura 6. Síntesis de la PTH. La PTH se sintetiza como una prepro-PTH que luego se escinde en PTH madura y se almacena en gránulos hasta su secreción.

2. MAGNESIO

El Mg^{2+} es otro elemento importante en el metabolismo mineral. Por su relevancia en esta tesis se incluye un apartado específico dedicado a la relación del Mg^{2+} con la progresión de la ERC y el desarrollo de sus comorbilidades, con especial atención a los procesos inflamatorios y de EO encontrados a nivel vascular.

2.1. Homeostasis del magnesio

El Mg^{2+} es el segundo catión divalente más abundante en el organismo, encontrándose principalmente de forma intracelular. El Mg^{2+} intracelular se localiza principalmente en el hueso (60-65%) y es potencialmente intercambiable con el Mg^{2+} sérico, representando una reserva moderadamente accesible de este ión [64]. El Mg^{2+} juega un importante papel como elemento estructural y regulador de diversas funciones importantes en el cuerpo humano. Es cofactor en más de 300 sistemas enzimáticos que regulan diversas reacciones bioquímicas en el cuerpo, incluida la síntesis de proteínas, la transmisión muscular y nerviosa, la conducción neuromuscular, la transducción de señales, el control de la glucosa en sangre y la regulación de la presión arterial (PA). Algunos ejemplos de enzimas dependientes de Mg^{2+} son Na^+ /potasio (K^+)-ATPasa, hexoquinasa, creatina quinasa, proteína quinasa y ciclasas [65].

El Mg^{2+} también es necesario para la función estructural de proteínas, ácidos nucleicos o mitocondrias, para la síntesis de ADN y ARN, y para la producción de energía tanto aeróbica como anaeróbica (fosforilación oxidativa y glucólisis), ya sea indirectamente como parte del complejo Mg-ATP o directamente como activador enzimático.

Muchos estudios han demostrado que la absorción intestinal de Mg^{2+} se equilibra con su excreción renal [66]. Cuando ocurre un déficit temporal de Mg^{2+} , el mantenimiento de sus niveles séricos en el organismo depende de su disponibilidad en el hueso [67]. Por tanto, la homeostasis del Mg^{2+} depende de las acciones colaborativas de tres órganos: el intestino, que facilita la captación del Mg^{2+} de los alimentos; el hueso, que almacena el Mg^{2+} del cuerpo en forma de whitlockita y los riñones, que son responsables de su excreción urinaria.

Las concentraciones séricas de Mg^{2+} están estrechamente relacionadas con el metabolismo óseo. El Mg^{2+} de la superficie ósea se intercambia continuamente con el Mg^{2+} en sangre. En el hueso, los iones de Mg^{2+} se unen al P y al Ca^{2+} formando en la superficie cristales de whitlockita [68]. El Mg^{2+} aumenta la solubilidad del P y Ca^{2+} de la whitlockita y, por lo tanto, actúa sobre el tamaño y la formación de los cristales. El Mg^{2+} induce la proliferación de osteoblastos y, por lo tanto, la deficiencia de Mg^{2+} resulta en una disminución de la formación ósea.

La ingesta dietética de referencia de Mg^{2+} para adultos es de 310 a 420 mg/día, pero suele estar por debajo de estas recomendaciones, especialmente a medida que las personas envejecen [69]. El contenido de Mg^{2+} es alto en los cereales integrales y las verduras blancas y de hojas verdes oscuras

[70]. Del Mg^{2+} dietético total consumido, entre el 24 y el 76% se absorbe en el intestino y el resto se elimina por vía fecal. Cabe señalar que la absorción intestinal no es directamente proporcional a la ingesta de Mg^{2+} , sino que depende principalmente del estado de Mg^{2+} . Cuanto menor es el nivel de Mg^{2+} , más mineral se absorbe en el intestino, por lo que la absorción relativa de Mg^{2+} es alta cuando la ingesta es baja y viceversa (Figura 7) [71].

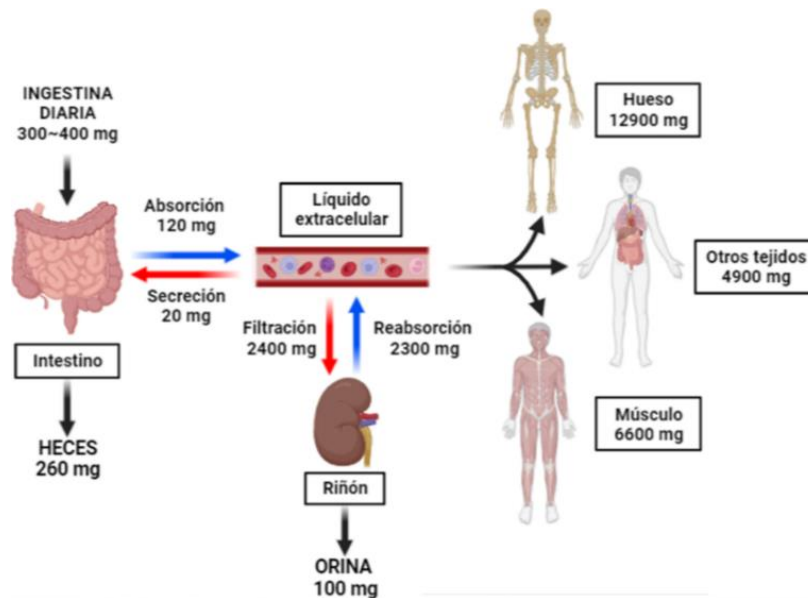


Figura 7. Homeostasis del Mg^{2+} . La homeostasis del Mg^{2+} se mantiene a través de las funciones normales del riñón, el intestino y los huesos. La figura representa la cantidad diaria de ingesta y excreción de Mg^{2+} . Diariamente los intestinos absorben ~120mg y excretan 20 mg de Mg^{2+} , lo que resulta en una absorción neta de 100 mg. En el riñón, el glomérulo filtra aproximadamente 2400 mg de Mg^{2+} , de los cuales 2300 mg se reabsorben a lo largo del túbulo renal. Esto da como resultado una excreción neta de 10mg, que coincide con la absorción intestinal. Los huesos y los músculos proporcionan las reservas de Mg^{2+} más importantes.

La mayor parte del Mg^{2+} se encuentra dentro del compartimento intracelular y el paso al espacio extracelular es lento. Es interesante mencionar que la concentración de Mg^{2+} en el citosol y el espacio extracelular es similar; esto contrasta con otros aniones divalentes como el Ca^{2+} , con una concentración intracelular aproximadamente 10.000 veces menor que en el compartimento extracelular. El gradiente de Mg^{2+} entre el citosol y los orgánulos celulares es casi inexistente. El Mg^{2+} intracelular está regulado por diferentes tipos de transportadores de Mg^{2+} : canal catiónico potencial del receptor transitorio de la subfamilia M 7 (TRPM7), la familia de transportadores de solutos 41 miembro 1 (SLC41A1) y miembro 2 (SLC41A2), empalme de ARN mitocondrial 2 (MRS2), y del canal mediador de transporte de cationes metálicos divalentes de dominio ciclina y cistationina β -sintasa (CBS) 3 (CNNM3) (Figura 8). El TRPM7 es un canal catiónico divalente expresado de forma ubicua que es responsable de gran parte del flujo de Mg^{2+} en la célula. El transportador SLC41A1 funciona como un intercambiador Na^+/Mg^{2+} a razón de 2:1. El SLC41A2 se expresa en las membranas de los

orgánulos y está involucrado en el transporte subcelular de Mg^{2+} . MRS2 es el principal canal de Mg^{2+} en la membrana mitocondrial. Dado que el Mg^{2+} es de gran importancia para la unión de ATP, las concentraciones intramitocondriales de Mg^{2+} pueden influir indirectamente en la progresión del ciclo del ácido cítrico. El CNNM3 tiene un patrón de expresión ubicuo y su actividad en el mantenimiento de la homeostasis celular de Mg^{2+} está regulada por el oncogén de la fosfatasa de hígado-2 en regeneración (PRL2).

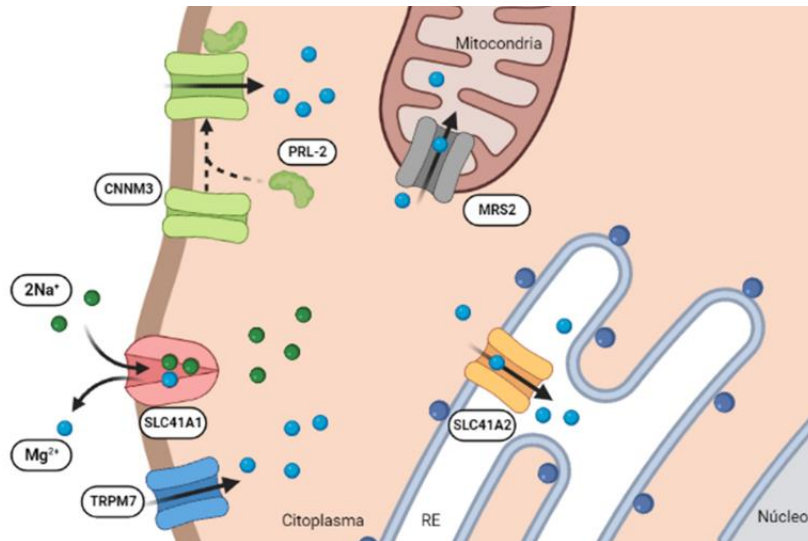


Figura 8. Regulación intracelular del Mg^{2+} . El flujo intracelular de Mg^{2+} está regulada por el canal TRPM7, el intercambiador Na^{+}/Mg^{2+} SLC41A1 y el canal CNNM3 con su activador PRL2. La entrada de Mg^{2+} en los orgánulos depende de MRS2 en la mitocondria y el canal SLC41A2 en el retículo endoplásmico.

La absorción de Mg^{2+} en el intestino depende de dos vías separadas. Por un lado, el transporte paracelular a través de los pequeños espacios entre las células epiteliales es un mecanismo pasivo, responsable de una masiva absorción de Mg^{2+} y tiene lugar principalmente en el intestino delgado, fundamentalmente en el yeyuno e íleon, donde el 40% del Mg^{2+} ingerido es absorbido. Por otro lado, en el ciego y en el colon tiene lugar un transporte transcelular a través del canal catiónico potencial del receptor transitorio de la subfamilia M 6 (TRPM6) y del TRPM7. El canal TRPM7 se expresa de forma ubicua, mientras que TRPM6 se expresa predominantemente en el ciego. La expresión de TRPM6 y TRPM7 está restringida a la membrana luminal de los enterocitos [72]. El mecanismo de extrusión del Mg^{2+} basolateral está acoplado al gradiente de Na^{+} , siendo las concentraciones de Na^{+} más bajas en el citoplasma que en la sangre debido a la acción del Na^{+}/K^{+} basolateral -ATPasa y a través del canal mediador de transporte de cationes metálicos divalentes de dominio ciclina y CBS 4 (CNNM4) (Figura 9) [73].

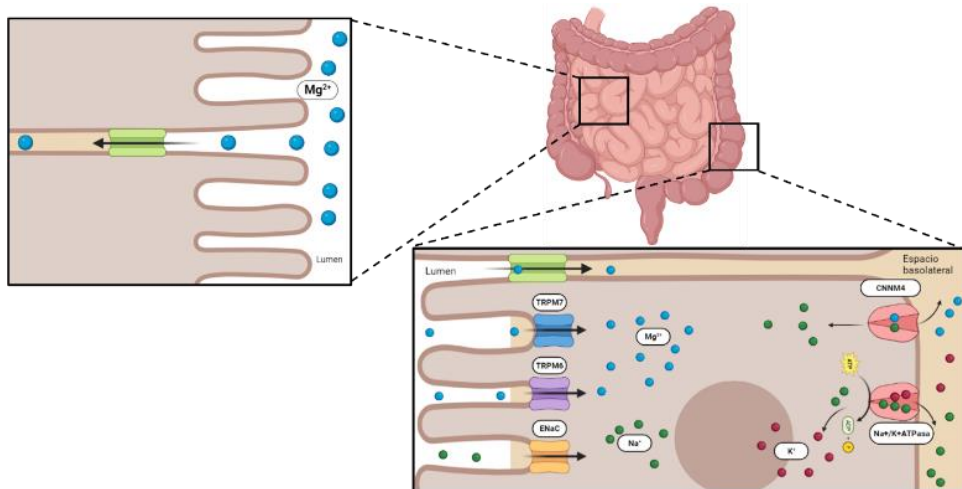


Figura 9. Transporte del Mg^{2+} en el intestino. La entrada de Mg^{2+} al espacio basolateral se realiza principalmente de forma paracelular en el intestino delgado, fundamentalmente en el yeyuno e ileon. En el ciego y en el colon tiene lugar el transporte transcelular de Mg^{2+} a través de los canales TRPM6 y TRPM7. Su extrusión al espacio basolateral está acoplada al gradiente de Na^+ realizada mediante los canales CNNM4 y la $Na^+/K^+-ATPasa$.

El riñón es considerado como el órgano fundamental en la homeostasis del Mg^{2+} , ya que la concentración sérica del Mg^{2+} se controla principalmente mediante su excreción en la orina. El 80% del Mg^{2+} en el plasma es filtrado por el glomérulo. De los aproximadamente 2.400 mg diarios de Mg^{2+} filtrados, la nefrona recupera el 95-99%. La cantidad restante, unos 100 mg, se eliminan a través de la orina. La absorción tubular de Mg^{2+} ocurre sobre todo en el asa de Henle, siendo ésta de un 60 a un 70% del total filtrado. El túbulo proximal absorbe sólo un 15-25% del Mg^{2+} filtrado. Por su parte, el túbulo distal absorbe un 5-10% del Mg^{2+} filtrado, pero se considera como el sitio de control final en la regulación de Mg^{2+} . En el asa gruesa de Henle se reabsorbe aproximadamente el 65% de la carga filtrada, concretamente en la porción gruesa ascendente. El Mg^{2+} es reabsorbido con el Ca^{2+} de manera pasiva a través de la vía paracelular entre uniones intercelulares estrechas formada por las claudinas. En el TAHL se expresan las varias claudinas, pero las claudinas 16 y 19 se consideran principales en la permeabilidad del Mg^{2+} . La fuerza que impulsa esta reabsorción es el gradiente eléctrico generado por la reabsorción de Na^+ a través del cotransportador $Na^+/K^+/2Cl^-$ (NKCC2). Por último, una pequeña cantidad es reabsorbida en los túbulos distales y colectores. No existe un gradiente de concentración que impulse la reabsorción de Mg^{2+} en este segmento de la nefrona, ya que las concentraciones locales de Mg^{2+} son comparables con la luz de la nefrona, el citoplasma de las células del TCD y el líquido intersticial entre las células. Por lo tanto, la reabsorción de Mg^{2+} se basa en el potencial de membrana negativo establecido por la fuga de K^+ por los canales $Kv1.1$. Dicha reabsorción de Mg^{2+} es realizada por TRPM6, el cual se expresa de forma específica a este nivel, reabsorbiéndolo del lumen. El

intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ SLC41A1 está implicado en la extrusión basolateral de Mg^{2+} , donde el canal mediador de transporte de cationes metálicos divalentes de dominio ciclina y CBS 2 (CNNM2) parece facilitar dicho intercambio. Esta extrusión de Mg^{2+} depende de la Na^+/K^+ -ATPasa, donde las mitocondrias sirven como reservas intracelulares de Mg^{2+} y proporcionan ATP para la Na^+/K^+ -ATPasa. Las concentraciones intramitocondriales de Mg^{2+} se determinan mediante MRS2 y SLC41A2. El canal TRPM6 se modula también por numerosos factores ya sea a nivel transcripcional, por su disponibilidad en la membrana plasmática y su actividad, ejemplo la insulina que activa el canal de Mg^{2+} TRPM6 controlando la excreción urinaria final de Mg^{2+} o los estrógenos que aumentan la expresión de ARNm de este canal (Figura 10) [74].

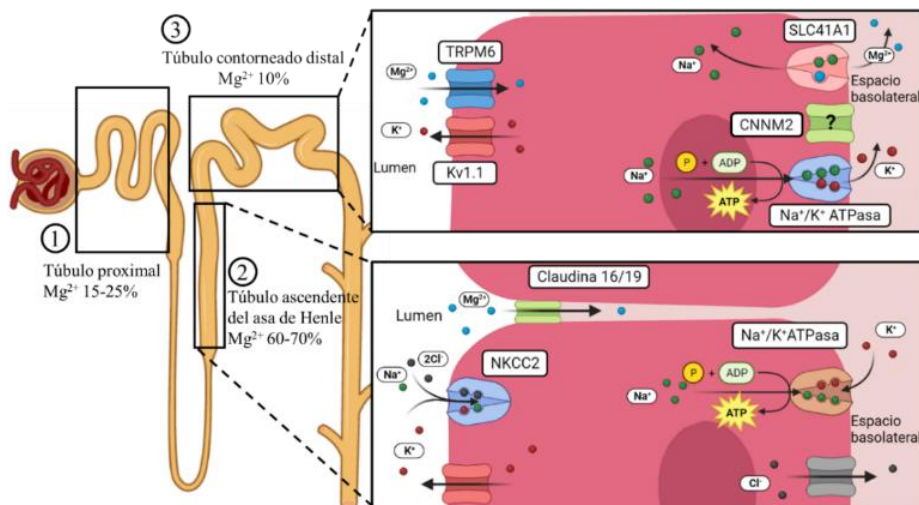


Figura 10. Reabsorción de Mg^{2+} en el túbulo proximal, TAHL y TCD. Alrededor del 15-25% del Mg^{2+} filtrado se reabsorbe pasivamente por vía paracelular en el túbulo proximal. El transportador NKCC2 proporciona la fuerza motriz para la reabsorción paracelular del 60-70% del Mg^{2+} filtrado en TAHL con ayuda del gradiente con la Na^+/K^+ -ATPasa basolateral. El Mg^{2+} se reabsorbe activamente a través del TRPM6 en el DCT. El $\text{Kv}1.1$ apical proporciona potencial de membrana mediante la excreción apical de K^+ . La Na^+/K^+ -ATPasa basolateral establece el gradiente de membrana para la actividad de TRPM6. El eflujo de Mg^{2+} se conduce en el intercambiador SLC41A1 y posiblemente también en el CNNM2.

2.2. Déficit de Mg^{2+}

Durante las últimas décadas, el estudio de los niveles basales de Mg^{2+} ha sido exhaustivo, ya que la deficiencia de este mineral se considera un factor de riesgo importante en diversas patologías [75]. Se han descrito asociaciones entre hipomagnesemia y patologías como HTA, aterosclerosis, arritmias cardíacas, accidente cerebrovascular, calcificaciones cardiovasculares, cambios en el metabolismo de los lípidos, resistencia a la insulina, SMet, diabetes tipo 2 (DT2), osteoporosis, depresión y otros trastornos neuropsiquiátricos (Figura 11) [74, 76].

El efecto de la disminución de Mg^{2+} sobre la respuesta inflamatoria y oxidativa en rata se conoce desde hace casi un siglo [77]. Se sabe que la deficiencia de Mg^{2+} facilita la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), potenciando así un ambiente oxidante y también promoviendo la inflamación a través de la activación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B). NF- κ B induce la producción de citoquinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión y enzimas involucradas en la respuesta inflamatoria [78]. Estos efectos han sido también documentados a nivel endotelial. De esta manera, se ha comprobado *in vitro* que niveles reducidos de Mg^{2+} se asocian con la liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y moléculas de adhesión, todos ellos aspectos clave que favorecen el desarrollo de la ECV [79].

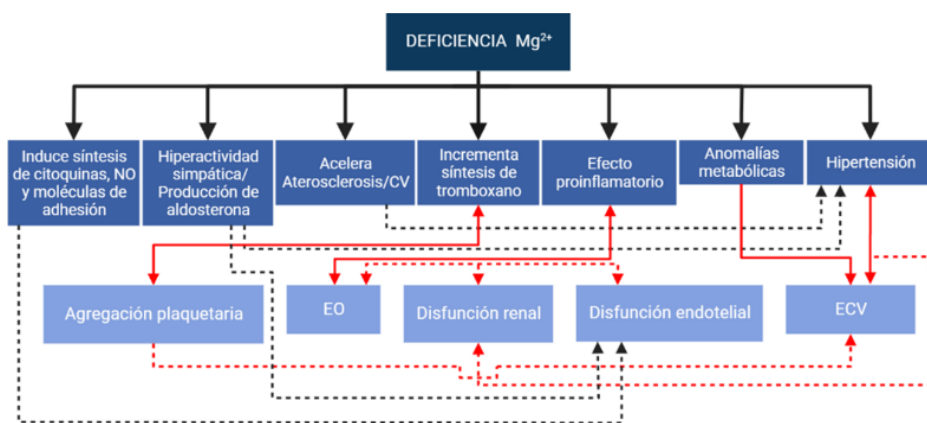


Figura 11. Consecuencias de la hipomagnesemia. Figura adaptada de Cristian Rodelo-Haad et al. The Role of Disturbed Mg Homeostasis in Chronic Kidney Disease Comorbidities. Front Cell Dev Biol. 2020; 8: 543099

Cada vez existen más evidencias que respaldan una asociación entre un mayor riesgo de ECV y una ingesta baja de Mg^{2+} en la dieta, así como del efecto beneficioso de un suplemento o un mayor consumo de Mg^{2+} en la prevención y el tratamiento de las ECV [80]. La deficiencia de Mg^{2+} , de leve a moderada, podría aumentar el riesgo de excitación cardíaca anormal, aterosclerosis, cardiopatía isquémica e insuficiencia cardíaca congestiva, mientras que la deficiencia grave de Mg^{2+} puede causar arritmias ventriculares e incluso aumentar el riesgo de muerte súbita cardíaca. Debido a que el Mg^{2+} es un cofactor clave de muchas enzimas, los cambios en las concentraciones intracelulares y extracelulares pueden afectar también a numerosas vías metabólicas, especialmente porque el Mg^{2+} es necesario para las reacciones dependientes de energía a través del adenosín trifosfato (ATP).

El Mg^{2+} también juega un papel importante en el mantenimiento de los gradientes electroquímicos a través de las membranas citoplasmáticas y, como tal, los cambios en las concentraciones de Mg^{2+} alteran los potenciales de membrana y el transporte de iones. El Mg^{2+} actúa

como segundo mensajero tras la unión de la insulina a su receptor. La deficiencia de Mg^{2+} tiene un efecto negativo sobre la señalización, alterando la captación de glucosa por la insulina y la secreción de ésta inducida por glucosa, produciendo hiperglucemia. La restricción dietética de Mg^{2+} se ha asociado con otros trastornos metabólicos, como la resistencia a la insulina, la inflamación sistémica, la dislipidemia, DT2 y las enfermedades cardiovasculares, estando presentes todas estas patologías en el SMet [81, 82]. En humanos, se observó una fuerte relación inversa entre los niveles séricos de Mg^{2+} y la incidencia de SMet en pacientes obesos y con sobrepeso [83]. Este aspecto es de especial interés y será abordado en profundidad en esta Tesis, tratando de valorar los cambios vasculares promovidos por el suplemento de Mg^{2+} en un contexto de ERC y SMet.

En el estudio ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities) se observó que el mayor riesgo de enfermedad arterial coronaria (EAC) recaía en los pacientes con los niveles más bajos de Mg^{2+} , incluso después de controlar los factores de riesgo tradicionales [84]. Resultados de nuestro grupo de investigación relativos al estudio CORDIOPREV (The CORonary Diet Intervention with Olive oil and cardiovascular PREvention) muestran al Mg^{2+} basal como factor de riesgo independiente relacionado con el grosor íntima-media en pacientes con enfermedad coronaria [85]. De esta manera, se especula con una posible acción directa del Mg^{2+} sobre la vasculatura. Este aspecto será también abordado durante el desarrollo de la Tesis.

Se sabe que el Mg^{2+} está involucrado con la regulación de la PA. Pequeños cambios en las concentraciones de Mg^{2+} extracelular e intracelular tienen efectos significativos sobre el tono, la contractilidad y la reactividad vascular, la regulación de la angiogénesis y la remodelación vascular. Bajos niveles de Mg^{2+} extracelular disminuyen la proliferación de células endoteliales y las CMLV, estimulan la adhesión de monocitos y afectan a la síntesis de moléculas vasoactivas, lo cual se relaciona directamente con HTA y disfunción endotelial [76, 86]. Un ejemplo de la alteración de la función endotelial se observa en el modelo de hipomagnesemia familiar en ratón elaborado por Tagliabracci y cols. En comparación con ratones control, en las aortas de los animales con bajo Mg^{2+} se detectaron menores niveles de óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y una mayor expresión de moléculas proinflamatorias [87].

Es muy importante subrayar que la desregulación de los niveles séricos de Mg^{2+} es frecuente en pacientes con ERC y está asociada con pronósticos clínicos adversos. En estudios *in vitro*, *in vivo* y clínicos desarrollados por nuestro grupo se ha encontrado una relación entre los niveles de Mg^{2+} y la presencia de CV, ECV y alteraciones en el metabolismo óseo-mineral (Figura 12). Por lo tanto, el

desarrollo de la disfunción vascular y las alteraciones en el metabolismo mineral en la ERC y su relación con el Mg^{2+} serán estudiadas en esta Tesis.

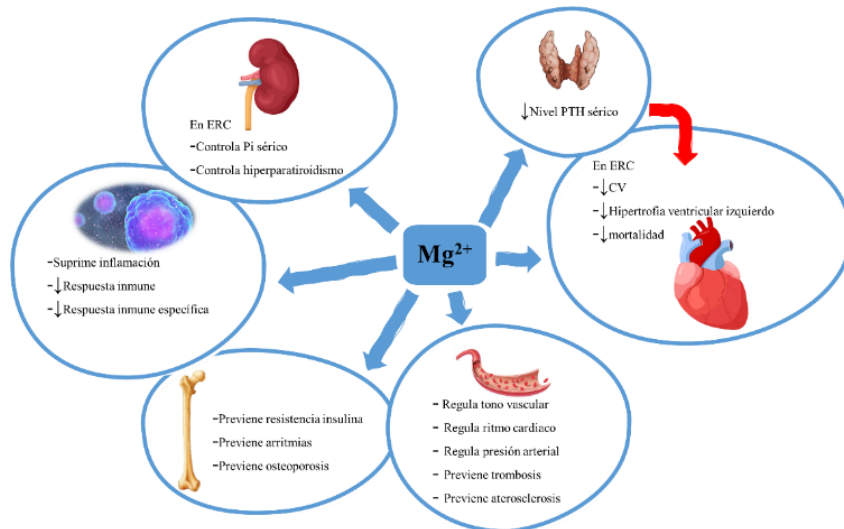


Figura 12. Relación entre Mg^{2+} y ECV en la ERC. Adaptada de Mehmet Kanbay et al. Magnesium in chronic kidney disease: challenges and opportunities. Blood Purif. 2010;29(3):280-92.

Altas concentraciones de Mg^{2+} también pueden activar el CaSR, aunque con una potencia 2 ó 3 veces inferior al Ca^{2+} , y modular la secreción de PTH de manera similar a éste [88]. Un estudio *in vitro* realizado también en nuestro grupo con glándulas paratiroides intactas de rata mostró que las glándulas paratiroides eran sensibles a un efecto inhibitorio del Mg^{2+} solo cuando había una concentración de Ca^{2+} moderadamente baja [89]. Otro aspecto importante por considerar es el posible antagonismo entre Mg^{2+} y Ca^{2+} . Estudios epidemiológicos han demostrado que tanto la PTH como el Ca^{2+} están asociados con una PA elevada, que puede deberse a alteraciones de la homeostasis del Mg^{2+} . El Ca^{2+} es una molécula de señalización fundamental que gobierna una gran variedad de funciones celulares. El Mg^{2+} es considerado el principal antagonista intracelular del Ca^{2+} , ya que influye en la afinidad del Ca^{2+} hacia las proteínas de unión al Ca^{2+} (entre las que se encuentran la calmodulina (CaM) y la troponina C), limita la captación de Ca^{2+} por el uniportador mitocondrial e inhibe la liberación de Ca^{2+} por el inositol 1, receptores de 4,5-triP y rianodina. El Mg^{2+} extracelular, por otro lado, regula los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Como consecuencia, la deficiencia de Mg^{2+} aumenta los niveles intracelulares de Ca^{2+} con un impacto relevante en las funciones celulares. Los niveles bajos de Mg^{2+} en suero están frecuentemente relacionados con una PA alta. El Mg^{2+} intracelular puede reducir la concentración de Ca^{2+} intracelular dentro de las CMLV. Se cree que esta

vasodilatación inducida por Mg^{2+} es el mecanismo por el cual el Mg^{2+} podría modular la PA. Durante el desarrollo de esta Tesis, el efecto del Mg^{2+} sobre la PA será abordado.

El Mg^{2+} juega un papel en la modulación de PTH al actuar sobre el CaSR [88]. La secreción de PTH se estimula en la hipomagnesemia aguda y se suprime en la hipermagnesemia. En glándulas paratiroides intactas, un aumento en el Mg^{2+} extracelular reduce la secreción de PTH y este efecto se magnifica si la PTH está siendo estimulada por niveles bajos de Ca^{2+} [85]. Es importante tener en cuenta que la hipomagnesemia severa suprime (en lugar de estimular) la secreción de PTH y aumenta la resistencia de la PTH en el hueso, lo que lleva a la hipocalcemia [90]. La hipomagnesemia grave produce un defecto de secreción de PTH y una disminución de la respuesta del hueso a la acción calcémica de la PTH. Esto parece paradójico, ya que en sujetos sanos una disminución aguda de los niveles de Mg^{2+} estimula la secreción de PTH. Posiblemente la hipomagnesemia crónica produce una depleción intracelular de Mg^{2+} que interfiere con la secreción de PTH y con la respuesta de las células del hueso a la PTH.

El Mg^{2+} es un componente importante del hueso y juega un papel vital en la homeostasis mineral, en parte al influir en la síntesis de metabolitos activos de la Vit D que apoyan la absorción intestinal de Ca^{2+} y P [91]. Se ha demostrado que la Vit D puede estimular la absorción intestinal de Mg^{2+} . Por otro lado, el Mg^{2+} es un cofactor necesario para la unión de la Vit D a su proteína transportadora, la DBP. Además, la conversión de Vit D por la 25-hidroxilación hepática y 1α -hidroxilación renal en la forma hormonal activa CTR depende del Mg^{2+} . La deficiencia de Mg^{2+} , que conduce a una reducción del CTR y una respuesta alterada de la hormona paratiroidea, se ha relacionado con el raquitismo resistente a la Vit D dependiente del Mg^{2+} . Algunos estudios han demostrado que el riesgo de mortalidad asociado a la hipovitaminosis D podría reducirse mediante el consumo de Mg^{2+} [92, 93].

Además, se ha documentado que la suplementación con Mg^{2+} se asocia a efectos beneficiosos. Se ha comprobado que la adición de Mg^{2+} en el agua de bebida fue capaz de prevenir la aterogénesis en ratones alimentados con niveles altos de colesterol [94]. Así mismo, la administración oral de Mg^{2+} se ha asociado con la mejora de la función endotelial en pacientes con enfermedad coronaria. Resulta especialmente interesante comprobar cómo la función endotelial aparece significativamente alterada en un modelo de hipomagnesemia hereditaria en ratón [95]. Es de destacar también cómo en diferentes estudios clínicos se ha identificado una asociación inversa entre la ingesta de Mg^{2+} y el nivel de proteína C reactiva (PCR), marcador de inflamación sistémica y un factor de riesgo conocido de ECV [96]. En

este sentido, se ha documentado que el suplemento con Mg^{2+} cambia la expresión génica y el perfil proteómico de individuos con sobrepeso, disminuyendo la inflamación [97].

Cabe mencionar que la hipermagnesemia se da en menor frecuencia que la hipomagnesemia. Ésta se manifiesta como desequilibrios asociados con una mayor ingesta, síndromes específicos como el síndrome HELIX, provocado por una deficiencia de la claudina 10 cuya consecuencia es una hipermagnesemia [98], o una insuficiencia renal terminal. La hipermagnesemia se puede observar en el 10-15% de los pacientes hospitalizados con enfermedad renal en etapa terminal (ERT). En los pacientes con ERC, la hipermagnesemia se debe a un acusado descenso del FG, además de la administración de sales de Mg^{2+} o fármacos que contienen Mg^{2+} . Las causas de hipermagnesemia por una incorrecta redistribución se derivan del movimiento del Mg^{2+} desde el compartimento de líquido intracelular al extracelular, como puede ser evidente en trastornos electrolíticos o escenarios de ruptura celular, incluido el síndrome de lisis tumoral [99].

Por tanto, la corrección de la homeostasis del Mg^{2+} podría ser una estrategia de intervención útil y poco costosa para prevenir y/o tratar la disfunción endotelial, inflamación y calcificaciones presentes en la ERC. La relación del Mg^{2+} con la disfunción vascular en el contexto de la ERC será estudiada en esta Tesis a través de diferentes modelos experimentales animales. A continuación, exponemos la relación entre ERC y ECV y cómo las alteraciones vasculares promovidas por el desequilibrio del metabolismo mineral inducido por la uremia afectan a la funcionalidad cardiovascular y conducen a la producción de eventos cardiovasculares y muerte.

3. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR EN LA ERC

La ECV es el término empleado para englobar cada una de las enfermedades relacionadas con el corazón o los vasos sanguíneos que producen alteraciones orgánicas o funcionales y, en un número elevado de casos, la muerte del paciente.

La ERC es un factor de riesgo para la ECV y se asocia con un aumento de la mortalidad, creciendo a medida que se deteriora la función renal. En particular, la ECV es la principal causa de muerte en enfermos con alteraciones del metabolismo mineral, como son los pacientes con ERC. Los trastornos renales y cardíacos están estrechamente relacionadas entre sí y la disfunción de un órgano causa la del otro, lo que en última instancia conduce al fallo de ambos órganos [100].

Los pacientes con ERT tienen un riesgo mucho mayor de mortalidad por la ECV. Múltiples estudios apoyan la idea de que los pacientes con enfermedad renal sufren un envejecimiento acelerado, lo que precipita la aparición de patologías, incluidas las ECV, generalmente asociadas a la edad avanzada [101]. La ECV puede ser debida a distintos factores como la presencia de patógenos periodontales, EO, dislipemia, diabetes, HTA, envejecimiento, factores inflamatorios o el estado urémico en enfermos renales, el cual lleva asociado algunos de los factores enumerados anteriormente.

3.1. Estructura de los vasos sanguíneos

Los vasos sanguíneos se clasifican en arterias, venas y capilares. Las arterias y las venas poseen una estructura compuesta por tres capas concéntricas llamadas túnica íntima, túnica media y túnica adventicia (Figura 13).

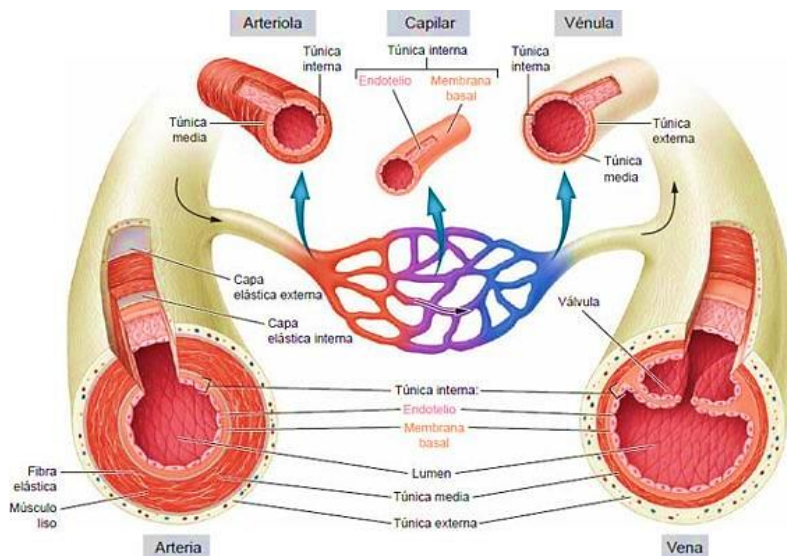


Figura 13. Vasos sanguíneos: anatomía microscópica de la arteria, vena y lechos capilares. Figura obtenida de la página web <https://enfermeria.top/apuntes/fisiopatologia/trastornos-flujo-sanguineo/vaso-sanguineo/>.

La túnica íntima es la más interna de las capas, y se compone de una capa de células epiteliales especializadas que constituye el endotelio. Debajo de la íntima está la capa subendotelial, una fina capa de tejido conectivo que no está presente en los vasos de menor calibre. Entre ambas capas se dispone la lámina basal. Los capilares sólo presentan una túnica íntima formada por células endoteliales apoyadas en su lámina basal. La túnica media está más desarrollada en las arterias que en las venas y

se compone de capas concéntricas de células musculares lisas entre las cuales se interponen cantidades variables de elastina, fibras reticulares y proteoglicanos. Entre la túnica íntima y la media de las arterias está la lámina elástica interna, una capa formada por fibras de elastina. Dicha capa confiere elasticidad al vaso para extenderse y contraerse. La lámina elástica interna está menos desarrollada en venas. La capa más externa es la túnica adventicia, la cual está compuesta por un tejido conectivo laxo constituido fundamentalmente por fibroblastos, fibras elásticas y fibras colágenas dispuestas paralelamente al eje longitudinal del vaso sanguíneo. Es la capa más prominente de las venas y está irrigada por vasos de pequeño calibre, los *vasa vasorum*. Entre la túnica media y la adventicia de las arterias se diferencia una capa limitante formada por elastina denominada lámina elástica externa.

3.1.1. Células del músculo liso vascular

Las CMLV están claramente enfocadas a su contractilidad ya que tienen una tasa de proliferación extremadamente baja y expresan un repertorio de proteínas contráctiles, canales iónicos, y moléculas de señalización [102]. Estas células tienen la capacidad de contraerse o relajarse para alterar el diámetro de la luz de los vasos sanguíneos con el fin de regular la tensión arterial [103]. Además de su función contráctil, también interviene en procesos de reparación a través del desarrollo de un fenotipo sintético y su alteración juega un papel muy importante en el desarrollo de la enfermedad vascular.

3.2. Calcificación Vascular

Una de las principales complicaciones cardiovasculares que ocurren en los últimos estadios de la ERC es la formación de CV. Se trata de una patología multifactorial caracterizada por la deposición pasiva y activa de fosfato cálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) en forma de hidroxiapatita en tejidos cardiovasculares, como los vasos sanguíneos, las arterias, el miocardio o las válvulas cardíacas.

En pacientes urémicos, las CV se caracterizan por ser más prevalentes y extensas, progresar más rápidamente y aparecer a edades más tempranas que en la población general. Así mismo, las calcificaciones de las arterias coronarias tanto en la población general como en pacientes urémicos están fuertemente correlacionadas con la presencia de placa aterosclerótica, la inestabilidad de dicha placa y con el incremento de riesgo de infarto de miocardio [104]. En los pacientes con ERC en hemodiálisis, el grado de calcificación arterial es un factor predictor de enfermedades cardiovasculares y mortalidad [105]. Durante muchos años se pensó que las CV se debían a un proceso pasivo pero en

las dos últimas décadas se ha demostrado que se trata de un proceso activo fuertemente regulado y que presenta una gran similitud al proceso fisiológico de la mineralización ósea. Además, se sabe que durante el desarrollo de las CV las CMLV sufren una transformación fenotípica hacia células de estirpe osteogénica. En este sentido, existen importantes semejanzas entre el proceso de formación de las CV y la osteogénesis, ya que los mecanismos de osificación que ocurren en las CV son similares a los de la formación de hueso [106]. La hiperfosfatemia y el elevado producto $\text{Ca} \times \text{P}$ en pacientes con insuficiencia renal están estrechamente relacionados con la calcificación de arterias coronarias, arterias periféricas y válvulas cardíacas, y están significativamente ligados a la mortalidad en pacientes en hemodiálisis [107]. Dado que una concentración alta de P en sangre se identificó como el principal factor de riesgo cardiovascular en pacientes con ERC, el P ha sido a menudo considerado como protagonista en la investigación relacionada con la ERC. Los niveles elevados de P en sangre están relacionados *in vitro* e *in vivo* con un mayor riesgo cardiovascular. Se demostró que las CMLV incubadas con altos niveles de P experimentan una reprogramación transcripcional que incluye la activación de factores de transcripción osteogénicos, lo que da como resultado la transdiferenciación de las CMLV a células similares a osteoblastos. Además, los modelos de ERC en roedores desarrollan CV en respuesta a dietas altas en P. En cualquier caso, aunque los mecanismos que conducen a la CV aún no están completamente definidos, cabe destacar el papel de la vía canónica Wnt/ β -Catenina, ruta bioquímica implicada principalmente en el proceso de diferenciación de células madre mesenquimales de médula ósea hacia osteoblastos, como parte de la osteogénesis. La alteración de esta ruta ha sido asociada con el proceso de CV. Shao y colaboradores demostraron que la activación de esta ruta alteraba la expresión de genes específicos, promoviendo con ellos la calcificación arterial [19]. Otros autores han observado que la activación de la ruta Wnt/ β -Catenina juega un papel crucial en la diferenciación de células intersticiales de la válvula aórtica a osteoblastos y en la calcificación de dicha válvula aórtica. Nuestro grupo de investigación cuenta ya con resultados preliminares en este sentido. Martínez-Moreno y colaboradores demostraron que la adición de una alta concentración de P a CMLV induce la activación de Wnt/b-catenina y que el CTR exacerbó dicho efecto, promoviendo así el desarrollo de la calcificación [106]. Montes de Oca y colaboradores también han observado, en estudios *in vitro* en CMLV, que un aumento de Mg^{2+} inhibe esta ruta y por consiguiente la calcificación [108]. Por lo tanto, la suplementación con Mg^{2+} podría reducir la progresión de la CV. En pacientes con ERC, los niveles más bajos de Mg^{2+} sérico se asocian con CV y predicen un aumento de la rigidez arterial y la mortalidad. El Mg^{2+} puede interferir tanto con la formación de hidroxipatita como con la reprogramación osteo-condrogénica de las CMLV [109].

Experimentos en ratones tratados con niveles excesivos de CTR, para promover una continua activación del receptor de Vit D durante la deficiencia de Klotho, revelaron que la suplementación con Mg^{2+} es un tratamiento potencial adicional para reducir la progresión de la CV [110]. La sobrecarga de CTR fue seguida por una extensa CV y una regulación al alza de la osteoinducción aórtica, como lo demuestra la expresión de los marcadores osteogénicos *Mx2*, *Cbfa1* y *Alp1*. Esos efectos se atenuaron con un tratamiento adicional con Mg^{2+} .

3.3. Disfunción Endotelial

Como ya se ha mencionado, el endotelio vascular está compuesto por una monocapa de células especializadas (células endoteliales), que forman la interfaz entre las células de músculo liso subyacentes de la luz vascular. Las células endoteliales recubren la superficie interna de los vasos sanguíneos y cumplen importantes funciones mecánicas y biológicas. Estas células endoteliales pueden exhibir una plasticidad significativa en función del medio en el que existan; por ejemplo, el endotelio que comprende la barrera hematoencefálica tiene características funcionales significativamente diferentes a las del revestimiento de la aorta. Sin embargo, todas las células endoteliales comparten un conjunto común de funciones, incluida la regulación de la hemostasia, el mantenimiento de la permeabilidad vascular, la mediación de las respuestas inmunitarias agudas y crónicas a varios tipos de lesiones y el control del tono vascular. Entre los compuestos vasoactivos más importantes producidos por las células endoteliales se encuentran el NO, la prostaciclina y la ET-1, entre otros, ya que no sólo afectan el tono vascular sino también a la actividad y adhesión de plaquetas y células inmunes al endotelio [111, 112]. La expresión endotelial de las moléculas de adhesión celular gobierna las interacciones con los leucocitos y monocitos circulantes, afectando la inflamación, y con las plaquetas circulantes, afectando a la hemostasia y la trombosis. El endotelio también modula la respuesta de la capa de CMLV, lo que puede contribuir a la formación de la íntima durante el desarrollo de placas ateroscleróticas.

Hay varios mecanismos moleculares que gobiernan los procesos críticos del endotelio, pero ninguno es tan crítico como la vía de señalización del NO. El NO es un gas inestable, soluble y con fuertes propiedades vasodilatadoras, antiinflamatorias y antioxidantes que juega una función central en el mantenimiento de la homeostasis vascular. En la fisiología vascular normal, el NO juega un papel clave para mantener la pared vascular en un estado de reposo mediante la inhibición de la inflamación, la proliferación celular y la trombosis. Esto se logra en parte mediante la s-nitrosilación de los residuos de cisteína en una amplia gama de proteínas, lo que reduce su actividad biológica. Las proteínas diana

incluyen el factor de transcripción NF- κ B, las proteínas que controlan el ciclo celular y las proteínas involucradas en la generación del factor tisular. Además, el NO limita la fosforilación oxidativa en las mitocondrias. El NO es producido por una familia de enzimas llamadas óxido nítrico sintasas (NOS) por oxidación de L-arginina (L-Arg) a L-citrulina. Hay tres isoformas de NOS. Dos de ellos, la NOS neuronal (nNOS) y eNOS, se expresan de forma constitutiva, mientras que la tercera es inducible y, por tanto, se denomina iNOS. La nNOS se encuentra principalmente en el sistema nervioso y es necesaria para la señalización neuronal, mientras que la eNOS se localiza en el endotelio y es esencial para la vasodilatación y el control de la PA. Estas dos isoformas producen cantidades nanomolares de NO durante períodos breves (de segundos a minutos) de forma dependiente del Ca^{2+} /CaM. iNOS, por el contrario, no está constantemente presente en las células y solo se expresa cuando la célula es inducida o estimulada, típicamente por citoquinas proinflamatorias y/o LPS. En las CMLV, el NO se difunde y activa la enzima guanilato ciclasa, que promueve la vasodilatación mediada por guanósín monofosfato cíclico (cGMP). El endotelio también media la hiperpolarización de CMLV a través de una vía independiente de NO, lo que aumenta la conductancia del K y la subsiguiente propagación de la despolarización de las CMLV, para mantener el tono vasodilatador.

La biodisponibilidad reducida del NO es un sello distintivo de la ERC, siendo esta alteración casi universal en los pacientes que alcanzan la fase más avanzada de la ERC. La baja biodisponibilidad de NO en la ERC depende de varios mecanismos que afectan la expresión y la actividad de la eNOS. La biodisponibilidad de NO depende de varios factores como la acumulación de inhibidores endógenos de eNOS, inflamación y EO, productos de glicosilación avanzada, trastornos del equilibrio óseo-mineral como hiperfosfatemia, FGF23 o bajos niveles de CTR o del factor vasculoprotector y de antienvejecimiento Klotho [36, 113, 114]. Todos inciden sobre disfunción endotelial en la ERC.

La ET-1 es una hormona que tiene efectos pleiotrópicos, destacando su papel vasoconstrictor actuando sobre el músculo liso de los vasos sanguíneos. Se compone de 21 aminoácidos y dos enlaces disulfuro intracatenarios [115]. Aparte de la ET-1, existen otros dos isopéptidos estructuralmente similares, denominados ET-2 y ET-3, producidos a partir de la transcripción de sus respectivos genes *END1*, *EDN2* y *EDN3* [116]. ET-1 es el isopéptido predominante implicado en la regulación del sistema cardiovascular, y las células endoteliales vasculares son la fuente más abundante de ET-1. Además de las células endoteliales, la ET-1 se expresa en una amplia variedad de células, incluidas las CMLV, los cardiomiocitos, los fibroblastos, los macrófagos, las células epiteliales de los pulmones y los riñones, las neuronas y las células gliales [117]. Las ET se producen a partir de sus correspondientes preprolipéptidos de aproximadamente 200 residuos que están codificados por tres genes distintos. Estos péptidos se convierten en intermediarios inactivos de 38 ó 39 aminoácidos

llamados Big ET (Big ET-1, Big ET-2 y Big ET-3) por la endopeptidasa similar a la furina. Los Big ET se activan posteriormente a través de la escisión proteolítica por las enzimas convertidoras de ET (ECE), ECE-1 y ECE-2. El aumento de la síntesis de ET-1 es promovida por la angiotensina 2 (AngII), la vasopresina (AVP), la interleuquina 1 (IL-1), LDL oxidada (oxLDL), pH extracelular reducido y ciclosporina A. Por el contrario, la prostaciclina, la tensión de cizallamiento, el NO y todos los péptidos natriuréticos son potentes inhibidores de la expresión del gen *END1* (Figura 14) [118].

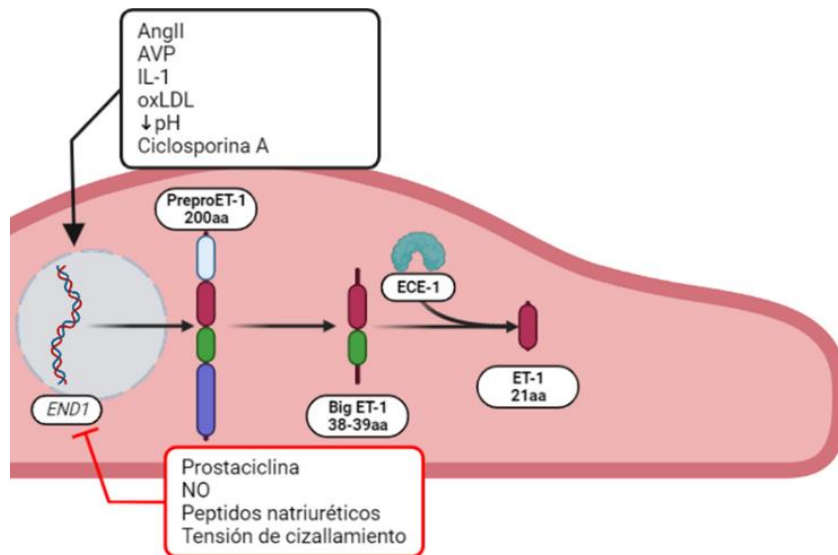


Figura 14. Síntesis y potenciadores/inhibidores de la ET-1. La síntesis de la ET-1 implica el procesamiento de un precursor por una proproteína convertasa de tipo furina a un intermediario inactivo, el Big ET-1. El último péptido luego se escinde directamente por una enzima convertidora de endotelina (ECE) en ET-1. Su síntesis puede ser regulada principalmente a nivel de transcripción génica por potenciadores (recuadro negro) y por inhibidores (recuadro rojo).

Las endotelinas se secretan de dos formas: la constitutiva y la reguladora. La vía constitutiva produce una intensa constricción del músculo liso subyacente, lo que contribuye al mantenimiento del tono vascular endógeno. La otra forma es mediante la liberación de gránulos de almacenamiento específicos de células endoteliales (cuerpos de Weibel-Palade) en respuesta a estímulos fisiológicos externos, lo que produce una mayor vasoconstricción.

En la vasculatura, ET-1 actúa sobre los receptores de endotelina tipo A y tipo B (ETA y ETB respectivamente) ubicados en las CMLV y células endoteliales para inducir la contracción vascular o la vasodilatación [119]. La acción vasoconstrictora de ET-1 está mediada principalmente por ETA. La interacción ET-1-ETA en las CMLV aumenta el Ca^{2+} intracelular, lo que conduce a la fosforilación y activación de la cadena ligera de miosina, lo que provoca vasoconstricción (Figura 15) [120]. ET-1

induce vasoconstricción de larga duración como resultado de la tasa de disociación lenta de los receptores ET [121].

Se ha demostrado que la hipomagnesemia disminuye la proliferación de células endoteliales, estimula la adhesión de monocitos y potencia el desarrollo de disfunción endotelial a través de la activación de NF- κ B [76]. Sin embargo, estas modificaciones son el resultado de la privación de Mg^{2+} [122].

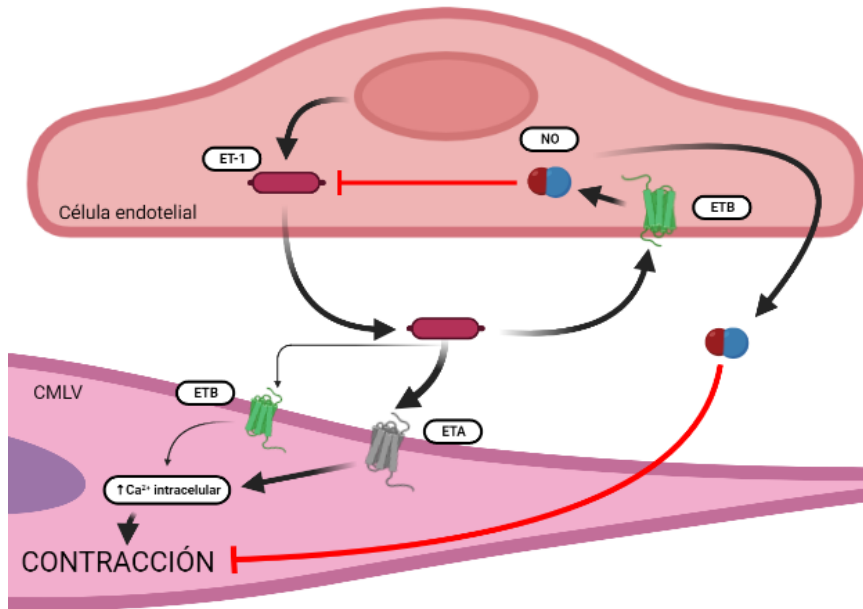


Figura 15. Señalización de ET-1 sobre sus receptores en la vasculatura. La ET-1 es producida y secretada por las células endoteliales. La ET-1 actúa de forma autocrina y paracrina sobre los receptores ETA y ETB. En las CMLV inducen la contracción mediante el aumento de entrada de Ca^{2+} .

El Mg^{2+} bajo causa disfunción endotelial al generar un entorno proinflamatorio, protrombótico y proaterogénico. Esto demuestra un efecto directo del Mg^{2+} en el mantenimiento de la función endotelial debido a su efecto protector contra la aterosclerosis y su papel en la promoción del crecimiento de vasos colaterales en la isquemia crónica. Así, el Mg^{2+} alto podría facilitar la re-endotelización de vasos dañados [122].

Estudios de metaanálisis y de ensayos clínicos controlados muestran una asociación inversa entre la ingesta de Mg^{2+} y el riesgo de eventos cardiovasculares como enfermedad coronaria, accidente cerebrovascular y mortalidad por enfermedad cardíaca [123, 124]. La baja ingesta de Mg^{2+} , lo que resulta en hipomagnesemia, es un factor de riesgo para la aterosclerosis, ya que la deficiencia de Mg^{2+}

conduce a la disfunción endotelial a través de la activación de NF- κ B, y la disfunción endotelial contribuye a la iniciación y progresión de las lesiones ateroscleróticas [85, 125]. La deficiencia de Mg^{2+} también aumenta la agregación plaquetaria, un evento que tiene un papel en la aterogénesis y la trombosis (Figura 16) [126].

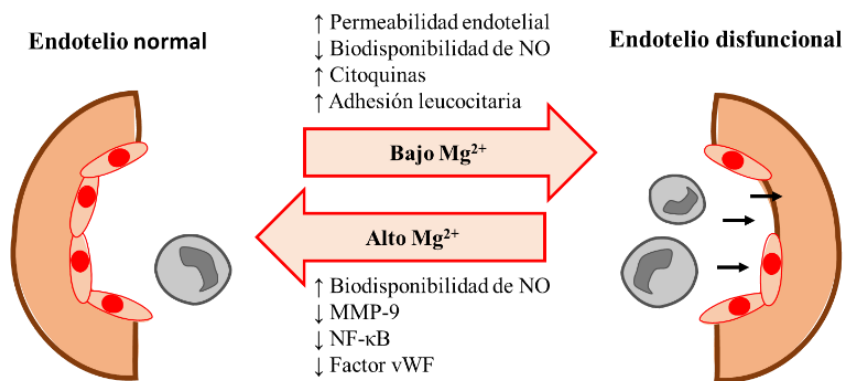


Figura 16. Efecto de la deficiencia de Mg^{2+} sobre el endotelio. Figura adaptada de Jeanette A.M.Maier. Endothelial cells and magnesium: implications in atherosclerosis. Clinical Science (2012) 122, 397-407.

Dado que esta Tesis tiene como uno de sus principales objetivos el estudio del efecto del suplemento de Mg^{2+} sobre la disfunción endotelial, para ello se han realizado experimentos *in vivo* empleando modelos animales de ERC.

4. INFLAMACIÓN y ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ERC

4.1. La inflamación en la ERC

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

El incremento de la inflamación es un proceso paralelo a la evolución de la ERC. La acumulación de toxinas y los desajustes del metabolismo mineral propios de la disfunción renal, la contaminación bacteriana del líquido de diálisis, el tipo de membrana y los catéteres venosos en la

diálisis estimulan también la producción de citoquinas proinflamatorias. Las principales fuentes de citoquinas inflamatorias son los monocitos circulantes y las células endoteliales. Esta liberación sostenida de citoquinas proinflamatorias agrava las complicaciones del paciente urémico.

Izquierdo y colaboradores propusieron que la inflamación sistémica o local a nivel renal produce un descenso en la expresión de Klotho que podría ser debido a la acción de citoquinas como TNF α y el inductor débil de la apoptosis relacionado con el TNF (TWEAK) y que esta regulación está mediada por la activación de NF- κ B [127]. Las alteraciones en el metabolismo mineral pueden ser también un estímulo adicional en la respuesta inflamatoria local [128]. A su vez, los estímulos inflamatorios pueden favorecer la mineralización de tejidos vasculares [129]. Estos datos ponen de manifiesto una posible asociación entre inflamación y alteración del metabolismo mineral.

En los pacientes con ERC las toxinas urémicas ejercen efectos proinflamatorios sobre monocitos/macrófagos. Dicho proceso adquiere un carácter crónico y contribuye a la disfunción endotelial y la mortalidad por ECV [130]. En general, entre un 30 y 50% de los enfermos renales tienen niveles elevados de marcadores inflamatorios en sangre, como PCR, ferritina, fibrinógeno, IL-6, IL-1 β , IL-8 (interleuquina 6 y 8 respectivamente), TNF α , molécula de adhesión de célula vascular 1 (VCAM-1) o ICAM-1 [131]. El incremento de estos marcadores pro-inflamatorios se ha vinculado a un aumento de la mortalidad por ECV en la población general y particularmente en pacientes con ERC [132]. En una cohorte de pacientes en hemodiálisis, altos niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α , en combinación con parámetros antiinflamatorios bajos (interleuquina 2, 4, 5 y 12 (IL-2, IL-4, IL-5, IL-12 respectivamente)), se asociaron con una disminución de la supervivencia [133].

No se conoce con exactitud qué factores inician el proceso inflamatorio en la ERC. En este sentido, las toxinas urémicas y los cambios en la composición del plasma y en la función endotelial, causados por el fallo renal, favorecen el daño vascular y juegan un importante papel en la estimulación temprana de la respuesta inflamatoria.

Asociada a la ERC se produce también dislipidemia que también puede contribuir al proceso inflamatorio [134]. Estos desequilibrios lipídicos alteran también la función endotelial y amplifican los efectos perniciosos de los mecanismos proinflamatorios [135]. Por otro lado, durante las primeras etapas de la ERC se observa un importante incremento de moléculas pro-inflamatorias y pro-osteogénicas en la pared vascular y en áreas de calcificación de la túnica media aórtica [136]. De hecho, varias líneas de evidencia indican que la inflamación desencadena y precede a la conversión osteogénica de CMLV, lo que promueve el proceso de calcificación. Se ha propuesto que la inflamación pudiera regular la CV, al menos en parte, a través de la activación de una vía de estrés del retículo

endoplásmico, que a su vez puede aumentar la captación de P inorgánico, lo que lleva a una mayor diferenciación osteogénica de las CMLV y una mayor deposición mineral [137]. La relación de inflamación vascular y calcificación será estudiada en esta tesis.

En los últimos veinte años, una gran cantidad de evidencia establecieron que la deficiencia de Mg^{2+} contribuye tanto al incremento de los procesos inflamatorios agudos como a la inflamación de bajo grado en las enfermedades crónicas. El nivel bajo de Mg^{2+} se acompaña de una elevación de 2 a 4 veces de los biomarcadores inflamatorios, y en particular de la PCR y la suplementación con Mg^{2+} los reduce. Estudios recientes también han indicado que la producción de citoquinas proinflamatorias inducida por la deficiencia de Mg^{2+} involucra NF- κ B, incluidos TNF α e IL-1 β [138, 139]. En esta tesis se valorará a nivel vascular el papel del suplemento de Mg^{2+} sobre la inflamación vascular asociada a la uremia.

La deficiencia de Mg^{2+} se relaciona con una mayor entrada de Ca^{2+} a través de canales de transporte lentos y una mayor liberación de Ca^{2+} procedente de los depósitos intracelulares como el retículo sarcoplásmico. Si el suplemento de Mg^{2+} puede inducir o no cambios vasculares que permitan reducir la inflamación, dislipemia e HTA será objeto de estudio en esta Tesis Doctoral. Otro elemento para estudiar en esta Tesis será la inflamación asociada a la ECV y ERC.

4.1.1. Citoquinas

Las citoquinas son proteínas mediadoras del sistema inmune que ejercen su efecto biológico a través de su unión con receptores específicos expresados en la superficie celular. Las citoquinas controlan diversas funciones fisiológicas como inflamación, respuesta inmune local y sistémica, diferenciación celular, maduración celular, reparación tisular, hematopoyesis, apoptosis y otros procesos biológicos. Son producidas principalmente por macrófagos activados y linfocitos, aunque también por otras células como leucocitos polimorfonucleares (PMN), CMLV, endoteliales, epiteliales, del tejido conjuntivo y adiposo. Como se ha comentado, las principales citoquinas alteradas en el entorno urémico inflamatorio son IL-1 β , IL-6 y TNF α . A continuación, se describen algunas de las principales citoquinas que se encuentran alteradas en la ERC y que son biomarcadores de riesgo cardiovascular.

4.1.1.1. IL-1 β

La IL-1 ejerce una variedad de efectos incluyendo la inducción de inflamación y de proteínas de fase aguda, aumento de la temperatura corporal y estimulación de la proliferación de células T y B. Aunque monocitos y macrófagos son los principales tipos celulares que la sintetizan, las células endoteliales también la producen [140]. Presenta dos formas biológicamente activas: la IL-1 α y la IL-1 β , que comparten una alta homología estructural y funcional [141]. En humanos, la IL-1 α es un regulador de eventos intracelulares y mediador de inflamación local, mientras que la IL-1 β se encuentra predominantemente en circulación y contribuye a la inflamación sistémica. Existen dos tipos de receptores de IL-1 (IL-1R): el receptor tipo I (IL-1RI) y el receptor tipo II (IL-1RII), los cuales comparten muchas características estructurales, además de la proteína accesoria del IL-1 (IL-1RacP), correceptor del IL-1R [140]. El efecto proaterogénico de la IL-1 se atribuye a su capacidad de participar en acontecimientos como la inflamación en la pared del vaso, la quimiotaxis de leucocitos y la expresión de factores que estimulan la proliferación de CMLV [142]. Tanto las MAPK como el NF- κ B están involucrados en las condiciones patológicas del riñón y son desencadenados por la IL-1 β . Por lo tanto, la IL-1 β juega un papel importante en las enfermedades renales al aumentar la señalización de MAPK y NF- κ B. Asimismo, IL-1 β y/o TNF α producen un aumento en la expresión de metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) durante la aterogénesis, lo que promueve la inestabilidad de la placa ateromatosa con el consecuente riesgo de trombosis, además de modular la adhesión celular y alterar la permeabilidad de la monocapa de células endoteliales promoviendo la infiltración de monocitos en el espacio subendotelial. En la DT2 la glucosa induce la producción de IL-1 β de la célula beta productora de insulina, y ésta a su vez induce a la célula beta a producir su propia IL-1 β promoviendo una disfunción endotelial presente en el SMet [143].

4.1.1.2. IL-6

La IL-6 es una glicoproteína producida fundamentalmente por numerosos tipos de células inmunes, como son monocitos, células mesoteliales, fibroblastos, adipocitos y linfocitos en respuesta a estímulos fisiológicos, tales como TNF α , IL1 β , endotoxinas y EO. Las CMLV también expresan IL-6. Los pacientes con ERC muestran altos niveles séricos de IL-6 [130]. Niveles elevados de IL-6 se han asociado también con la progresión de aterosclerosis en pacientes con ERC [144]. *In vitro*, la IL-6 disminuye la expresión de adiponectina, una adipoquina anti-aterogénica, promoviendo aún más la aterosclerosis [145]. También es una potente citoquina inflamatoria que juega un papel clave en la

patogenia de la resistencia a la insulina y la DT2 [146]. Además, estudios epidemiológicos han informado de concentraciones aumentadas de IL-6 en asociación con HTA y eventos cardiovasculares [147].

4.1.1.3. IL-8

La IL-8 es una citoquina liberada ante un estímulo inflamatorio, y actúa como mediadora de la respuesta innata del sistema inmune, capaz de amplificar dicha respuesta inflamatoria a nivel local y de estimular la angiogénesis. La IL-8 es un factor quimiotáctico que atrae a neutrófilos, basófilos y células T, aunque no a monocitos, y que es secretado por macrófagos, células epiteliales, células endoteliales, y también por CMLV. Pacientes en hemodiálisis presentan altos niveles de IL-8, así como de IL6 y TNF α , al compararlos con individuos normales [148]. Además, dicha citoquina aumenta aún más sus niveles séricos en pacientes con ERT, lo cual la convierte en un importante predictor de mortalidad cardiovascular en pacientes con ERT [149].

4.1.1.4. TNF α

TNF α es una proteína transmembrana que es sintetizada por diversos tipos celulares, pero fundamentalmente por macrófagos e interviene en enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide y la ERC [130]. La pérdida de función renal en la uremia afecta al aclaramiento de TNF α y es una de las principales causas del aumento de su actividad [150]. Es miembro de una familia de ligandos activadores de receptores cuya unión inicia señales de proliferación celular y apoptosis. TNF α sufre una escisión proteolítica a través de la enzima convertidora de TNF α (TACE) dando lugar a su forma soluble, la cual ejerce su función biológica a través de su unión con sus receptores específicos TNF-R1 y TNF-R2. Después de la liberación de la forma soluble de TNF α por TACE, el dominio intracelular residual del precursor migra hacia el núcleo de la célula, donde media la producción de citoquinas [151]. Una señalización lenta y continuada de TNF α da lugar a una inflamación crónica. Varios estudios han demostrado que TNF α es capaz de inducir estrés del retículo endoplásmico en CMLV, lo cual resulta en una captación acentuada de P que conlleva a una inducción de la calcificación. Asimismo, diversos autores han mostrado que la incubación de células vasculares calcificantes con concentraciones crecientes de TNF α conduce a un incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina y a la deposición mineral en las células de una manera dosis-dependiente, sugiriendo un papel del TNF α en el desarrollo de la CV [152]. Tintut y colaboradores comprobaron que la presencia de monocitos durante el cultivo de células vasculares calcificantes aumentaba la actividad

fosfatasa alcalina. Estos resultados sugieren que el aumento de calcificación en células vasculares inducida por monocitos se debe a la interacción intercelular y a la producción de factores solubles como el TNF α [153].

4.1.1.5. ICAM-1

ICAM-1 es una glicoproteína transmembrana de la superfamilia de inmunoglobulinas que se une a algunas proteínas de la familia de las integrinas promoviendo la adhesión celular en las reacciones inmunes e inflamatorias. La expresión de ICAM-1 se produce mayormente en células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos y en células de origen hematopoyético, como macrófagos y linfocitos, y en menor proporción en CMLV. Asimismo, ICAM-1 puede ser estimulada por lipopolisacáridos y por citoquinas, como son IFN γ , IL-1 β y TNF α . La unión ICAM-1/LFA-1 promueve el reclutamiento y la activación de eosinófilos, neutrófilos y linfocitos a través de una cascada de señales internas donde están implicadas gran número de quinasas, lo que representa un importante factor en la fisiopatología de las enfermedades vasculares [154]. Entre el 30 y el 50% de pacientes con ERC presentan niveles elevados de ICAM-1 [155].

4.2. Estrés oxidativo

El EO se define como un estado de desequilibrio entre la formación/producción de EROs y su degradación insuficiente de esos radicales por los sistemas antioxidantes. Estos incluyen radicales de oxígeno y peróxidos, como superóxido (O_2^-) y especies de radicales de nitrógeno, como NO y dióxido de nitrógeno (NO_2), y otras especies, como peroxinitrito ($ONOO^-$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e hipoclorito (ClO^-). Las EROs no son necesariamente dañinas para las células. En concentraciones moderadas, las EROs actúan como segundos mensajeros y regulan las vías de transducción de señales intracelulares. En condiciones normales, las EROs se producen en condiciones fisiológicas en las células (en el interior de la mitocondria) durante la respiración aeróbica mediante la reducción del oxígeno y se eliminan mediante varios mecanismos de defensa antioxidantes debido a que forman parte del sistema de defensa no específico del organismo [156]. Sin embargo, en caso de un desequilibrio en el estado prooxidante/antioxidante, los niveles excesivos de EROs pueden producir daño celular mediante la interacción con biomoléculas (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) y, por lo tanto, tener efectos negativos sobre la función y estructura de los tejidos, estando implicados en diferentes situaciones patológicas y enfermedades. En el mantenimiento del equilibrio redox también juegan un papel muy importante moléculas antioxidantes exógenas, adquiridas fundamentalmente con la dieta

[157]. Varias enfermedades crónicas asociadas con la inflamación, incluida la ERC, ECV y la diabetes mellitus se caracterizan por una producción excesiva de EROs.

El riñón es un órgano altamente energético. Esto lo hace más vulnerable a los daños causados por el EO [158, 159]. El vínculo "oxidativo" entre la ERC y sus complicaciones se logra a través de varios mecanismos, como el desacoplamiento de la eNOS y el aumento de la actividad de la NADPH oxidasa (NOX), además de pérdidas de antioxidantes debido a restricciones dietéticas, uso de diuréticos, pérdida de energía proteica y/o disminución de la absorción intestinal [160, 161].

Se especula que los niveles de EROs aumentan de forma gradual a medida que la función renal se deteriora. La patogenia del EO en la ERC es obviamente multifactorial e incluye diferentes causas. A medida que progresa el deterioro de la función renal se acumulan también en el organismo una serie de moléculas que denominamos toxinas urémicas. Vanholder y cols han descrito una serie de estas toxinas que contribuirían al daño vascular y renal [162]. Estas sustancias retenidas pueden comportarse como sustrato de posteriores modificaciones oxidativas en un medio urémico, motivo por el que alguna de ellas vería aumentada su toxicidad.

No está claro si la defensa antioxidante en el paciente urémico se encuentra alterada o es la sobreproducción de EROs lo que conlleva al desequilibrio existente entre ambos en el paciente renal. La ERC y su tratamiento mediante hemodiálisis son estados netamente pro-oxidantes, donde aumenta la producción de elementos oxidantes y disminuyen las sustancias antioxidantes de bajo peso molecular [163].

La tríada EO, inflamación crónica y disfunción endotelial como un sello distintivo de la ERC, mantienen y perpetúan el círculo vicioso donde el daño renal crónico promueve una mayor lesión renal y el desarrollo de las complicaciones sistémicas de la ERC y, en particular, de la disfunción cardiovascular [164, 165].

La deficiencia de Mg^{2+} se ha asociado con EO en insuficiencia cardiaca (IC), diabetes mellitus, obesidad e HTA [166, 167]. Además de la asociación entre la deficiencia de Mg^{2+} y el EO mitocondrial, distintos trabajos han demostrado correlaciones entre la deficiencia de Mg^{2+} y otras fuentes de EROs. Se encontró que la deficiencia de Mg^{2+} interfiere con la liberación de NO del endotelio coronario [168]. La deficiencia de Mg^{2+} da como resultado la activación de eNOS, así como la reducción del Mg^{2+} sérico y el glutatión tisular en todas las cámaras del corazón [169]. La deficiencia de Mg^{2+} también provoca un aumento de la actividad de la NOX inducida por la disminución de ATP [170].

Estudios en animales muestran que la deficiencia de Mg^{2+} mejora el reclutamiento de células fagocíticas para realizar sus funciones efectoras, lo que finalmente conduce a la generación de EROs [171]. La producción excesiva o crónica de EROs, que afecta patológicamente al tejido, es una de las razones por las que el estrés inflamatorio se considera un factor de riesgo para numerosas enfermedades crónicas.

En este sentido, en esta Tesis se valorará el posible efecto del Mg^{2+} sobre el EO a nivel vascular.

4.2.1. Síndrome Metabólico en la ERC

El SMet es un grupo de anomalías metabólicas que incluye HTA, obesidad central, resistencia a la insulina y dislipidemia aterogénica. El SMet está fuertemente asociado con un mayor riesgo de desarrollar ECV aterosclerótica. La patogenia de SMet involucra factores tanto genéticos como adquiridos que juegan un papel en la vía final de inflamación que conduce a ECV. El SMet ha cobrado una relevancia creciente en los últimos tiempos debido al aumento exponencial de la obesidad en todo el mundo. El SMet está estrechamente relacionado con la diabetes y la ECV y es un factor de riesgo importante para la mortalidad de los pacientes.

El SMet es más frecuente en adultos con una edad superior a 40 años, con un riesgo tres veces mayor que en adultos de 20 a 39 años. Se desconoce si este aumento está relacionado con el envejecimiento *per se* o con cambios en la composición corporal (por ejemplo, un aumento en el contenido de grasa corporal y una reducción en la masa muscular). Algunos autores reportan que, independientemente del contenido de grasa corporal, el SMet es más común en hombres que en mujeres por los factores hormonales implicados (andrógenos).

Entre los factores de riesgo para el SMet se incluyen: la obesidad (especialmente la obesidad abdominal), la inactividad física, el envejecimiento, la resistencia a la insulina, la disfunción del tejido adiposo, la inflamación crónica, el EO, la interrupción circadiana, la microbiota, la predisposición genética, etc. Se postula que la resistencia a la insulina y la obesidad abdominal son los componentes más importantes. El origen de todos esos trastornos metabólicos puede explicarse por un estado proinflamatorio crónico derivado de una excesiva ingesta calórica y la sobrenutrición, con la participación, tal vez, de otras afecciones inflamatorias crónicas. Esta hipótesis sostiene que este estado proinflamatorio induce resistencia a la insulina y EO, siendo este el componente común en el desarrollo del SMet.

Estudios prospectivos indicaron que los factores de riesgo del SMet se asocian más plausiblemente con el riesgo de desarrollar ERC [172]. En un estudio de corte transversal de una cohorte del NHANES III (Third National Health and Nutrition Examination Survey) en EE. UU, Chen et al. demostraron una asociación significativa entre el SMet y la presencia de daño renal crónico (tasa de filtración glomerular <60 ml/min/1,73m²) [173]. La evidencia actual sugiere que el SMet actúa sinérgicamente aumentando el riesgo de daño renal. Sin embargo, aún no está claro qué componentes tendrían un mayor valor predictivo en la aparición de la enfermedad renal. Es conocido que la prevalencia de microalbuminuria y/o disminución de la velocidad de filtración glomerular aumenta progresivamente al incrementarse el número de factores de riesgo del SMet [174].

Se ha demostrado que el SMet es un estado proinflamatorio y protrombótico en cuyo desarrollo es clave la alteración del tejido adiposo [175]. Hoy día, se considera al tejido adiposo como un órgano endocrino y paracrino biológicamente activo. Los adipocitos experimentan hipertrofia e hiperplasia en respuesta al exceso nutricional que induce un estado hipóxico en las células al incrementar la cantidad necesaria de oxígeno [176]. La hipoxia puede provocar necrosis celular con infiltración de macrófagos, producción de adipocitoquinas, así como de IL-6 y TNF α . Se ha demostrado la presencia de niveles elevados de IL-6 en tejido adiposo de pacientes con diabetes mellitus y obesidad y también, en particular, en pacientes con criterios de SMet. El exceso de TNF α es un mediador de afecciones cardiovasculares como la aterosclerosis o la insuficiencia cardíaca. Se ha reportado que actúa como mediador paracrino para reducir la resistencia a la insulina en los adipocitos [177]. El mecanismo por el cual se produce la desregulación de los adipocitos no se comprende claramente, pero se postula un papel del EO inducido por la obesidad. En estudios en humanos y en animales se ha encontrado una correlación positiva entre la acumulación de grasa y el EO, con producción de EROs y una mayor expresión de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa con una disminución concomitante de la expresión de enzimas antioxidantes [178]. En pacientes con SMet, marcadores de un estado prooxidante, como la oxLDL o el ácido úrico están elevados y la actividad de enzimas antioxidantes disminuida, lo que permite que oxLDL y las EROs activen una cascada oxidativa que promueve la apoptosis y el daño celular.

El conjunto de condiciones patológicas presente en el SMet aumenta el riesgo de trastorno por daño aterogénico o aterosclerosis. La aterosclerosis se caracteriza por la acumulación de lípidos y leucocitos en los vasos sanguíneos, lo que conduce a la formación de placa en la capa íntima subendotelial de las arterias de tamaño mediano y grande. Con el tiempo la placa se endurece, lo que provoca el estrechamiento de las arterias y la disminución del flujo de sangre. Posteriormente, las placas

crecen debido a la proliferación de tejidos fibrosos y el músculo liso circundante, lo que produce un abultamiento dentro de las arterias y, en consecuencia, una reducción del flujo sanguíneo. La producción de tejido conjuntivo por parte de los fibroblastos y el depósito de Ca^{2+} en la lesión provoca esclerosis o endurecimiento de las arterias. Finalmente, la superficie irregular de las arterias da como resultado la formación de coágulos y trombosis, lo que conduce a la obstrucción repentina del flujo sanguíneo.

Los niveles de colesterol plasmático, LDL y apolipoproteínas están altamente correlacionados con la aterosclerosis clínica. Además, la aterosclerosis se acompaña de una respuesta inflamatoria crónica de bajo grado que atrae células del sistema inmunitario innato y adaptativo hacia la placa aterosclerótica, algunas de las cuales reconocen a la apolipoproteína B (ApoB), la proteína central de las partículas LDL. En la íntima, el LDL sufre modificaciones oxidativas por EROs que promueven la captación de oxLDL en macrófagos. Así, la aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica con un componente autoinmune. Además, los fosfolípidos oxidados *per se* desencadenan la inflamación de la pared arterial al unirse a los receptores tipo Toll (TLR), un grupo de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) ampliamente expresados que causan señalización proinflamatoria. La respuesta inmunitaria promueve el aumento de expresión de moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1), que se acompaña con la infiltración de células del sistema inmune adaptativo.

Respecto a la relación del SMet con el Mg^{2+} , objetivo que será analizado en esta Tesis, existen estudios de metaanálisis que muestran una asociación inversa entre la ingesta de Mg^{2+} y el SMet y la diabetes [179]. Con base en ocho estudios de cohortes transversales y dos prospectivos, la metarregresión indicó que la ingesta de Mg^{2+} en la dieta está significativa e inversamente asociada con el riesgo de SMet [180]. La concentración sérica de Mg^{2+} no solo se asoció negativamente con la diabetes, sino también con la glucosa sérica, la insulina sérica, la hemoglobina A1c y el índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) [181].

4.2.2. Hipertensión

La HTA es otro proceso patológico frecuentemente observado en el SMet. Se trata de una condición importante para el diagnóstico del SMet debido al aumento de AngII o la pérdida del efecto vasodilatador de la insulina en los vasos entre otros [182, 183]. La HTA es un trastorno generalizado con alta prevalencia que afecta a una población heterogénea de pacientes. A nivel mundial, una quinta parte de la población adulta es hipertensa y la prevalencia en mayores de 60 años alcanza el 50. La

HTA se define como un valor de PA sostenido de 140/90 mm mercurio (Hg) o superior [184]. Cuando su etiología es desconocida, lo cual ocurre en el 90% de los casos, se clasifica como HTA esencial o primaria [185].

La asociación entre HTA y ERC es un hecho ampliamente documentado en la bibliografía. Son estados fisiopatológicos estrechamente interrelacionados, de modo que la HTA sostenida puede conducir al empeoramiento de la función renal y, por el contrario, la disminución progresiva de la función renal puede conducir al empeoramiento del control de la PA. La fisiopatología de la HTA en la ERC es compleja y es una secuela de múltiples factores, que incluyen la reducción de la masa de nefronas, el aumento de la retención de Na^+ y la expansión del volumen extracelular, la hiperactividad del sistema nervioso simpático, la activación de hormonas, incluido el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), y la disfunción endotelial. Aunque el riesgo relativo de daño renal grave en pacientes con HTA esencial no complicada es bajo, la HTA se mantiene como la segunda causa principal de ERT después de la diabetes [186]. Además, la microalbuminuria, la disfunción cognitiva y el daño sutil de los órganos diana, como la hipertrofia del ventrículo izquierdo, tiene lugar de forma temprana en el curso de la HTA y puede pasar desapercibido hasta que se produzcan complicaciones importantes.

Uno de los mecanismos por los cuales el Mg^{2+} reduce la PA es actuando como un bloqueador natural de los canales de Ca^{2+} . El Mg^{2+} compite con el Ca^{2+} por los sitios de unión en las CMLV, aumenta la prostaglandina E, se une al K de manera cooperativa, induce vasodilatación dependiente del endotelio, mejora la disfunción endotelial en pacientes hipertensos y diabéticos, disminuye el Ca^{2+} y el Na^+ intracelulares y reduce la PA (Figura 17) [187].

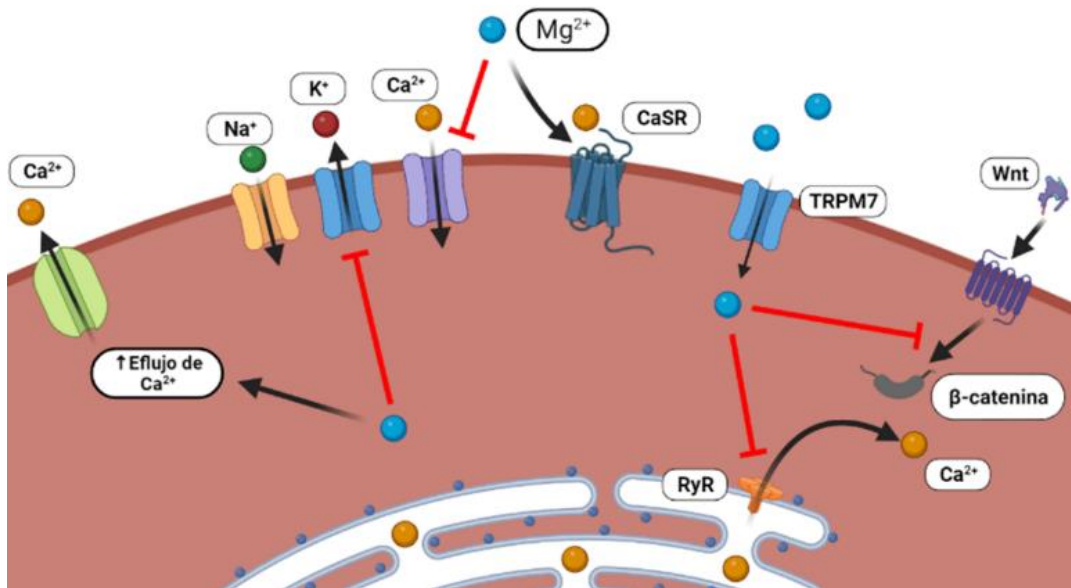


Figura 17. Efecto del Mg^{2+} sobre el tono vascular en CMLV. El Mg^{2+} es un antagonista natural del Ca^{2+} mediante su unión al $CaSR$, inhibiendo la entrada de Ca^{2+} al interior celular y su salida del retículo endoplásmico, además de promover su salida al exterior. También es capaz de inhibir la ruta Wnt/β -catenina.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

5. Hipótesis

Nuestra hipótesis de trabajo establece que puede existir una asociación entre algunas alteraciones del metabolismo mineral, relacionadas con los niveles de P, Mg²⁺, FGF23/Klotho y Vit D, y el inicio y progresión de la disfunción vascular y la inflamación. Asimismo, pensamos que una intervención dietética rica en Mg²⁺ puede modular favorablemente estos parámetros del metabolismo mineral y, por tanto, resultar en un efecto protector. Los resultados de este estudio pueden contribuir a considerar dichos parámetros del metabolismo mineral (y al Mg²⁺ en particular) como factores de riesgo cardiovascular asociados a la disfunción vascular, ofreciendo nuevas herramientas para la intervención y/o prevención de las ECV.

6. Objetivos

El Objetivo General de esta tesis fue determinar, a través de estudios *in vivo* e *in vitro*, si existe una asociación entre los parámetros del metabolismo mineral (en particular el Mg²⁺) y la disfunción vascular, con la intención de identificar factores de riesgo que puedan ser de utilidad en su prevención y/o paliación, así como valorar el papel de una dieta rica en Mg²⁺ en dicha asociación. Este Objetivo General se abordó mediante los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar, *in vitro*, en cultivos de CMLV, el efecto directo de la adición de Mg²⁺ sobre los procesos de inflamación y EO inducidos por niveles elevados de P.
- Evaluar *in vivo*, en un modelo de ratas con ERC, el efecto de la administración de un suplemento de Mg²⁺ en la dieta sobre la prevención de la inflamación y el EO.
- Evaluar *in vivo*, en un modelo experimental de SMet (ratas Zucker) y ERC, el efecto de las alteraciones específicas de algunos parámetros clave del metabolismo mineral (P, Mg²⁺ y FGF23/Klotho) sobre la función vascular y la influencia del suplemento de Mg²⁺ en la dieta.

MATERIAL Y MÉTODOS



MATERIAL Y MÉTODOS

7. ESTUDIOS *IN VITRO*

7.1. Cultivo celular de CMLV

Se realizaron cultivos de CMLV provenientes de aorta humana (Clonetics- Lonza Walkersville, Inc., EE. UU.). Las células cultivadas se mantuvieron en un incubador de células en condiciones de 37°C con un 5 % de CO₂ (dióxido de carbono) y un 90 % de humedad. Las células fueron usadas entre los pases 3 y 6 y el medio se cambió en días alternos. El medio utilizado para la expansión y crecimiento de las CMLV fue SmBM (medio basal de células del músculo liso), suplementado con SmGM-2 SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factors (Clonetics- Lonza Walkersville, Inc., EE. UU.), el cual contiene: factor de crecimiento epidérmico recombinante humano (hEGF), insulina, factor de crecimiento de fibroblastos básico humano (hFGF-B), gentamicina y anfotericina-B. Además, el medio fue suplementado con un 20% de suero fetal bovino (FBS) (TicoEurope, Amstelveen, Países Bajos). Las células fueron cultivadas en frascos de 75 cm² (Becton Dickinson Labware, NJ, EE. UU) y tras alcanzar el 90 % de confluencia, fueron subcultivadas de la siguiente manera: se retiró el medio de cultivo y las células adheridas al frasco fueron lavadas 2 veces con suero fisiológico (SF). Posteriormente, las células se despegaron añadiendo al frasco 3 ml de una solución de Tripsina/EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (Sigma Aldrich Inc, MO, EE. UU) e incubando durante 5 minutos a 37°C. Transcurrido este período de incubación, se añadió medio de cultivo con FBS para inhibir la acción de la tripsina. A continuación, la suspensión celular fue centrifugada a 400 g durante 10 minutos y a 4°C. El pellet fue resuspendido en medio de cultivo, y se extrajo una alícuota para contar el número de células. Una vez contadas, se sembraron y cultivaron en placas de 6 (Nunc, Dinamarca) y 96 pocillos (Greiner Bio-One, Alemania), ambas a una densidad de 10.000 células/cm². Para la realización de los experimentos, las células se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma Aldrich Inc, MO, EE. UU) suplementado con un 20% de FBS (BioWhittaker), piruvato sódico (1 mM), glutamina (4,5 g/L), penicilina (100 U/mL), estreptomina (100 µg/mL) y HEPES (ácido 4-(2-hidroxiethyl) piperazin-1-iletanosulfónico) (20 mM) (todos los reactivos procedieron de Sigma Aldrich Inc; MO, EE. UU).

7.2. Diseño y tratamientos experimentales

Los experimentos se realizaron una vez las células alcanzaron el 90% de confluencia. Para realizar los experimentos, las células se cultivaron en medio de cultivo DMEM suplementado con 20% de FBS (TicoEurope, Amstelveen, Países Bajos). El medio contiene niveles fisiológicos de P (0,9 mM) y Mg^{2+} (0,8 mM). Para promover condiciones pro-inflamatorias el medio se suplementó con P a 3,3 mM. Las condiciones experimentales se muestran en la Figura 18.

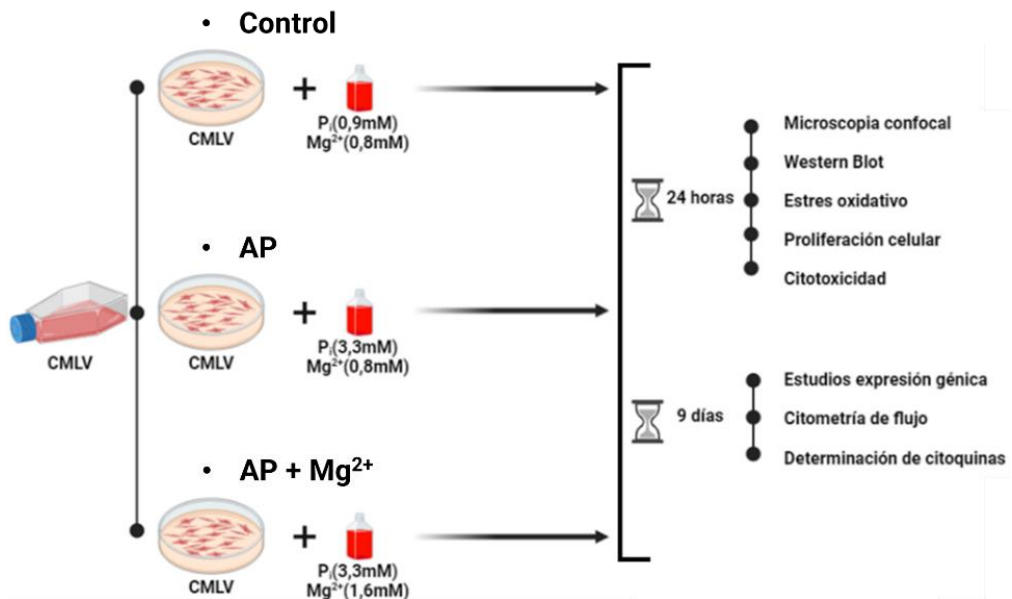


Figura 18. Representación del diseño experimental *in vitro*.

- Grupo control: Medio con P y Mg^{2+} normal a concentraciones de 0,9 y 0,8 mM, respectivamente.
- Grupo AP (alto P): Medio con alto contenido en $Na_2HPO_4^{3-}$ (fosfato dibásico) y $NaH_2PO_4^{3-}$ (fosfato monobásico) en proporción 1:2 (Sodium Phosphate, Sigma-Aldrich Inc., MO, EE. UU.) para obtener una concentración final de P de 3,3 mM y normal de Mg^{2+} (0,8 mM)
- Grupo AP + Mg^{2+} : Medio con alto P (3,3mM) y Mg^{2+} elevado (1,6 mM), suplementado con cloruro de Mg^{2+} ($MgCl_2$).

Se realizaron cultivos de 24 horas para valorar los niveles de EO, proliferación, muerte celular y la activación de la ruta NF- κ B mediante Western Blot y microscopía confocal en estas condiciones

experimentales. Así mismo, se realizaron otros cultivos de 9 días de duración en las mismas condiciones para cuantificar la expresión génica de marcadores inflamatorios y los niveles de citoquinas secretadas y de ICAM-1 en la superficie celular mediante Bio-Plex y citometría de flujo, respectivamente (Figura 18).

7.3. Determinación de la expresión génica de marcadores inflamatorios mediante RT-PCR

Una vez transcurridos los 9 días de tratamiento, el medio fue retirado y las células lavadas 2 veces con SF. A continuación, se añadió a cada pocillo 1 ml de TriReagent (Sigma Aldrich Inc, St. Louis, MO, EE. UU) para recoger y lisar las células. Seguidamente, las células fueron resuspendidas con una pipeta y la suspensión celular colocada en un vial eppendorf de 1,5 ml. Las muestras se agitaron con vortex durante 10-15 segundos y posteriormente se congelaron a -80°C hasta su utilización.

7.3.1. Extracción del ARN

La extracción de ARN se llevó a cabo siguiendo el método de Chomczynski y Sacchi [188]. En primer lugar, los homogenados celulares se dejaron reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir así la disociación completa de nucleoproteínas. Tras este tiempo se añadieron 200 µl de cloroformo, se agitaron las muestras con el vortex y se centrifugaron a 15900 g durante 15 minutos a 4°C. Tras la centrifugación, la fase superior acuosa de cada una de las muestras (que contenía el ARN) fue recogida y transferida a otro vial con 500 µl de isopropanol frío por mililitro de TriReagent, con el fin de precipitar el ARN. Después, se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos y más tarde se centrifugaron a 15900 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se retiró y el pellet de ARN se lavó con 1 ml de etanol 70%. Tras una centrifugación a 15900 g durante 5 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió con 50 µl de agua libre de nucleasas y agitación a 60°C durante 5 minutos.

7.3.2. Cuantificación del ARN

La concentración de las muestras de ARN fue cuantificada mediante espectrofotometría usando un NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE. UU). Se tomaron las siguientes lecturas de absorbancia:

- Absorbancia a 260 nm: usada para determinar la concentración de ARN en nuestra muestra frente a un blanco que contiene el mismo solvente utilizado para disolver el ARN (siendo en este caso agua libre de ARN-ADN). En este método una unidad de 260 nm corresponde a 40 µg/mL de ARN monocatenario.
- Ratio 260/280: 260 nm y 280 nm son las longitudes de onda de absorbancia utilizadas para evaluar la pureza del ARN. Una proporción de ~2,0 en este ratio se considera como un ARN de elevada pureza y escasa contaminación. Una relación de absorbancia más baja puede indicar la presencia de proteína, fenol u otros contaminantes que tienen una absorbancia cercana a los 280 nm.
- Ratio 230/260: la relación de absorbancia a 260 y 230 nm se puede utilizar como medida secundaria de la pureza del ARN. En este caso, una relación entre 2,0 y 2,2 se considera de elevada pureza. Si la relación es inferior a este rango esperado, puede indicar contaminantes en la muestra que absorben a 230 nm.

7.3.3. Tratamiento con DNasa

La posible contaminación de ADN genómico del ARN total extraído con Trizol fue eliminada mediante un tratamiento con DNasa, enzima que digiere fragmentos de ADN. Para ello se utilizó un kit comercial de Sigma- Aldrich. Se empleó 1 µl de DNasa (desoxirribonucleasa) para tratar 1 µg de ARN, en una mezcla de reacción del kit que además contenía 1 µl de tampón de reacción 10X. Se completó hasta un volumen de 10 µl con agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añadió a la reacción 1 µl de solución de parada y se dejó incubar durante 10 minutos a 70° C en un termobloque.

7.3.4. RT-PCR a tiempo real

La expresión génica de marcadores inflamatorios se determinó mediante RT-PCR cuantitativa, descrita a continuación. Dicha técnica permite la amplificación específica de una pequeña cantidad de moléculas de ARNm, primero mediante una retrotranscripción (RT) del ARN y sintetizando así ADN complementario (ADNc) monocatenario y posteriormente amplificando dicho ADNc en sucesivos ciclos de PCR. Se empleó el kit SYBR No- Rox SensiFastM de un solo paso (Bioline, Tauton, MA, EE. UU) en un dispositivo Light Cycler (LC480, Roche Diagnostic, Indianapolis, IN, EE. UU). El fluorocromo usado para la cuantificación fue SYBR Green I, que se une preferentemente a ADN de doble cadena. La unión induce la emisión de una fluorescencia proporcional a la concentración de ADN sintetizado, pudiendo visualizar de forma continua y monitorizada la amplificación. La señal aparece a partir de un número determinado de ciclos, dependiendo de la concentración de partida de las muestras y de la eficiencia de los cebadores.

Para la normalización de la expresión de los genes de interés se usó un gen constitutivo. Este gen codifica para una proteína no inducible y por tanto de expresión constante y que se expresa en todas o la mayoría de las estirpes celulares. El gen constitutivo usado fue la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Cada dato de los grupos analizados se expresó como veces de cambio respecto a los valores del grupo control. Los genes marcadores de inflamación estudiados y el gen constitutivo se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Cebadores usados para la RT-PCR cuantitativa.

GEN	CEBADOR SENTIDO	CEBADOR ANTISENTIDO
GAPDH	5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3'	5'-TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT-3'
ICAM-1	5'-GGGGAACCAGAGCCAGGAGACACT-3'	5'-TGGGCCTCACACTTCACTGTCACC-3'
IL-1β	5'-CAGGATATGGAGCAACAAGTGGTG-3'	5'-GGGTAATTTTTGGGATCTACACTC-3'
IL-6	5'-GCCCCACACAGACAGCCACTCACC-3'	5'-TGCCCTTTTGTGCTTTTACACAT-3'
IL-8	5'-GGTGCAGAGGGTTGTGGAGAAGTT-3'	5'-CATGAAGTGTGAAGTAGATTTGC-3'
TNFα	5'-CTTGTTCCTCAGCCTCTTCTCCTTCC-3'	5'-AAGATGATCTGACTGCCTGGGCCAG-3'

7.4. Citometría de flujo

Para los estudios de citometría de flujo, las CMLV fueron cultivadas en placas de 6 pocillos. Cuando alcanzaron la confluencia se sometieron a las diferentes condiciones experimentales descritas anteriormente en la Figura 18. Tras el período experimental, el medio de cultivo se retiró por aspiración y las células se lavaron con SF. Las células se levantaron con 400 µl por pocillo de solución de tripsina-EDTA a 37 °C durante aproximadamente 5 min en incubador. Cuando se completó la tripsinización, su efecto se neutralizó añadiendo a la suspensión celular 1ml de medio de cultivo complementado con FBS. Las células resuspendidas se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos a 4°C. Luego, las células se lavaron dos veces con SF. El sedimento celular se resuspendió en 300 µl de suero fisiológico y se marcó ICAM-1 mediante incubación en hielo durante 30 minutos con un anticuerpo monoclonal específico conjugado con el fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC) contra CD54 humano (ICAM-1) (Invitrogen, EE. UU). Seguidamente se añadió tampón fosfato salino (PBS) para eliminar el exceso de anticuerpo y las células se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 300 µl de SF. El marcaje se analizó utilizando un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU) equipado con el software CellQuest (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EE. UU), en el que se adquirieron 10⁴ células. Se usó IgG1-FITC de ratón (BD Biosciences, CA, EE. UU.) como control negativo. El porcentaje de células positivas para el anticuerpo CD54 se determinó por el porcentaje de células que superan el umbral obtenido con anticuerpos no específicos.

7.5. Determinación de citoquinas inflamatorias por Bio-Plex

Una vez transcurrido el periodo de experimentación (9 días), los sobrenadantes de las CMLV tratadas con P ó P+Mg²⁺ tal y como se detalla en la Figura 18 fueron recogidos para determinar la secreción de citoquinas inflamatorias (IL-1β, IL-6, IL-8 y TNFα). La concentración de citoquinas se determinó mediante el kit Bio-Plex Pro Human Cytokine 4-Plex (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU) de acuerdo con las instrucciones de uso del producto. El principio del ensayo de Bio-Plex es similar al ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay): la unión covalente de los anticuerpos de captura con microesferas magnéticas permite que sean inmovilizados después de ser incubados con las muestras que contienen los marcadores de interés. A continuación, se agregan los anticuerpos biotinilados para crear un complejo sándwich el cual es detectado finalmente por la adición de ficoeritrina-estreptavidina (SA-PE) conjugada, que sirve como

marcador fluorescente. Para evitar perder las microesferas magnéticas durante los lavados, la placa de 96 pocillos del kit se colocó en una placa magnética durante 1 minuto. La metodología fue la siguiente:

- Tras agitar las microesferas diluidas (1X), se añadieron 50 μ l a cada pocillo a usar y se lavó la placa dos veces con 100 μ l de tampón de lavado mediante el uso de la placa magnética.
- Posteriormente se transfirieron a cada pocillo 50 μ l de las muestras experimentales, así como de los estándares previamente preparados, el blanco y los controles. Realizado esto la placa se incubó 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador de placa a 16 g.
- Transcurridos 30 minutos, la placa se lavó (3 x 100 μ l) usando la placa magnética para evitar la pérdida de las microesferas. A continuación, se añadieron 25 μ l de los anticuerpos de detección diluidos (1X) preparados 10 minutos antes de su uso y se incubó la placa 30 minutos a temperatura ambiente protegiéndola de la luz.
- Tras la incubación con los anticuerpos, se volvió a lavar la placa (3 x 100 μ l) con la placa magnética. Diez minutos previos al uso, se preparó la SA-PE diluida (1X) y se añadieron 50 μ l a los pocillos usados. Una vez hecho esto, la placa se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, agitación y a 16 g.
- Tras descartar la SA-PE de los pocillos y lavada la placa (3 x 100 μ l), las microesferas se resuspendieron en 125 μ l de tampón de ensayo, la placa se cubrió y se volvió a agitar 30 segundos a 16 g y temperatura ambiente.
- La placa fue introducida en un Bio-Plex 200 System y los resultados fueron analizados mediante Bio-Plex Manager Software.

7.6. Mecanismos intracelulares: implicación de la vía de señalización NF- κ B

El estudio de la activación de la vía intracelular NF- κ B se llevó a cabo mediante Western Blot y microscopía confocal. Para la realización del Western Blot se realizaron los siguientes pasos:

7.6.1. Extracción de proteínas

Tras los tratamientos experimentales de 24 horas, se extrajeron las fracciones citosólica y nuclear de proteína. Para ello, las células se lavaron dos veces con SF y se incubaron en 150 μ l de buffer A de lisis de baja fuerza iónica para la extracción de proteína citoplasmática (pH 7,9 con 10 mM

HEPES, 10 mM KCl (cloruro de potasio), 0,1 mM EGTA (ácido egtazico), 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT (Ditiotreitol), 0,5 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), 70 mg/mL de Protease Inhibitor Cocktail, 0,5% Igepal CA-360) (todos los reactivos procedieron de Sigma-Aldrich). La suspensión se centrifugó a 15900 *g* durante 3 minutos a 4°C. El sobrenadante, que correspondió con la fracción citosólica, se recogió y almacenó a -80°C. Posteriormente, para obtener los extractos nucleares, se empleó un Buffer B de lisis de alta fuerza iónica (pH 7,9 con 20 mM HEPES, 0,4 mM NaCl (cloruro sódico), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 mM DTT, 1 mM PMSF, 46 mg/mL Protease Inhibitor Coctkail). Los pellets se incubaron en 20 μ l de buffer B durante 15 minutos y posteriormente se centrifugaron a 15900 *g* durante 5 minutos y a 4°C. El sobrenadante resultante (fracción nuclear) fue recogido y almacenado a -80°C hasta su uso.

7.6.2. Cuantificación de las proteínas

La concentración de proteína fue determinada mediante la técnica de Bradford, utilizando el colorante de BioRad Laboratories (Hercules, CA, EE. UU). La cuantificación mediante este método de Bradford se basa en la cuantificación de la unión de un colorante, el Azul de Coomassie G-250, a la proteína, comparando esta unión con la de concentraciones conocidas de una proteína estándar (albúmina de suero bovino, (BSA) Sigma). Dicho colorante, en presencia de proteínas en medio ácido, pasa de una coloración anaranjada a una tonalidad azulada. Este cambio de coloración se cuantifica midiendo su absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. El protocolo se describe a continuación:

- Elaboración de la recta patrón: preparación de diluciones seriadas de una solución estándar de BSA, que abarca concentraciones de entre 0,5 a 25 μ g/ μ l.
- Preparación de las muestras: 50 μ l de NaOH (hidróxido de sodio) 1N + 2 μ l del extracto citoplásmico o nuclear + 748 μ l de agua destilada.
- Adición de 200 μ l del reactivo Bradford a cada tubo y mezcla mediante vórtex.
- Incubación a temperatura ambiente durante 15 min.
- Medida de la absorbancia a 595 nm en un lector de placas (Biotek Power Wave XS, EE. UU).
- Cuantificación de la concentración de proteína de cada muestra: se calculó la ecuación de la recta patrón obtenida mediante una recta de regresión a partir de los valores de absorbancia de las diluciones de la curva estándar. Dicha ecuación se usó para calcular las concentraciones de las muestras en base a su absorbancia.

7.6.3. Western blot

7.6.3.1. Preparación de las muestras y electroforesis

Para realizar el western blot se emplearon 25 µg de proteína, a los que se añadió el buffer de carga comercial (Invitrogen, CA, EE. UU). Las muestras se incubaron a 70°C durante 10 min para desnaturalizar las proteínas. Después, se cargaron en un gel de poliacrilamida, con un gradiente de concentración de 4 a 20% (BioRad, EE. UU). La electroforesis se llevó a cabo a 120 V y 80 mA en running buffer (pH 8,3 Tris-Base 25 mM, SDS (dodecilsulfato sódico) 3,5 mM, glicina 192 mM) durante aproximadamente 90 minutos.

7.6.3.2. Transferencia de proteínas

Tras la electroforesis, las muestras se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm pre-humedecidas (Midi format 0,2 µm nitrocellulose single application; BioRad; EE. UU) en un sistema de transferencia semiseco (Bio-Rad, Munich, Alemania) durante 30 minutos, a amperaje constante de 1A y con un voltaje no superior a 25 V. Posteriormente, la tinción con rojo *Ponceau S* al 0,1 % (Sigma) con un 5% de ácido acético durante 5 minutos y a temperatura ambiente nos permitió verificar si la transferencia fue correcta. Seguidamente, las membranas se lavaron con TTBS (solución salina tamponada con Tris-Tween) (Tris 20 mM; Tween 20 al 0,2% (w/v); NaCl 150 mM; a pH7.5; Sigma) para eliminar el colorante y proceder a continuación con el bloqueo de las membranas.

7.6.3.3. Bloqueo e inmunodetección con anticuerpos

Las membranas se bloquearon en TTBS con 5% de leche desnatada en polvo (Bio-Rad) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar durante 20 minutos con TTBS, las membranas se incubaron con un anticuerpo primario policlonal de conejo anti-p65-NF-κB (dilución 1:500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU) durante la noche a 4°C. Como proteína constitutiva se empleó TFIIB de ratón (factor de transcripción II B) (dilución 1:1000, Cell Signaling, Danvers, MA, EE. UU). Tras la retirada del anticuerpo primario, las membranas se lavaron durante 20 minutos con TTBS e incubaron con anticuerpos secundarios anti-ratón (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU) y anti-conejo (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU). Los anticuerpos secundarios estaban marcados con peroxidasa de rábano para identificar las proteínas reconocidas por

los anticuerpos. Dicha enzima cataliza la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno, produciendo una reacción quimioluminiscente susceptible de ser cuantificada.

7.6.3.4. Revelado

El revelado se realizó incubando las membranas con el reactivo ECL plus (Amersham Bioscience, NJ, EE. UU) durante 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Las bandas se visualizaron mediante el documentador de geles LAS4000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suecia). La cuantificación de los niveles de expresión de las proteínas analizadas se determinó mediante el programa de análisis de imagen de uso libre ImageJ versión 1.44 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Los resultados se expresaron en términos de densidad óptica (DO) relativa a la muestra control, y se calcularon mediante el ratio de DO de la banda correspondiente a la proteína de interés y la de la proteína constitutiva.

7.6.4. Microscopía confocal

Para la inmunofluorescencia, las CMLV se sembraron sobre cubreobjetos colocados en una placa de 6 pocillos, a una densidad de 8.000-10.000 células/cm². Tras alcanzar el 90% de confluencia fueron cultivadas en presencia de los diferentes tratamientos durante 24h. Una vez concluido el periodo experimental, se lavaron con PBS (3 x 5 minutos), se fijaron y permeabilizaron con metanol frío al 50% durante 2 minutos, metanol frío al 100% durante 20 minutos y metanol frío al 50% durante 2 minutos. Tras lavar con PBS (3 x 5 minutos) se incubaron con un anticuerpo anti-p65-NF-κB (1:150, Ref. SC-8008, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU) en una solución de bloqueo (BSA 1%) durante toda la noche. A continuación, las células se lavaron con PBS (3 x 5 minutos) y se incubaron durante 1 hora con Alexa Fluor 488 F (ab') fragmento de IgG anti-ratón de conejo (1:150, Ref A-21204, Invitrogen) en PBS con 1% BSA. Tras un lavado con PBS (3 x 5 minutos), las células se incubaron con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (Invitrogen, CA, EE. UU) durante 5 minutos para marcar los núcleos. Finalmente, las células fueron lavadas y los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con un medio de montaje Aqua-Poly/Mount (Polysciences, Inc; Ref 18606) para examinar la fluorescencia. Las imágenes fueron obtenidas a 40x en un microscopio confocal invertido Z1 Axio Observer (LSM710 Exciter Zeiss). La inmunofluorescencia se analizó con el software ImageJ (NIH, EE. UU). El análisis de co-localización se realizó con los plugins Colocalization 73inder y teniendo en cuenta el valor de M1 en el Coeficiente de Mander, el cual representa el porcentaje de píxeles de color

verde (correspondiente al marcaje del anticuerpo primario) que colocalizan con píxeles de color azul (DAPI). Para realizarlo, los canales para ambos colores se dividieron en imágenes separadas y se usó el canal azul para seleccionar una región de interés (ROI) que comprende los núcleos. Luego, el ROI se colocó en la imagen verde (p65-NF-κB) y se midieron los píxeles en la región.

7.7. Determinación de parámetros de estrés oxidativo

Para las determinaciones de los niveles de EROs implicadas en el estrés oxidativo se emplearon tratamientos durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo experimental, las células se lavaron con DMEM libre de suero. La generación de EROs en CMLV se determinó empleando la sonda de fluorescencia H₂DCFDA (diacetato de 2', 7'-dihidro-dicloro-fluoresceína) (Invitrogen, EE. UU) a una concentración de 10 μM diluida en medio DMEM libre de suero y se dejó incubar durante 30 min en oscuridad. A continuación, las células se lavaron con solución salina y HBSS (solución salina equilibrada de Hank). Finalmente, se añadieron a las células 100 μl de HBSS con FBS al 2%. La fluorescencia se midió inmediatamente a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm, usando un lector de microplacas Tecan Infinite F200PRO usando el software i-control para la adquisición de datos (Tecan Trading AG, Männedorf, Suiza). Los valores de fluorescencia se refirieron a la cantidad de células a través del ratio fluorescencia/mg de proteína que se obtuvo tras calcular la concentración de proteína mediante el ensayo de Bradford mencionado en el apartado 7.6.2.

7.8. Ensayo de proliferación celular

Las sales de tetrazolio se escinden en formazán mediante enzimas celulares. Un aumento en el número de células viables da como resultado un aumento en la actividad general de las deshidrogenasas mitocondriales y con ello, un aumento en la cantidad de colorante de formazán formado en presencia de las sales de tetrazolio, que se correlaciona directamente con el número de células metabólicamente activas en el cultivo. La proliferación en las CMLV se realizó usando el reactivo WST-1 (sal sódica de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfenil)-2H-tetrazolio) (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Alemania) formado por sales de tetrazolio. Las CMLV fueron sembradas en placas de 96 pocillos a 10.000 células/cm² y cuando alcanzaron 90% confluencia, fueron cultivadas en 100 μl de DMEM al 20% FBS con los tratamientos durante 24 horas. Se le añadió 10 μl de reactivo WST-1 cada 100 μl DMEM en el pocillo (dilución 1:10) y después de 1 hora de incubación,

la absorbancia fue medida a 450 nm usando un lector de microplacas y corregida frente al blanco. Para obtener el blanco, se añadió el mismo volumen de medio de cultivo y reactivo WST-1 usado en los pocillos del experimento, pero en ausencia de células.

7.9. Ensayo de muerte celular

Cuando las CMLV sembradas en placas de 96 pocillos adquirieron un 90% de confluencia, se incubaron en DMEM 1% FBS con sus respectivos tratamientos durante 24 horas. Posteriormente se añadió la solución de lisis del kit de ensayo de citotoxicidad de lactato deshidrogenasa (LDH) (Canvax Biotech, Córdoba, España) en pocillos de control de lisis durante 45 min a 37°C para representar la actividad máxima de LDH. Se transfirieron 50 µl de sobrenadante del cultivo de cada pocillo, tanto control de lisis como tratamiento, a una nueva placa de 96 pocillos y 50 µl de la mezcla de reacción del kit. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 min protegida de la luz. Se agregaron 50 µl de solución de parada y se midieron a 450 nm con un lector de placas. El fundamento de la técnica consiste en la LDH, la cual es una enzima citosólica presente en las células que se libera en el medio de cultivo celular tras el daño a la membrana plasmática. LDH quita un electrón al lactato que se transfiere a NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido-oxidada) para producir NADH (nicotinamida adenina dinucleótido-reducida). Posteriormente, el NADH reduce las sales de tetrazolio, lo que provoca un cambio de color de amarillo a rojo dando lugar a formazán.

8. ESTUDIOS *IN VIVO*

8.1. Animales

Para los estudios *in vivo* se emplearon dos aproximaciones experimentales diferentes:

- En primer lugar, se emplearon ratas Wistar machos de 9 a 10 semanas de edad con un peso de 250-300 g. En este modelo se evaluó el efecto del suplemento de Mg²⁺ en la dieta sobre los procesos de inflamación y EO asociados a la ERC.
- Por otro lado, sobre un grupo de ratas Zucker machos de 9 a 10 semanas de edad con un peso de 350-500 g se valoró el efecto del suplemento de Mg²⁺ en la dieta sobre la disfunción vascular en un modelo experimental de SMet con ERC.

Todos los animales se mantuvieron estabulados con ciclos de luz-oscuridad de 12h:12h. Previamente al inicio del estudio las ratas fueron alimentadas *ad libitum* con una dieta estándar (Ca^{2+} 0,8%, P 0,6% y Mg^{2+} 0,1%), basada en la dieta C1031 de Altromin International GmbH (Lage, Alemania). Todos los protocolos experimentales fueron revisados y aceptados por el Comité Ético de Investigación Animal de la Universidad de Córdoba (Servicio de animales de experimentación, SAEx, UCO). Los animales recibieron cuidados humanitarios conforme a los Principios del Cuidado de animales de Laboratorio formulados por la Sociedad Nacional de Investigación Médica y conforme a la Directiva 2010/63/UE. Las ratas fueron asignadas al azar a los diferentes grupos experimentales.

8.1.1. Nefrectomía

La uremia fue inducida mediante nefrectomía 5/6 (Nx5/6), un procedimiento realizado en dos pasos que reduce la masa renal funcional original a un sexto (Figura 19). En base a nuestros estudios previos [189], los animales fueron anestesiados con isoflurano al 3-5% durante 1-3 minutos (Laboratorios Karizoo, Barcelona, España) y al 2% durante la operación. En el primer paso de la nefrectomía, se realizó una incisión de 5 a 8 mm en la superficie mediolateral izquierda del abdomen. Se expuso el riñón izquierdo y se extirparon los dos polos (2/3 de la masa renal). Se inspeccionó el riñón y se devolvió a una posición anatómicamente neutra dentro de la cavidad peritoneal. Las incisiones en la piel y la pared abdominal se cerraron con suturas, y la rata se devolvió a su jaula.

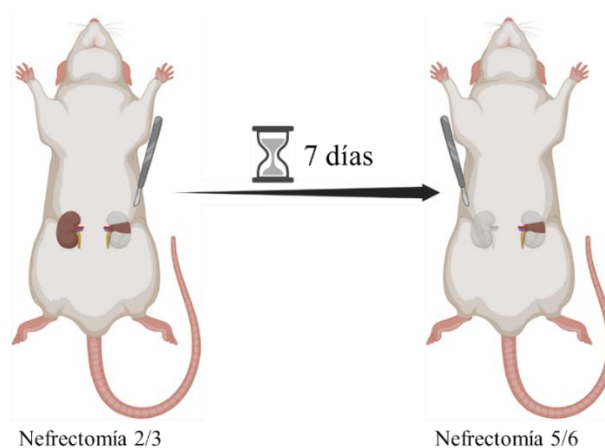


Figura 19. Procedimiento para la realización de la nefrectomía en el modelo animal.

Después de 1 semana de recuperación, se volvió a anestésiar al animal y se realizó una incisión de 5 a 8 mm en la superficie mediolateral derecha del abdomen. Se expuso y desencapsuló el riñón derecho, se pinzó y ligó el pedículo renal y se extrajo el riñón. El pedículo ligado se devolvió a una posición anatómica neutra y las incisiones en el abdomen y la piel se cerraron con materiales de sutura. Se utilizó buprenorfina 0,05 mg/kg s.c. (Laboratorios Karizoo, Barcelona, España) como agente analgésico en los días de cirugía y durante los dos días posteriores. Las ratas operadas de forma simulada (Sham) se sometieron a los mismos procedimientos sin manipulación renal.

8.2. Diseño experimental

Tal y como se describe en el apartado 6.1.1., transcurrió una semana entre la primera cirugía (Nx2/3) y la segunda (Nx5/6). El diseño experimental fue diferente en cada modelo experimental.

8.2.1. Modelo experimental de inflamación y EO asociado a la CV

La inflamación sistémica es un factor común en la ERC y está asociada a la progresión de la ECV. Por ello, dada la estrecha relación existente entre la CV, EO e inflamación, nos basamos en un modelo de CV para abordar el estudio del EO e inflamación subyacentes. Para ello, un día después de la segunda nefrectomía, las ratas Wistar fueron alimentadas con una dieta con un contenido normal de Ca^{2+} (0,6%) y alto contenido en P (1,2%). Los animales también recibieron CTR (Calcijex, Abbott, Madrid, España) para controlar el hiperparatiroidismo secundario e inducir CV, a una dosis de 20 ng/kg i.p. en días alternos. Las ratas nefrectomizadas se dividieron en dos grupos (n=10 cada uno) de acuerdo con el contenido de Mg^{2+} en la dieta (0,1 y 0,6%). El tratamiento con estas dietas de Mg^{2+} y CTR tuvo una duración de 14 días (Figura 20).

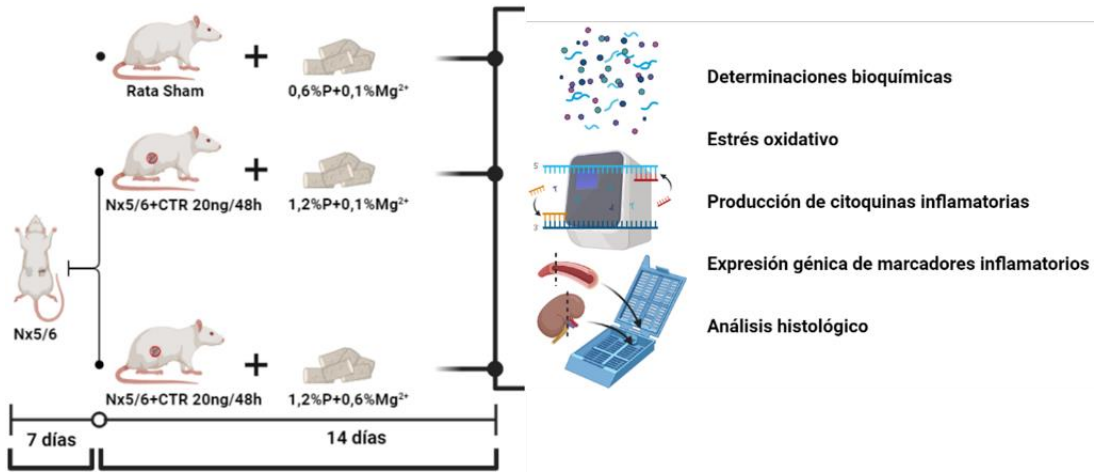


Figura 20. Representación del diseño experimental en los modelos de inflamación y EO asociado a la CV *in vivo*.

8.2.2. Modelo experimental de SMet-ERC

En el modelo de SMet-ERC, las ratas Zucker recibieron una dieta con un contenido normal de Ca^{2+} (0,6%) y moderado contenido en P (0,9%) a partir del día siguiente a la segunda nefrectomía. También fueron tratadas con CTR, aunque en este caso a 60 ng/ kg i.p. en días alternos. Las ratas también se dividieron en grupos (n=10) que recibieron dietas con un contenido en Mg^{2+} de 0,1 y 0,6% durante 28 días (Figura 21).

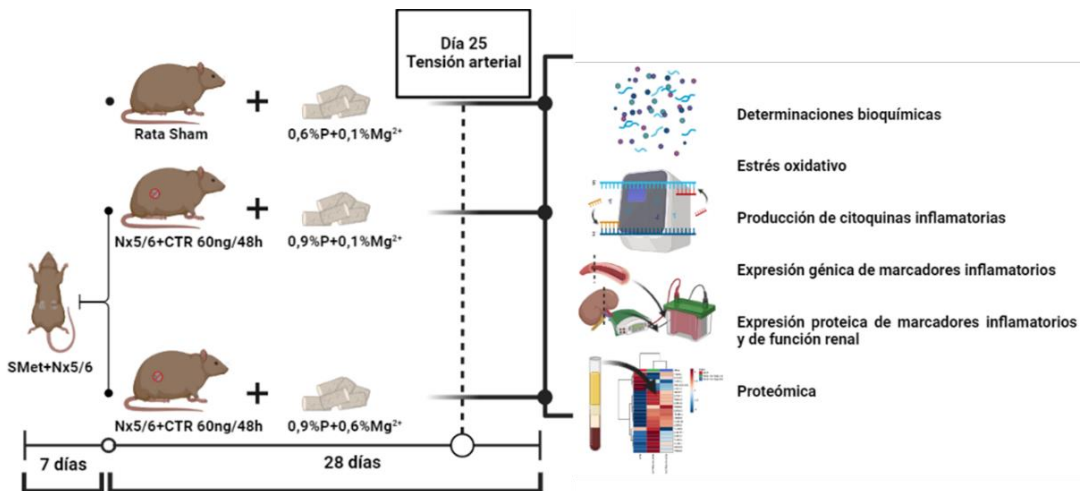


Figura 21. Representación del diseño experimental en los modelos de SMet-ERC *in vivo*.

En ambos grupos las ratas controles fueron sometidas a intervención simulada (Sham-operadas) y recibieron una dieta estándar con contenido normal de P (0,6%), Ca²⁺(0,6%) y Mg²⁺ (0,1%). Las dietas fueron adquiridas en Altromin. El sacrificio se realizó 24h después de recibir la última dosis de CTR. Después de finalizar el tiempo experimental, la sangre fue obtenida a través de una punción aórtica bajo anestesia con isoflurano al 2%. Tras el sacrificio de las ratas Wistar, la aorta torácica, y los riñones fueron retirados y procesados apropiadamente para la realización de los análisis histológicos y de expresión génica de marcadores inflamatorios. En el modelo de SMet con ratas Zucker, se extrajo igualmente sangre por punción aórtica, así como tejido aórtico para determinar la expresión génica y proteica de marcadores inflamatorios y tejido renal para evaluar la expresión proteica de Klotho.

8.3. Medición de la tensión arterial

La presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) se registró en ratas Zucker mediante el método no invasivo de esfigmomanometría en manguito en la cola de rata utilizando un medidor de presión LE 5001 (Harvard Apparatus, EE. UU) (Figura 22A). Los animales, no anestesiados, fueron entrenados previamente para realizar este procedimiento con el mínimo estrés y malestar.

El equipo de medición de tensión arterial cuenta con un manguito de presión que ocluye el paso de la sangre en la cola del animal y se combina con un transductor que controla el ritmo cardíaco del animal. Ambos se colocan en la cola del animal para operar sobre la arteria caudal, con el animal inmovilizado en un cepo (Figura 22). La presión arterial de los animales es una variable fisiológica que puede cambiar muy rápidamente, presentando valores dispares que se ven muy afectados por estímulos externos y por el estado de ánimo del animal. Con el objetivo de tomar registros de presión lo más precisos posible, se aplicaron medidas adicionales para eliminar el estrés de los animales. De esta manera, se colocó un protector opaco alrededor del cepo reduciendo la capacidad de visión del animal. Además, el cepo se colocó sobre una placa calefactora a 29-32°C, lo que además favoreció la relajación del animal (Figura 22B). Se tomaron 8-10 mediciones de PAS y PAD de cada una de las ratas Zucker previamente al sacrificio.

A)



B)



Figura 22. A) medidor de presión LE 5001. B) Representación de la medición arterial. La rata se encuentra dentro del cepo cubriendo su vista, con el transductor y el manguito en la cola y sobre una placa calefactora

8.4. Determinaciones bioquímicas

Para el análisis de parámetros bioquímicos, se obtuvo sangre por punción de la aorta abdominal en el momento del sacrificio. Los niveles de calcio ionizado (Cai) se midieron inmediatamente en un autoanalizador Spotlyte pH/Ca Analyzer (Menarini Diagnostics, Barcelona, España). La sangre se recogió en jeringas heparinizadas y se centrifugó a 2200 g durante 5 minutos con el fin de separar el plasma de las células. El plasma se alicuotó en viales eppendorf de 1,5 mL y se almacenó a -20°C hasta su posterior análisis. Los niveles plasmáticos de creatinina, Ca total, P, Mg²⁺ y glucosa se midieron por espectrofotometría (BioSystems SA, Barcelona, España). Para la medición de los niveles plasmáticos de colesterol total y HDL, se enviaron las muestras al servicio de Análisis Clínicos del Hospital Reina Sofía de Córdoba. Los niveles de LDL+VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad) se obtuvieron sustrayendo los valores de HDL al colesterol total. Se usaron ELISAs para analizar los niveles circulantes en plasma de FGF23 (Kainos Laboratories, Tokio, Japón), PTH (Immutopics, San Clemente, CA, EE. UU), Endotelina-1 (R&D Systems, CA, EE. UU), y IL-6 (Cusabio, Wuhan, China). Para la medición de los niveles de CTR se usó un radioinmunoensayo (RIA, Immunodiagnostic Systems, Reino Unido).

8.4.1. ELISA

El ELISA es una técnica basada en un anticuerpo marcado con una enzima capaz de detectar un antígeno inmovilizado en una superficie sólida. Este ensayo de alto rendimiento se basa en que los materiales no unidos se lavan entre los pasos, lo que permite la detección del anticuerpo marcado con un enzima adherido al antígeno, siendo la peroxidasa de rábano picante (HRP) la enzima más comúnmente usada. Los ELISAs usados fueron de tipo sándwich. En ellos el antígeno queda inmovilizado entre dos anticuerpos, uno de captura y otro de detección, también conocidos como pares de anticuerpos, que se unirán a dos epítomos distintos de un mismo antígeno. A continuación, se detallan los procedimientos comunes usados en los ELISAs (Figura 23):

- El anticuerpo de captura se encuentra inmovilizado sobre la placa de 96 pocillos procedente de alguna de las casas comerciales especializadas.
- Se añade la cantidad de muestra indicada en cada kit. Esta contiene el antígeno de interés que se unirá al anticuerpo de captura de la placa.
- Se añade el anticuerpo de detección que se unirá al antígeno unido a su vez al anticuerpo de captura.
- En caso de que el anticuerpo de detección vaya conjugado con HRP procederemos directamente con el siguiente paso. Si el anticuerpo de detección utilizado está marcado con biotina se requiere la estreptavidina-HRP adicional para la amplificación de la señal.
- Se añade el sustrato tetrametilbencidina (TMB), que al reaccionar con la HRP proporcionará una señal visible azul, que permitirá la detección y/o cuantificación del antígeno de interés una vez que se administre la solución de parada (generalmente NaOH) en los pocillos convirtiendo inmediatamente el azul en amarillo. Las longitudes de onda usadas para la lectura de los ELISAs de IL-6, ET-1, PTH y FGF23 corresponden todos a 450 nm.
- Las concentraciones de los antígenos en las muestras se determinaron a través de una curva estándar, que se calculó en base a la absorbancia de cada estándar frente a las concentraciones respectivas de estos.

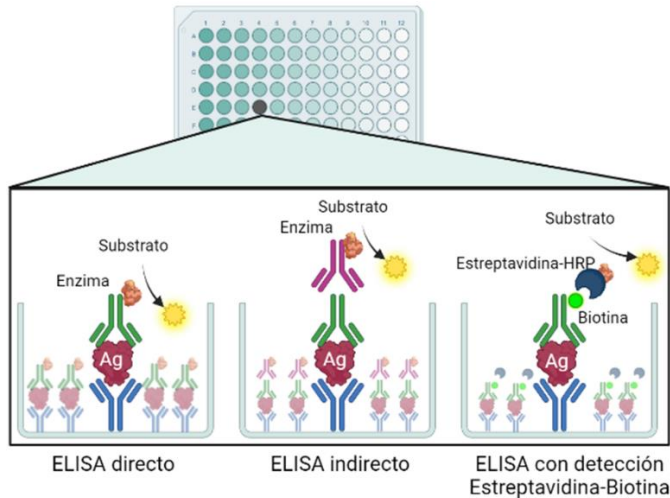


Figura 23. Tipos de ELISAs.

A la hora de realizar los ELISAs pertinentes, estos poseen variaciones entre ellos que serán detalladas.

- En el ELISA para FGF23 (Kainos Laboratories, Tokio, Japón), el anticuerpo de captura reconoce tanto el FGF23 intacto como N-terminal. Respecto al anticuerpo de detección, está conjugado con HRP y detecta el segmento C-terminal, por lo que en el momento de la medición sólo reconoce la molécula intacta.
- El anticuerpo de captura para la PTH (Immutopics, San Clemente, CA, EE. UU), está conjugado con avidina-biotina contra el fragmento de PTH 39-84. El anticuerpo de detección conjugado con HRP, reconoce epítomos dentro de la región N-terminal 1-34 y por lo tanto la medición informará de la cantidad de PTH bioactiva (1-84) que hay en la muestra.
- Para visualizar los niveles de ET-1 (R&D Systems, CA, EE. UU) el anticuerpo de detección está agregado a HRP.
- La IL-6 (Cusabio, Wuhan, China) fue detectada por anticuerpos conjugados con biotina, por lo que el uso de estreptavidina-HRP fue necesario para la determinación del antígeno.

8.4.2. Niveles de calcitriol

La concentración de CTR en plasma se midió con un kit RIA (Immunodiagnostic Systems (IDS) Ltd, Boldon, Reino Unido). Brevemente, 250 µl de muestras de plasma se deslipidaron con 25

µl de reactivo de delipidación tras una centrifugación a 10000 g durante 10 minutos. Del sobrenadante resultante, 100 µl fueron transferidos a inmunocápsulas que contenían anticuerpos monoclonales unidos a partículas en fase sólida en suspensión (gel de inmunoextracción) contra CTR. Las inmunocápsulas fueron previamente agitadas en vortex y dejadas reposar durante 5 minutos. Posteriormente, estas inmunocápsulas fueron mantenidas en un rotador a 20 rpm durante 3 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo y tras dejar reposar las inmunocápsulas durante 5 minutos, estas se colocaron en tubos de borosilicato de 7 ml que fueron posteriormente centrifugados a 1000 g durante 1 minuto con el fin de recoger la muestra. A continuación, el gel de inmunoextracción se lavó añadiendo 500 µl de solución de lavado a cada inmunocápsula, centrifugando posteriormente 1 minuto y repitiendo este mismo paso. Tras esto, las inmunocápsulas se colocaron en un nuevo juego de tubos de borosilicato y las muestras se eluyeron con 150 µl de reactivo de elución mediante centrifugación durante 1 minuto a 1000 g. Este paso se repitió 2 veces con el fin de obtener un volumen de 450 µl por muestra, que contenía el CTR purificado. Las muestras se evaporaron con nitrógeno en un baño a 30°C, dejando un residuo blanco que sería resuspendido y agitado en vortex con 100 µl de tampón de ensayo.

Tras reconstituir los calibradores con 1 mL de agua destilada, 100 µl de cada calibrador y los eluidos reconstituidos, se incubaron durante 16-18 horas con 200 µl de anticuerpo de oveja anti-CTR altamente específico. Posteriormente, los tubos se incubaron durante 1 hora con 200 µl de anticuerpo anti-oveja marcado con el isótopo I¹²⁵. Mediante una breve incubación de 30 minutos con 100 µl de Sac-Cel, un reactivo aglutinante, se separaron aquellos anticuerpos marcados I¹²⁵ unidos de los libres. Tras pipetear 4 mL de solución de lavado seguida de una centrifugación a 2000 g durante 20 minutos, el sobrenadante fue decantado y se procedió al recuento con un contador gamma. La radiactividad presente en la muestra fue inversamente proporcional a la concentración de CTR.

8.5. Determinación de la expresión génica de marcadores inflamatorios por RT-PCR

Para la extracción del ARN total de las muestras *in vivo*, se tomaron 50 mg de tejido aórtico que posteriormente fue disgregado y pulverizado con nitrógeno líquido en un mortero. El tejido homogenizado fue colocado en un vial eppendorf de 1,5 mL al que se le agregó 1 ml de TriReagent (Sigma Aldrich Inc, MO, EE. UU). Tras una agitación con el vortex durante 10-15 segundos se procedió a la extracción del ARN tal y como se detalla en el apartado 7.3 de la sección de materiales y métodos correspondiente a los estudios *in vitro*, siguiendo el método de Chomczynski y Sacchi [188].

Para la normalización de la expresión génica, se usó el gen constitutivo GAPDH. Las secuencias de los cebadores empleados para determinar la expresión de marcadores de inflamación se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Cebadores usados para la RT-PCR cuantitativa.

GEN	CEBADOR SENTIDO	CEBADOR ANTISENTIDO
GAPDH	5'-AGGGGTGCCTTCTCTGTGAC -3'	5'-TGGGTAGAATCATACTGGAACATGTAG-3'
ICAM-1	5'-TGGAGAGCACAAACAGCAGAGATT-3	5'-AGGATGGGAGCTGAAAAGTTGTAG-3'
IL-1β	5'-AATAGCAGCTTTCGACAGTGAGGA-3'	5'-CCACAATGAGTGACACTGCCTTCC-3
IL-6	5'-TTGGAATGAGAAAAGAGTTGTGC-3'	5'-GGTAGAAACGGAECTCCAGAAGAC-3'
TNF-α	5'-TCTACTGAACTTCGGGGTGATCGG -3'	5'-TCCTCCGCTTGGTGGTTTGCTACG-3'

8.6. Determinación de la expresión proteica de marcadores inflamatorios en aorta y Klotho renal

Para el análisis de la expresión de Klotho renal y la evaluación de la vía NF- κ B mediante la translocación nuclear de p65 aórtico en los modelos de SMet-ERC, se realizó la técnica de Western Blot en extractos proteicos citosólicos y nucleares respectivamente.

8.6.1. Extracción proteica

Para la extracción proteica se siguió el protocolo previamente descrito en el apartado 7.6.1. de la sección de material y métodos.

El aislamiento de proteína citosólica se realizó a partir de 50 mg de tejido renal, colocados en un vial eppendorf de 1,5 mL a los que se les añadieron 500 μ l de buffer A de lisis de baja fuerza iónica. La homogenización de la muestra fue realizada con ayuda de un micropistilo.

Para la extracción de la fracción nuclear se usaron 50 mg de tejido aórtico homogenizado con mortero usando nitrógeno líquido. La muestra disgregada fue colocada en un vial eppendorf de 1,5 mL

a la cual se le añadió 50 µl de buffer A. Tras la extracción de la fracción citosólica, 25 µl de buffer B fueron añadidos para extraer la fracción nuclear que posteriormente fue usada.

8.6.2. Western blot

Cantidades iguales de proteína (25 µg) procedente de extractos citosólicos ó nucleares se cargaron en el gel de poliacrilamida para la realización de la electroforesis. El protocolo se continuó de forma similar al apartado 5.6.3.

Las membranas con extractos proteicos renales se incubaron con un anticuerpo primario monoclonal de rata anti-Klotho (dilución 1:500, Trans Genic Inc., Kobe, Japón) y como proteína constitutiva se empleó β-actina de ratón (dilución 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU). Para el tejido aórtico se usó durante la noche a 4°C anti-p65-NF-κB de conejo (dilución 1:500) y TFIIB de ratón (D1:1000) como control de carga.

Las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios anti-ratón (1:5000) anti-conejo (1:5000) y anti-rata (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU).

8.7. Determinación de los niveles de óxido nítrico

Dado que el NO se oxida a nitrito y nitrato, es una práctica común cuantificar el NO²⁻/NO³⁻ total como medida del nivel de NO. El kit de ensayo de óxido nítrico QuantiChrom (BioAssay Systems, Hayward, EE. UU) está diseñado para medir la producción de NO después de la reducción de nitrato a nitrito utilizando el método Griess [190]. El reactivo de Griess usa sulfanilamida y dicloruro de N-(1-naftil)-etilendiamina (NED), bajo condiciones ácidas (sulfanilamida) el nitrito reacciona creando compuestos diazo que posteriormente, junto con la naftilenotilendiamina, produce un cromóforo magenta que puede ser leído por espectrofotometría a 540 nm. Tras preparar la recta del estándar como indica el kit, se desproteinizaron 150 µl de cada muestra o punto de la recta mediante la adición de 8 µl de ZnSO₄ (sulfato de zinc) y 8 µl de NaOH (suministrados por el kit) y la posterior centrifugación a 18400 g durante 10 minutos. Los 100 µl del sobrenadante fueron transferidos a un nuevo vial eppendorf de 1,5 mL, a los que se añadieron 200 µl del reactivo de trabajo del kit. Tras una incubación a 60°C durante 10 minutos, las muestras y la recta fueron centrifugados brevemente a velocidad máxima para precipitar cualquier pellet. Se transfirieron 250 µl a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 540 nm.

8.8. Estrés oxidativo

8.8.1. Actividad glutatión peroxidasa

Para la determinación en plasma del estrés oxidativo se analizó la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx), utilizando el método de Flohé y Günzler [191]. Este método se basa en cuantificar el cambio en la absorbancia medida a 340 nm causado por la oxidación del NADPH. Una unidad de la enzima GPx se define como la cantidad que genera la oxidación de 1.0 μM de NADPH a NADP por minuto a 37°C. Los reactivos usados fueron 880 μl de tampón fosfato potásico (0,1 M), 53 μl de glutatión reductasa (45 U/ml de tampón) (Sigma Aldrich, MO, EE.UU), 133 μl de glutatión reducido (3,07 mg/ml de tampón) (Sigma Aldrich, MO, EE.UU), 100 μl de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH) (1,25 mg/ml de tampón) (Sigma Adrich, MO, EE.UU.) junto con 100 μl de muestra. Tras 3 minutos de incubación a 37°C, 1 ml de la reacción fue depositado en una cubeta de espectrofotómetro. La reacción se inició con la adición de 100 μl de hidroperóxido terbutílico (1,55 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de tampón) (Sigma Adrich, MO, EE. UU). La absorbancia a 340 nm fue monitorizada durante 5 minutos tomando mediciones cada 30 segundos desde el tiempo cero. El cálculo de las unidades de enzima que transforma un μmol de sustrato correspondiente en un minuto (UA), se realizó a partir del incremento de la absorbancia de la muestra ($\Delta\text{ABS}/\text{min}$) corregido con el coeficiente de extinción molar del NADPH ($6,22 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$).

8.8.2. Ensayo de lipoperoxidación lipídica

Los lípidos poliinsaturados son susceptibles a un ataque oxidativo, lo que da como resultado una reacción en cadena con la producción de productos finales como el malondialdehído (MDA). Para obtener la concentración, se usó el kit de ensayo para MDA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Se mezclaron 20 μl de plasma, 500 μl de ácido sulfúrico 42 mM (Merck, Darmstadt, Alemania) y 125 μl de la solución de ácido fosfotúngstico aportada por el kit. Tras incubar 5 minutos a temperatura ambiente., las muestras se centrifugaron a 13.000 x g durante 3 minutos. Tras ello, se desecharon los sobrenadantes y los pellets se resuspendieron con 100 μl de butilhidroxitolueno (BHT) al 1X, ajustando posteriormente el volumen hasta 200 μl con H_2O ultrapura. Para cuantificar la concentración de MDA, se añadieron 600 μl de una solución de ácido tiobarbitúrico (TBA) a la recta y las muestras, incubando la mezcla a 95°C durante 1 hora, ya que el TBA reacciona con MDA formando un cromógeno rosa detectable a 532 nm. A continuación, les muestras se enfriaron en hielo durante 10 minutos y se

añadieron 300 µl de 1-butanol (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemania) y 100 µl de NaCl 5 M (PanReac AppliChem, Barcelona, España). Tras mezclar la reacción, se centrifugó a 16.000 x g durante 3 minutos a temperatura ambiente. La capa formada de 1-butanol se desechó y el pellet formado se resuspendió con 200 µl con H₂O ultrapura. Posteriormente 200 µl de la mezcla se transfirieron a una placa 96 pocillos y se midió su absorbancia en un lector de microplacas a 532 nm.

8.9. Análisis histológico

En las ratas del modelo de inflamación y EO asociado a la CV, la evaluación microscópica de los riñones y la aorta torácica se realizó en secciones de tejido de 3 µm fijado con una solución de paraformaldehído al 4% e incluido en parafina. Las secciones renales se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E), tricrómico de Masson y ácido peryódico de Schiff (PAS). Para las secciones de aorta, se realizó tinción con H&E. Las imágenes fueron adquiridas a través de un escáner Leica Aperio GT450DX (Frankfurt, Alemania), donde los portaobjetos fueron escaneados a un máximo de 40X aumentos por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Reina Sofía. La inflamación, fibrosis, necrosis, CV y daño vascular fueron evaluados por un anatomopatólogo y se realizó una valoración semicuantitativa utilizando una escala de intensidad de 0 a 4, siendo 0: normal; 1: bajo; 2: leve; 3: moderado; y 4: grave.

8.9.1. Tinción de H&E

Las secciones de tejido se desparafinaron con xilol en dos pasos de 10 y 5 minutos. Las muestras se hidrataron con baños de etanol de gradación decreciente (2 x 5 minutos a 100%, 5 minutos a 96% y 5 minutos a 70%), seguidos de un lavado de 5 minutos con agua destilada. Las secciones se tiñeron con una solución de hematoxilina de Harris para diagnóstico clínico (Panreac AppliChem) durante 30 segundos, tras lo que se realizó un lavado con agua corriente para retirar el exceso de colorante. A continuación, se realizó la contratinción con eosina Y Shandon durante 1 segundo (Thermo Scientific) y se lavó de nuevo para retirar el exceso. Las muestras se deshidrataron con un gradiente de etanol (3 minutos a 96% y 2 x 3 minutos a 100%), seguido de dos baños en xilol durante 3 minutos. A continuación, las muestras se sellaron con un medio de montaje Eukitt (ORSAtec GmbH, Bobingen, Alemania). Una vez secas, se procedió a escanear y digitalizar las muestras en el escáner Leica.

8.9.2. Tinción de tricrómico de Masson

Para esta tinción, todos los cortes de tejido aórtico se desparafinaron con xilol (2 x 5 minutos) y se rehidrataron con gradación creciente de etanol (2 x 10 minutos a 100%, 2 x 10 minutos con 96% y 10 minutos a 80%). Tras un lavado con agua destilada de 5 minutos, las muestras se tiñeron con solución de hematoxilina de Harris (Panreac Applichem) durante 7 minutos. Se retiró el exceso de tinción con lavados de agua corriente y se tiñó con solución de fucsina ácida (Panreac Applichem) durante 7 minutos. Los cortes se lavaron con agua destilada durante 2 minutos y a continuación se procedió a diferenciar en solución de ácido fosfomolibdico durante 10 minutos. Las secciones se transfirieron sin enjuagar a una solución de azul de anilina durante 10 minutos. Después de un lavado breve con agua destilada, se volvió a diferenciar en una solución de ácido acético al 1% durante 1 minuto. El exceso de solución se retiró con un lavado de agua destilada durante 5 minutos, seguido de una deshidratación con etanol (1 minuto a 96% y 1 minuto a 100%) y un baño en xilol (2 x 2 minutos). Posteriormente los cortes teñidos fueron sellados con medio de montaje Eukitt (ORSAtec GmbH, Bobingen, Alemania) y observadas al escáner y evaluadas.

8.9.3. Tinción de PAS

Las muestras se desparafinaron y rehidrataron de la misma forma realizada en la tinción de tricrómico de Masson (apartado 6.9.2). Las secciones de tejido se lavaron durante 5 minutos en agua destilada y se introdujeron 5 minutos en una solución de ácido peryódico al 1%. Se continuó con un lavado en agua destilada y posteriormente las muestras fueron colocadas en reactivo de Schiff durante 15 minutos. Tras un lavado en agua corriente durante 15 minutos, se contratiñó con hematoxilina de Harris (Panreac Applichem) 1 minuto, seguido de un lavado en agua corriente hasta retirar el exceso. Las muestras se enjuagaron en un gradiente de etanol (1 minuto a 96% y 1 minuto a 100%) y xilol (2 x 2 minutos). A continuación, se sellaron con medio de montaje Eukitt (ORSAtec GmbH, Bobingen, Alemania) y fueron observadas y evaluadas al escáner.

8.10. Análisis proteómico

8.10.1. Preparación de las muestras

Para la realización del análisis proteómico se usaron muestras de plasma del modelo de SMet-ERC procedente de ratas Zucker. En primer lugar, las proteínas séricas más abundantes (albúmina, serotransferrina e inmunoglobulinas) se eliminaron utilizando una columna MARS de cartucho giratorio Ms-3 (Agilent) siguiendo el protocolo del fabricante. A continuación, las proteínas eluidas fueron precipitadas mediante TCA-acetona, resuspendidas en tampón compatible (RapiGest, Waters) y digeridas por aplicación de tripsina de acuerdo al protocolo descrito por J.Vowinckel et al [192].

8.10.2. Espectrometría de masas

Con el fin de detectar, identificar y cuantificar los péptidos de nuestras muestras, se procedió a realizar una cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS). Durante la cromatografía líquida, los iones llegan al detector, generando una señal eléctrica que a su vez es ampliada, procesada y registrada en un ordenador. Luego se da paso a la espectrometría de masas, la cual representa gráficamente los iones detectados en su relación masa/carga.

Para la adquisición de los datos se utilizaron los métodos de adquisición dependiente de datos (DDA) y de adquisición dependiente de información - adquisición secuencial de ventanas de todos los iones de fragmentos teóricos (DIA-SWATH). Todas las muestras se analizaron en orden aleatorio mediante la inyección de 1 µg del total de muestras digeridas (2 µl de cada muestra) en un espectrómetro de masas Q-TOF híbrido (Triple TOF 5600+, Sciex, Redwood City, CA, EE. UU) acoplado en línea a nano-HPLC (Ekspert nLC415, Eksigent, Dublin, CA, EE. UU). El método SWATH utilizado consistió en un TOF MS (400-1250 m/z, 50 ms de tiempo de adquisición) seguido de 50 ventanas de tamaño variable (400-1250 m/z, 90 ms de tiempo de adquisición), con un tamaño mínimo de 5 m/z. Entre muestras, se corrió un estándar (estándar digerido de β-galactosidasa, ABSciex) con tres funciones: autocalibración del instrumento, limpieza de la columna para evitar el arrastre y control de calidad de la sensibilidad y la cromatografía. Para una mayor sensibilidad, los métodos DDA y SWATH se realizaron a nanoflujo (300 nL/min) en una columna de 25 cm de largo × 75 µm de diámetro interno (Acclaim PepMap 100, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU) usando una columna de 120 min. gradiente de 5% a 30% B (A: 0,1% FA en agua; B: 0,1% en ACN).

8.10.3. Análisis de los datos

El análisis de MS se dividió en los siguientes pasos:

- Creación de una biblioteca espectral a partir de los péptidos y proteínas identificados a partir de DDA y el fraccionamiento en fase gaseosa (GF) nanoLC-MS/MS mediante el uso de grupos hechos de todas las muestras. Este paso se realizó combinando el uso del software Protein Pilot (v5.0.1, Sciex) con una base de datos de proteínas humanas SwissProt. que incluye péptidos RePliCal iRT (PolyQuant GmbH, Alemania) y el software PeakView (versión 2.1, (Sciex, EE. UU)) con las siguientes configuraciones: hasta 10 péptidos por proteína, hasta 7 transiciones por péptido, un umbral de confianza de péptido del 95 % y un umbral FDR (tasa de descubrimiento falso) del 1%. Se utilizó una ventana de 5 min y una tolerancia de 50 ppm para extraer las trazas cromatográficas de los fragmentos.
- Análisis de cada muestra mediante DIA-SWATH nanoLC-MS/MS con un método SWATH LC-MS variable como se indicó anteriormente.
- Análisis de identificación de proteínas y datos de cuantificación para las proteínas contenidas en la biblioteca espectral obtenida previamente mediante la extracción de cromatogramas de iones de fragmentos utilizando MS/MSALL con SWATH Acquisition MicroApp (v.2.0, Sciex) y calibración de tiempos de retención de péptidos en todas las ejecuciones utilizando péptidos RePliCal iRT enriquecidos (también presentes en la biblioteca).

Además, para tener la mayor confianza posible con las identificaciones y cuantificaciones, solo se incluyeron en el análisis puntuaciones superiores al 99% y FDR inferiores al 1%. Después de este paso, se utilizó MarkerView (versión 1.2.1; Sciex) para normalizar todos los datos adquiridos y se generó una tabla que contenía la abundancia diferencial para fines de análisis estadístico.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores se expresan como las medias \pm el error estándar de las medias (SEM). La diferencia entre las medias de dos grupos diferentes se determinó mediante la prueba t; la diferencia entre las medias de tres o más grupos se evaluó mediante ANOVA. Se utilizó la prueba de Tukey como procedimiento *post hoc*. Se realizó un estudio de correlación mediante la prueba P de Pearson. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los datos adquiridos del análisis proteómico se introdujeron en la plataforma en línea gratuita MetaboAnalyst 5.0. Para su normalización, los datos fueron transformados a log₁₀ y escalados automáticamente (centrado en la media y dividido por la desviación estándar de cada variable). Se incluyeron un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales dispersos (sPLS-DA) para observar la distribución de las muestras en cada grupo, un ANOVA unidireccional con el fin de obtener las proteínas expresadas diferencialmente en función de la prueba LSD de Fisher con un pvalue<0,05 y un mapa de calor para dichas proteínas.

La determinación de las redes de interacción proteína-proteína (IPP) se construyó con el software STRING, indicando las interacciones entre las proteínas en función de la fuerza del soporte de datos y la realización de un agrupamiento de k-medias.

El análisis de las rutas proteómicas de las proteínas expresadas diferencialmente se realizó utilizando Reactome. Se usó como especie *Homo sapiens* con la opción de identificar proteínas ortólogas en *Rattus norvegicus*. Posteriormente el software Graphpad Prism versión 8.0 se utilizó para representar los gráficos de enriquecimiento de las vías significativas (p-valor<0,05).

RESULTADOS



RESULTADOS

10. EFECTO DEL SUPLEMENTO DE Mg^{2+} SOBRE LA INFLAMACIÓN Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

10.1. Estudios *in vitro*

Concentraciones elevadas de Mg^{2+} reducen los niveles de citoquinas pro-inflamatorias inducidos por AP en las CMLV

En comparación con las CMLV no tratadas, la adición de altos niveles de P (AP 3,3 mM) con una concentración normal de Mg^{2+} (0,8 mM) promovió una mayor liberación de los mediadores inflamatorios IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α (Figura 24). En estas condiciones, la adición de niveles elevados de Mg^{2+} (1,6 mM) previno el aumento en la producción de citoquinas, obteniéndose valores similares al control.

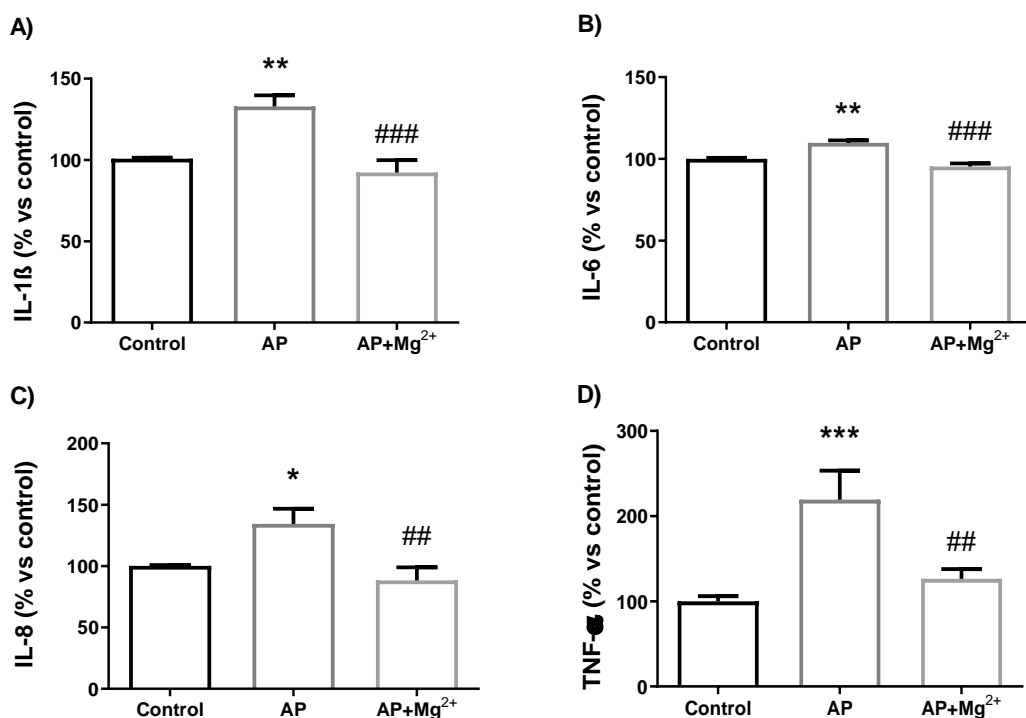


Figura 24. Efecto del Mg^{2+} sobre la secreción de citoquinas inflamatorias inducida por AP. La figura representa los niveles de IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-8 (C) y TNF- α (D) medidos en sobrenadantes de las CMLV mediante Bioplex. Las células se incubaron durante 9 días en un medio con AP (3,3 mM) con una concentración de Mg^{2+} normal (0,8 mM) o elevado (1,6 mM, (AP + Mg^{2+})). Las células incubadas en medio con niveles normales de P y Mg^{2+} se usaron como controles. Los datos se representan como media \pm SEM. (n=6/grupo x 4 experimentos independientes). Se

RESULTADOS

usó el método Tukey en la prueba ANOVA para analizar las diferencias entre grupos. *, $p < 0,05$ vs Control; **, $p < 0,01$ vs Control; ***, $p < 0,001$ vs Control; ##, $p < 0,01$ vs AP; ###, $p < 0,001$ vs AP.

Al analizar la presencia de ICAM-1 en la superficie de las CMLV tratadas con AP, y coincidiendo con estudios previos [193] no se observó un aumento de sus niveles respecto al grupo control (Figura 25). Sin embargo, los niveles de ICAM-1 sí fueron estadísticamente inferiores en las células tratadas con Mg^{2+} elevado respecto a las de los grupos control y AP ($p < 0,001$ vs Control; $p < 0,01$ vs AP).

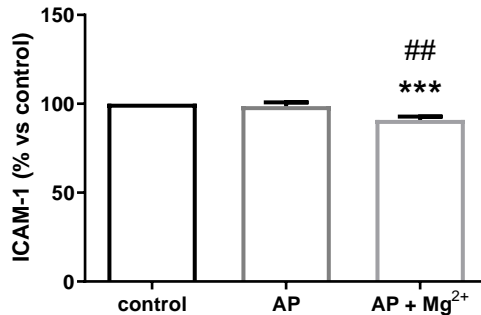
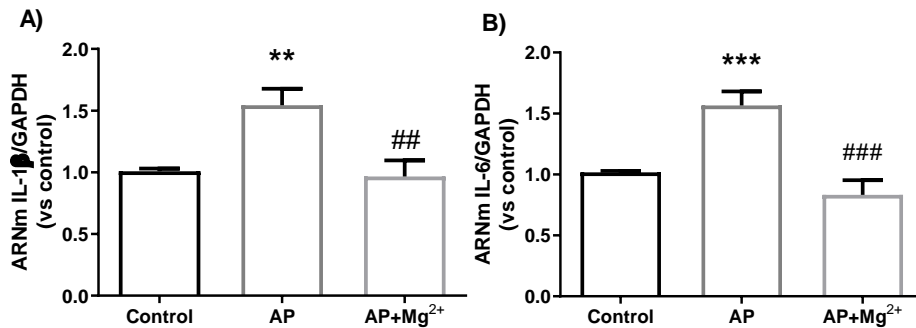


Figura 25. Efecto del Mg^{2+} sobre los niveles de ICAM-1. Los niveles de ICAM-1 fueron determinados mediante citometría de flujo tras 9 días de cultivo. Los datos se representan como media \pm SEM ($n=6$ de 3 experimentos independientes). ***, $p < 0,001$ vs Control; ##, $p < 0,01$ vs AP.

La expresión de citoquinas a nivel de ARNm mostró un patrón similar al descrito para proteína: en el medio con AP y Mg^{2+} 0,8 mM hubo un marcado aumento tanto en la expresión de las citoquinas como de la molécula de adhesión ICAM-1. Estos valores disminuyeron significativamente con la adición de Mg^{2+} 1,6 mM al medio con AP (Figura 26).



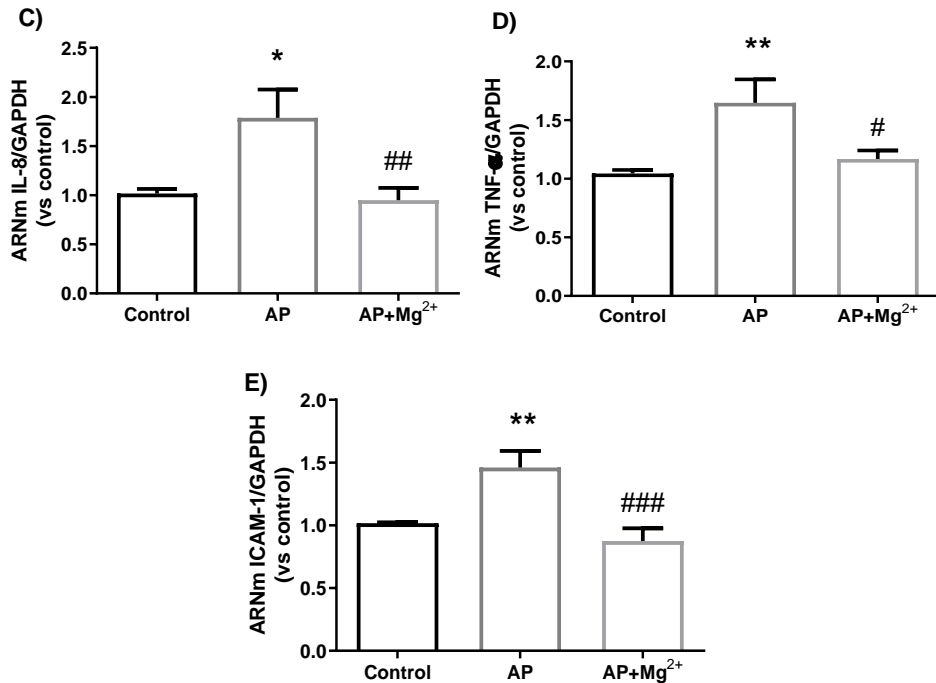


Figura 26. Efecto del Mg²⁺ sobre la expresión de marcadores inflamatorios inducidos por AP. La figura representa los niveles de ARNm de las citoquinas IL-1β(A), IL-6 (B), IL-8 (C), TNFα (D) y de la molécula de adhesión ICAM-1(E), medidos mediante PCR cuantitativa en las CMLV tras 9 días de cultivo en un medio con AP (3,3 mM) con una concentración de Mg²⁺ normal (0,8 mM) o elevado (1,6 mM, (AP + Mg²⁺)). Los datos se representan como media ± SEM (n=4/grupo, 3 experimentos). *, p<0,05 vs Control; **, p<0,01 vs Control; ***, p<0,001 vs Control; #, p<0,05 vs AP; ##, p<0,01 vs AP; ###, p<0,001 vs AP.

El tratamiento con Mg²⁺ previno la activación de la ruta de señalización NF-κB inducida por AP en las CMLV

Dado que previamente habíamos demostrado en las CMLV que un medio con AP era capaz de inducir la secreción de citoquinas inflamatorias, a continuación, evaluamos si este efecto podría ocurrir a través del sistema de señalización NF-κB [193]. El estudio por Western blot reveló que, en comparación con las células control, el contenido nuclear de p65, fragmento inducible del factor de transcripción NF-κB, aumentó significativamente en las células cultivadas en el medio con AP-Mg²⁺ 0,8 mM (p<0,01 vs Control). Sin embargo, la adición de Mg²⁺ 1,6 mM al medio con AP evitó esta translocación nuclear de p65 (p<0,001 vs AP) (Figura 27A). Estos resultados se confirmaron mediante tinción de inmunofluorescencia. Como se muestra en la Figura 27B, las células no tratadas tenían una señal dispersa de p65-NF-κB en el citoplasma, mientras que en las células tratadas con AP-Mg²⁺ 0,8 mM hubo una mayor tinción nuclear de p65-NF-κB (p<0,001 vs Control). El análisis de la intensidad

de fluorescencia verde en todas las muestras también corroboró la inhibición de la translocación nuclear de p65-NF-κB inducida por la adición de Mg²⁺ elevado al medio con AP (p<0,01 vs AP).

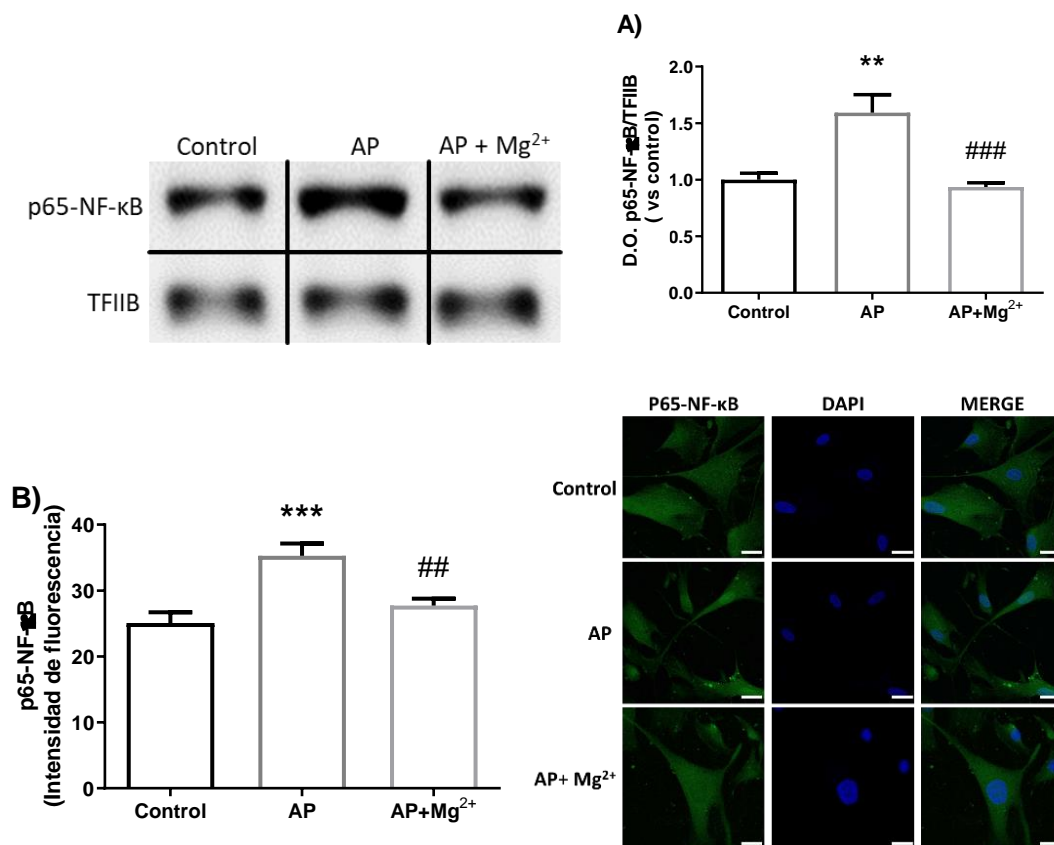


Figura 27. El Mg²⁺ elevado previno la activación inducida por AP de la vía de señalización de NF-κB en las CMLV. Las células se incubaron durante 24 horas en un medio con AP (3,3 mM) con una concentración de Mg²⁺ normal (0,8 mM) o elevado (1,6 mM, (AP + Mg²⁺)). Las células incubadas en medio con niveles normales de P y Mg²⁺ se usaron como controles. (A) Se determinó la expresión de la proteína p65-NF-κB en extractos nucleares mediante Western blot. Cada imagen se tomó originalmente de la misma membrana y se eliminaron los carriles no utilizados o repetidos. Las imágenes son representativas de tres experimentos diferentes. Las barras se representan con medias ± SEM. (B) La localización intracelular de p65-NF-κB se visualizó mediante microscopía confocal. Para cada tratamiento, se muestra a la izquierda la tinción de p65 (inmunofluorescencia verde); en el medio, la misma muestra se contrastó con DAPI (azul) para tinción nuclear; la imagen combinada (merge) se muestra a la derecha. Las imágenes son representativas de tres experimentos diferentes. Ampliación original: 400X. Las barras representan la media ± SEM. **, p<0,01 vs Control; ***, p<0,001 vs Control; ##, p<0,01 vs AP; ###, p<0,001 vs AP.

El tratamiento con Mg²⁺ previno el incremento en la producción de EROs, proliferación y muerte celular inducido por AP en las CMLV

La producción de EROs (COO⁻, ONOO⁻) se determinó mediante fluorescencia utilizando la sonda H₂DCFDA. Como se muestra en la Figura 28, la intensidad de la fluorescencia aumentó significativamente en las células cultivadas en el medio con AP y concentración normal de Mg²⁺ (0,8

mM) en comparación con las células control ($p < 0,001$ vs Control). Por el contrario, cuando las células se cultivaron en un medio con AP y altos niveles de Mg^{2+} (1,6 mM), hubo un descenso significativo en la fluorescencia derivada de H_2DCFDA ($p < 0,001$ vs AP).

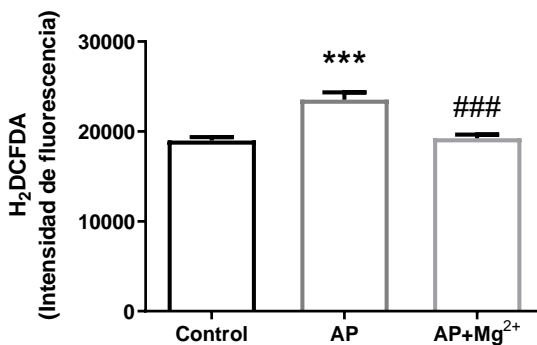


Figura 28. La suplementación con Mg^{2+} previno el aumento de producción de EROs inducido por AP en las CMLV. Las células se incubaron durante 24 horas en medio AP (3,3 mM) con una concentración normal de Mg^{2+} (0,8 mM) o suplementado con Mg^{2+} 1,6 mM (AP + Mg^{2+}). Las células incubadas en medio con concentraciones normales de P y Mg^{2+} se usaron como controles. Los niveles de EROs se midieron utilizando la sonda H_2DCFDA . Las barras se representan con medias \pm SEM ($n = 6$ /grupo, 3 experimentos). ***, $p < 0,001$ vs Control; ###, $p < 0,001$ vs AP.

En células cultivadas con AP y una concentración normal de Mg^{2+} (0,8 mM), se observó un aumento significativo en la tasa de proliferación detectada mediante el ensayo WST-1 ($p < 0,01$ vs Control). La tasa de proliferación disminuyó cuando las células se trataron con altas concentraciones de Mg^{2+} (1,6 mM) ($p < 0,05$ vs AP) (Figura 29).

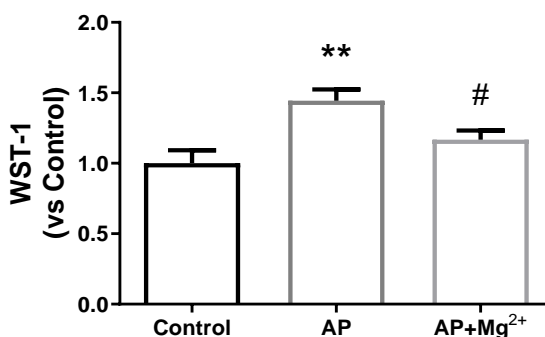


Figura 29. La suplementación con Mg^{2+} redujo la proliferación inducida en las CMLV por AP. La tasa de proliferación se valoró mediante el ensayo WST-1. Las barras representan la media \pm SEM ($n = 6$ /grupo, 3 experimentos). **, $p < 0,01$ vs Control; #, $p < 0,05$ vs AP.

Finalmente, como demostró el ensayo LDH, en células cultivadas en medio con AP + Mg^{2+} 0,8 mM ($p < 0,01$ vs Control) se observó un aumento en los niveles de muerte celular, pero se inhibió

significativamente en las células cultivadas en medio que contenía Mg^{2+} 1,6 mM ($p < 0,05$ vs AP) (Figura 30).

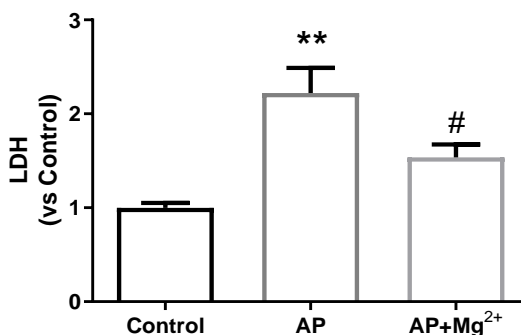


Figura 30. La suplementación con Mg^{2+} inhibió la muerte celular inducida por AP en las CMLV. La muerte celular se evaluó mediante el ensayo LDH. Las barras representan la media \pm SEM ($n=6$ /grupo, 3 experimentos). **, $p < 0,01$ vs Control; #, $p < 0,05$ vs AP.

10.2. Estudios *in vivo*

Determinaciones bioquímicas

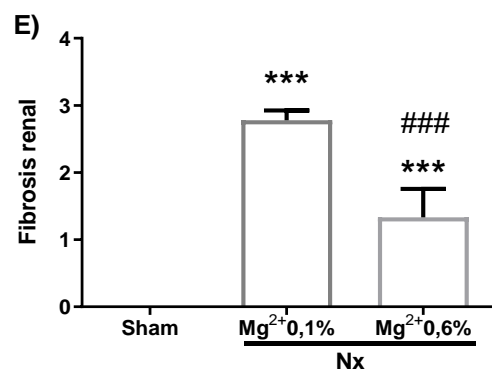
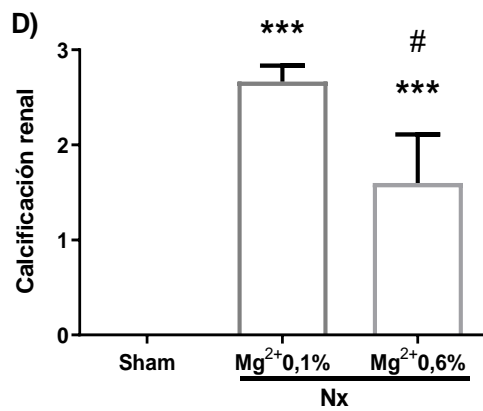
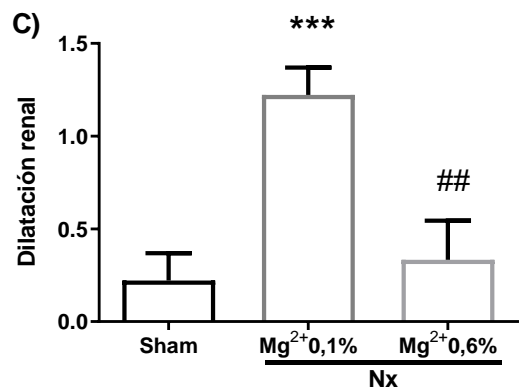
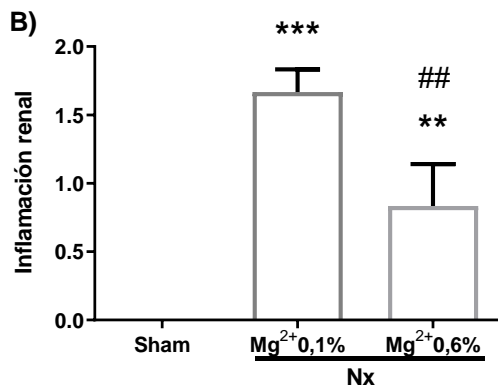
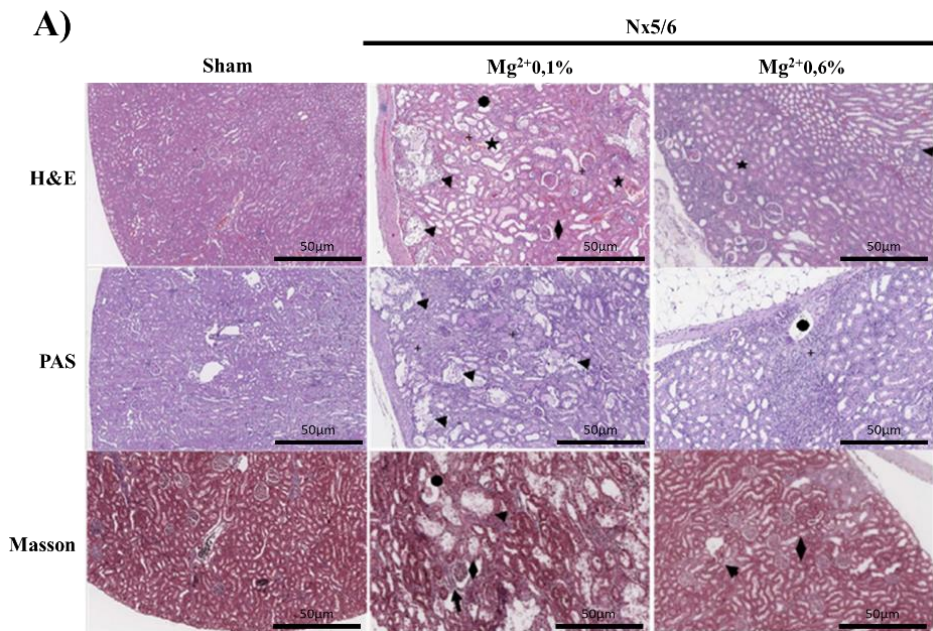
La bioquímica sanguínea de los distintos grupos experimentales se muestra en la Tabla 3. Como se esperaba, los niveles de Mg^{2+} sérico aumentaron en las ratas Nx- $Mg^{2+}0,1\%$ alimentadas con niveles normales de Mg^{2+} ($p < 0,05$ vs Sham), siendo además significativamente mayor en el grupo que recibió Mg^{2+} elevado ($p < 0,05$ vs Nx- $Mg^{2+}0,1\%$). Los animales con disfunción renal mostraron niveles reducidos de calcio iónico en suero ($p < 0,05$ vs Sham), siendo además estos niveles más bajos en ratas alimentadas con una dieta con $Mg^{2+}0,1\%$ ($p < 0,05$ vs Nx- $Mg^{2+}0,1\%$). Como cabía esperar, hubo un marcado aumento en la creatinina en las ratas Nx alimentadas con una dieta con contenido normal de Mg^{2+} (0,1%), en comparación con las ratas control ($p < 0,05$ vs Sham); a su vez, las ratas que recibieron $Mg^{2+}0,6\%$ mostraron niveles significativamente más bajos de creatinina ($p < 0,05$ vs Nx- $Mg^{2+}0,1\%$). De manera similar, las ratas Nx- $Mg^{2+}0,1\%$ tuvieron un nivel de P sérico más alto que los controles ($p < 0,05$ vs Sham); sin embargo, la hiperfosfatemia se atenuó en los animales alimentados con $Mg^{2+}0,6\%$ ($p < 0,05$ vs Nx- $Mg^{2+}0,1\%$).

Tabla 3. Determinaciones bioquímicas en plasma. Las ratas nefrectomizadas con alto contenido de P en la dieta y Mg^{2+} (0,1%) normal fueron comparadas con aquellas que recibieron suplementos dietéticos de Mg^{2+} (0,6%) durante 14 días. Como controles se usaron ratas con función renal normal alimentadas con una dieta con contenido normal en P (P 0,6%), Mg^{2+} (0,1%) y Ca^{2+} (0,6%). Los datos se expresan como media \pm SEM (n=8/grupo). *,p<0,05 vs Sham; #,p<0,05 vs Nx- Mg^{2+} 0,1%.

	Sham	Nx- Mg^{2+} 0,1%	Nx- Mg^{2+} 0,6%
Creatinina (mg/dL)	0,35 \pm 0,02	1,59 \pm 0,2*	0,98 \pm 0,1*#
Fosfato (mg/dL)	6,73 \pm 0,3	12,2 \pm 1,5*	7,54 \pm 0,4*#
Magnesio (mg/dL)	2,12 \pm 0,1	3,00 \pm 0,1*	3,26 \pm 0,1*#
Calcio iónico (mM)	1,22 \pm 0,02	1,01 \pm 0,1*	1,10 \pm 0,03*#

Evaluación del efecto del Mg^{2+} en la dieta sobre la lesión renal inducida en ratas con ERC

El examen histológico de los riñones (Figura 31A) reveló que los animales Nx- Mg^{2+} 0,1% mostraban lesiones glomerulares y tubulares renales, inflamación y aumento de la celularidad intersticial. La reacción inflamatoria, la fibrosis y la calcificación también fueron más prominentes en el grupo Nx- Mg^{2+} 0,1% que en el grupo de Nx- Mg^{2+} 0,6% (Figura 31B, 31D y 31E). En las ratas Nx- Mg^{2+} 0,1% se presentaron hallazgos inflamatorios, principalmente a nivel periglomerular y zona intertubular, donde se pudo observar inflamación mixta (linfocitos y neutrófilos). Esta inflamación apareció reducida en las ratas Nx- Mg^{2+} 0,6% en comparación con las Nx- Mg^{2+} 0,1%, lo que probablemente esté relacionado con la mayor severidad de la necrosis tubular y los cambios de calcificación encontrados en este último grupo. De manera similar, la necrosis y el daño vascular (Figuras 31C, 31F y 31G) también se redujeron considerablemente con la administración del suplemento de Mg^{2+} en la dieta.



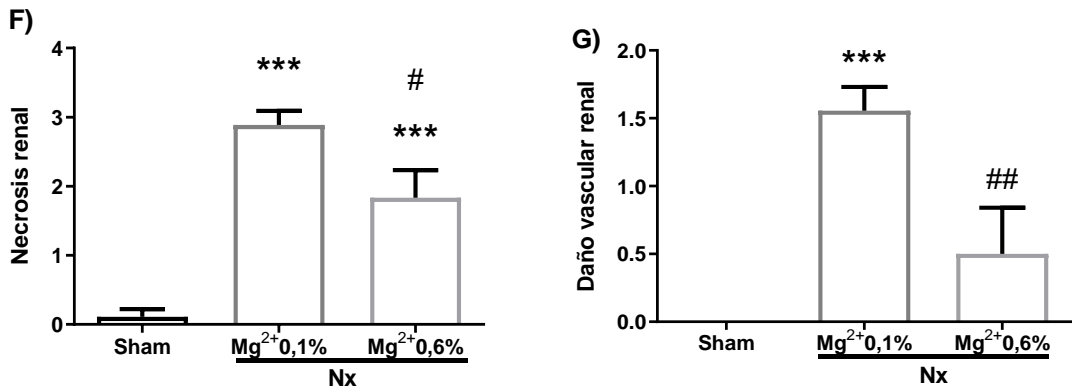
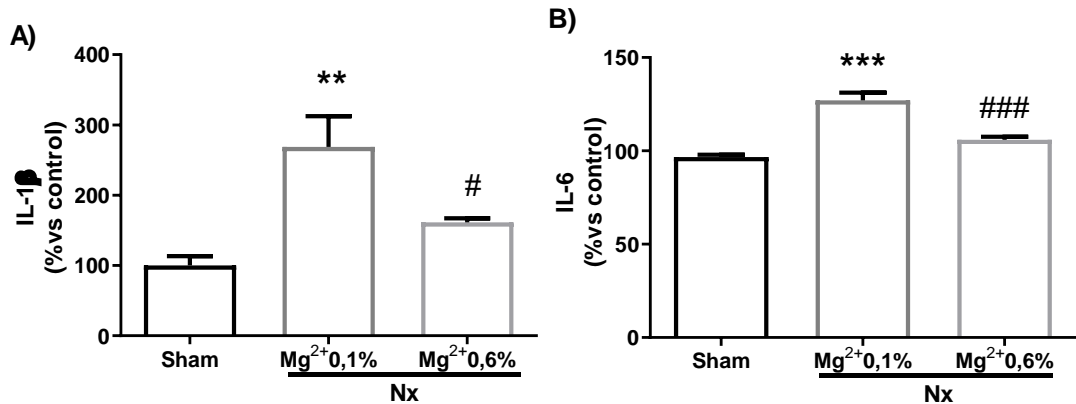


Figura 31. El suplemento de Mg²⁺ en la dieta redujo la lesión renal inducida en ratas con ERC. (A) Imágenes representativas de las tinciones de H&E, PAS y tricrómico de Masson en muestras histológicas de riñones. Punta de flecha: calcificación; estrella: necrosis tubular; círculo: dilatación vascular; rombo: dilatación glomerular; cruz: inflamación focal; flecha: fibrosis intersticial. Ampliación original: 100x. (B-G) Evaluación semicuantitativa de alteraciones renales mediante el uso de un rango de escala de intensidad de 0 a 4 como se describe en Material y Métodos. Los datos se expresan como media ± SEM. ***,p<0,001 vs Sham; #,p<0,05 vs Nx-Mg²⁺0,1%; ##,p<0,01 vs Nx-Mg²⁺0,1%; ###,p<0,001 vs Nx-Mg²⁺0,1%.

El suplemento de Mg²⁺ en la dieta disminuye la producción de citoquinas pro-inflamatorias y el estrés oxidativo en ratas con ERC

Como se muestra en la Figura 32, en ratas Nx-Mg²⁺0,1% con una dieta normal de Mg²⁺, los niveles plasmáticos de las citoquinas proinflamatorias IL-1β, IL-6 y TNF-α aumentaron significativamente con respecto al control. En comparación con este grupo de ratas urémicas, la administración de una dieta rica en Mg²⁺ (0,6%) disminuyó significativamente los niveles plasmáticos de las citoquinas pro-inflamatorias analizadas.



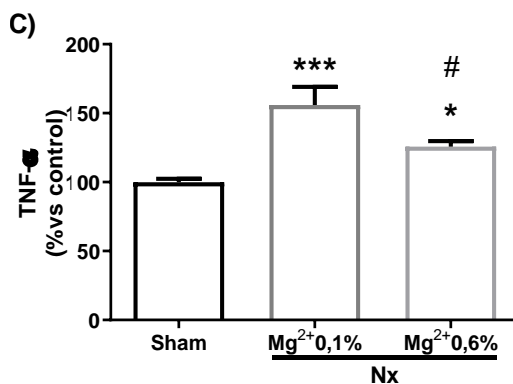


Figura 32. El suplemento de Mg²⁺ disminuyó los niveles de citoquinas proinflamatorias en el plasma de ratas con ERC. La figura representa los niveles de las citoquinas plasmáticas IL-1 β (A), IL-6 (B) y TNF- α (C) medidos mediante Bioplex en ratas controles alimentadas con una dieta con contenido normal en P y Mg²⁺ y en un modelo de rata con ERC que incluía nefrectomía 5/6 (Nx) junto con la administración de una dieta alta en P y tratamiento con calcitriol. Las ratas Nx5/6 fueron alimentadas con una dieta normal de Mg²⁺ (0,1%) o recibieron un suplemento dietético de Mg²⁺ (0,6%). Los datos son expresados como media \pm SEM (n = 8/grupo). **,p<0,01 vs Sham; ***,p<0,001 vs Sham; #,p<0,05 vs Nx-Mg²⁺0,1%; ###,p<0,001 vs Nx-Mg²⁺0,1%.

Dado que el EO está relacionado con la ERC, este proceso también fue evaluado en los grupos de estudio. Se midió en plasma la actividad de la enzima antioxidante GPx, que se induce para contrarrestar el aumento de los niveles de EROs. Como se muestra en la Figura 33, la actividad de la GPx aumentó considerablemente en ratas Nx-Mg²⁺0,1%, en comparación con las ratas control (p<0,001 vs Sham). Sin embargo, este incremento no se produjo en ratas Nx-Mg²⁺0,6% alimentadas con un suplemento de Mg²⁺ (p<0,001 vs Nx-Mg²⁺0,1%).

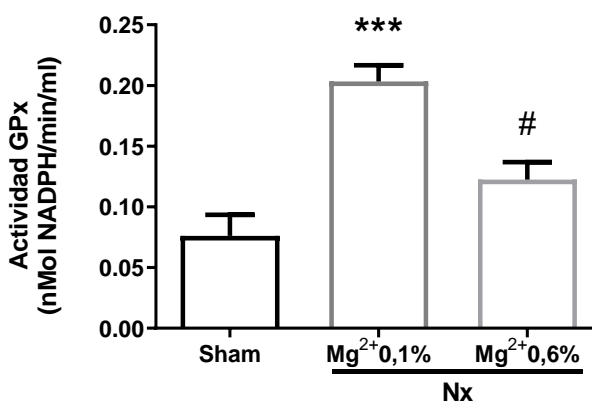


Figura 33. El suplemento con Mg²⁺ en la dieta redujo la actividad de la GPx (un marcador de EO sistémico) en el plasma de ratas con ERC. Las ratas nefrectomizadas con alto contenido de P en la dieta y Mg²⁺ (0,1%) normal fueron comparadas con aquellas que recibieron suplementos dietéticos de Mg²⁺ (0,6%) durante 14 días. Como controles se usaron ratas con función renal normal alimentadas con una dieta con contenido normal en P (P 0,6%) y Mg²⁺ (0,1%). El suplemento con Mg²⁺ en la dieta redujo la actividad de la GPx (un marcador de EO sistémico) en el plasma de ratas con ERC. Los datos son expresados como valores de la media \pm SEM (n = 8/grupo). ***,p<0,005 vs Sham; #,p<0,05 vs Nx-Mg²⁺0,1%.

El suplemento dietético de Mg²⁺ reduce la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y el daño tisular en tejido aórtico de ratas con ERC

A continuación, analizamos específicamente el grado de inflamación en el tejido aórtico (Figura 34). El patrón de expresión de todas las citoquinas estudiadas a nivel de ARNm reflejó lo observado a nivel proteico en plasma.

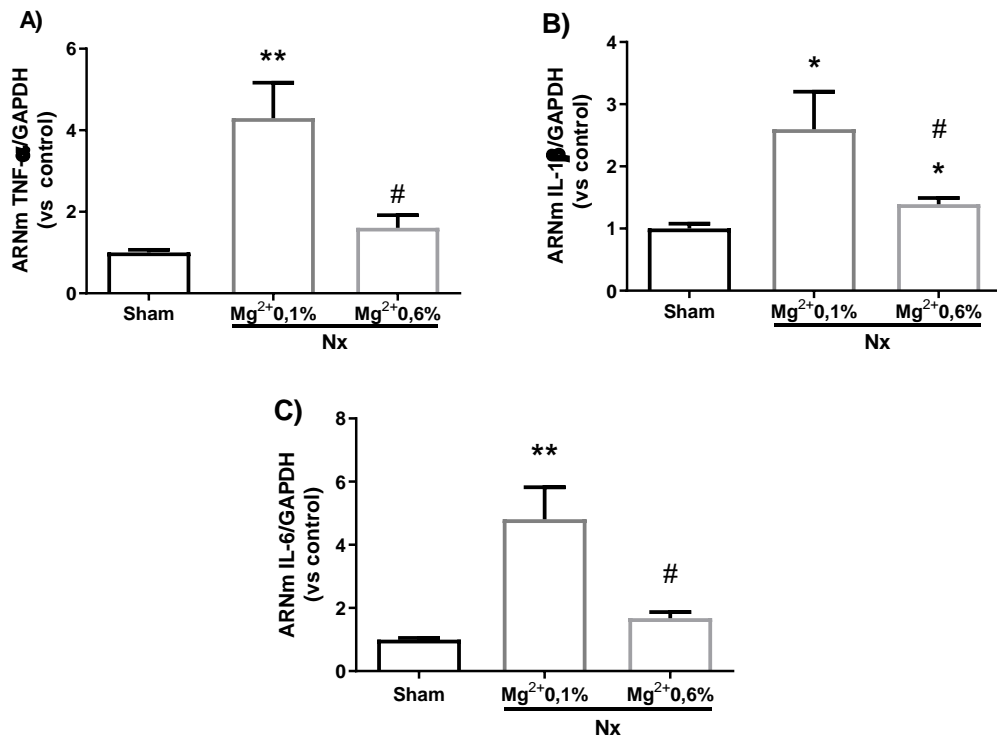


Figura 34. El suplemento dietético con Mg²⁺ reduce la expresión de citoquinas proinflamatorias en el tejido aórtico. La figura representa los niveles de ARNm de las citoquinas TNF- α (A), IL-1 β (B) e IL-6 (C), medidos mediante RT-PCR a tiempo real. Se utilizó un modelo de rata de ERC que incluía una nefrectomía 5/6 (Nx) más una dieta alta en P (1,2%) y un tratamiento con CTR. Las ratas Nx fueron alimentadas con una dieta normal de Mg²⁺ (0,1%) o recibieron un suplemento dietético de Mg²⁺ (0,6%). Las ratas controles con operación alimentadas con una dieta normal de P y Mg²⁺ sirvieron como controles. Los datos son expresados como valores de la media \pm SEM (n = 8/grupo). *, p<0,05 vs Sham; **, p<0,01 vs Sham; #, p<0,05 vs Nx-Mg²⁺0,1%.

Además, a nivel histológico observamos que el suplemento de Mg²⁺ en la dieta (Mg²⁺0,6%) redujo significativamente el grado de inflamación de la aorta, el daño vascular y la dilatación observada en las ratas Nx-Mg²⁺0,1% (Figura 35B-E). En las aortas del grupo Control se observó una estructura parenquimatosa conservada sin inflamación, necrosis o fibrosis. Además, como ya habíamos demostrado previamente en un estudio previo de nuestro grupo [109], también se observó una

reducción de la calcificación vascular en las ratas Nx-Mg²⁺ 0,6% en comparación con el grupo Nx-Mg²⁺0,1%. Por lo tanto, el suplemento con Mg²⁺ redujo específicamente la expresión de citoquinas proinflamatorias y el daño vascular en aorta torácica.

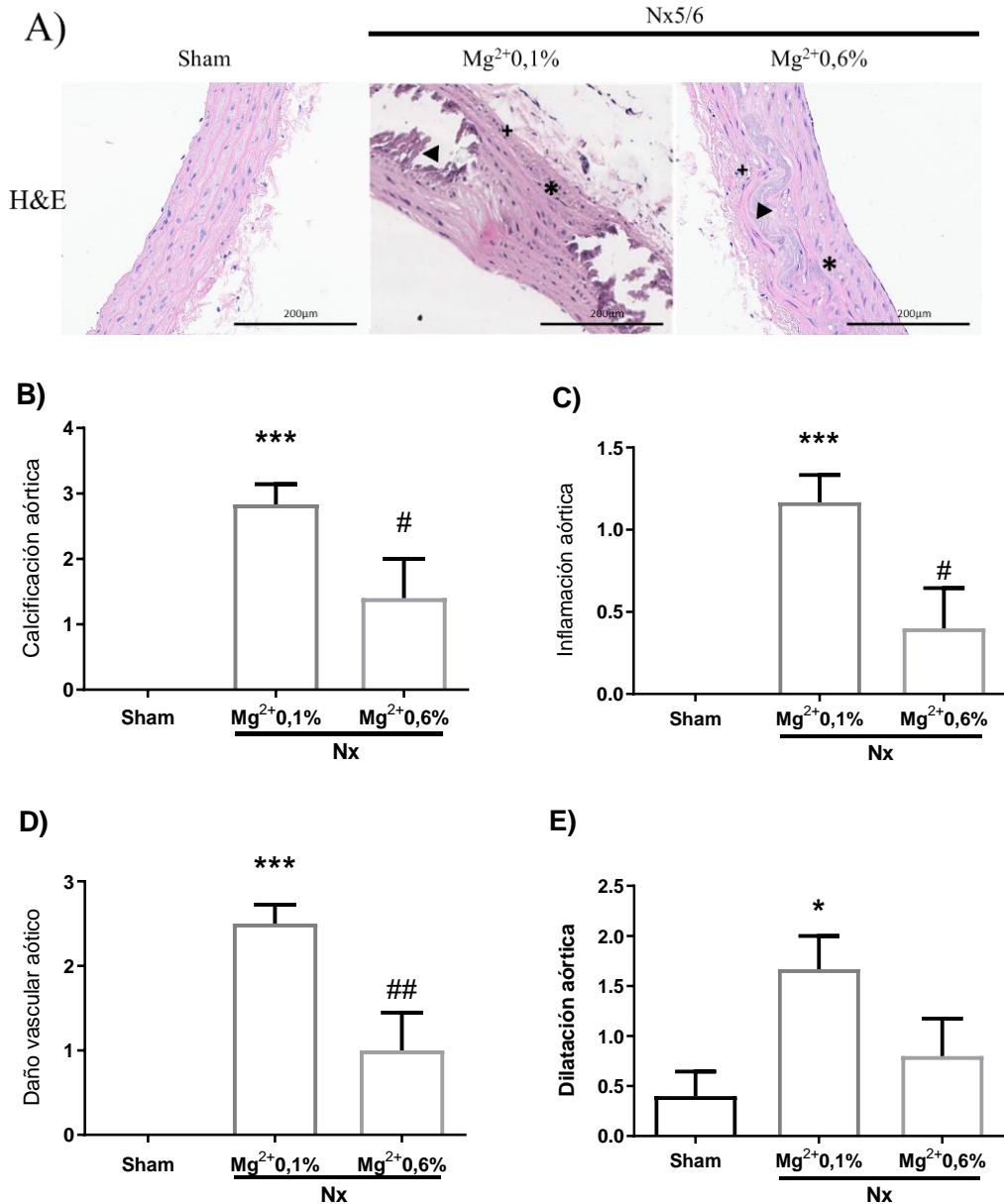


Figura 35. El suplemento dietético con Mg²⁺ redujo la lesión histológica inducida en aorta torácica de ratas con ERC. (A) Tinciones de H&E representativas en muestras histológicas de aorta. Punta de flecha: calcificación; asterisco: remodelación; cruz: inflamación focal. Ampliación original: 100x. (B-E) Evaluación semicuantitativa de alteraciones aórticas mediante el uso de un rango de escala de intensidad de 0 a 4 como se describe en material y métodos. Los datos son expresados como valores de la media ± SEM. *,p<0,05 vs Sham;***,p<0,001 vs Sham; #,p<0,05 vs Nx-Mg²⁺0,1; ##,p<0,01 vs Nx-Mg²⁺0,1.

11. EFECTO DEL SUPLEMENTO DIETÉTICO DE Mg^{2+} SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO, LA INFLAMACIÓN Y LA DISFUNCIÓN VASCULAR EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE SÍNDROME METABÓLICO CON ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

Los resultados de los parámetros bioquímicos de los diferentes grupos experimentales se recogen en la Tabla 4. Como era de esperar, las ratas SMet+Nx alimentadas con $Mg^{2+}0,1\%$ (SMet+Nx- $Mg^{2+}0,1\%$) mostraron niveles superiores de Mg^{2+} en plasma con respecto a las ratas controles ($p<0,05$ vs SMet). Cuando se consideraron los grupos experimentales urémicos, se observó un aumento en la concentración tanto plasmática como urinaria de Mg^{2+} en las ratas alimentadas con Mg^{2+} elevado ($p<0,05$ vs SMet+Nx- $Mg^{2+}0,1\%$). En comparación con el grupo control, la creatinina en plasma aumentó en el grupo de ratas SMet+Nx- $Mg^{2+}0,1\%$ ($p<0,05$ vs SMet). Del mismo modo, el suplemento con Mg^{2+} resultó en una disminución significativa de los valores de creatinina plasmática respecto al grupo SMet+Nx- $Mg^{2+}0,1\%$. El P en plasma y orina también aumentó en las ratas SMet+Nx- $Mg^{2+}0,1\%$ comparado con las ratas controles ($p<0,05$ vs SMet). Sin embargo, estos niveles resultaron ser significativamente más bajos tras administrar el suplemento de Mg^{2+} cuando se compararon con ratas SMet+Nx- $Mg^{2+}0,1\%$ con concentraciones normales de Mg^{2+} en la dieta ($p<0,05$ vs SMet+Nx- $Mg^{2+}0,1\%$). Los datos de fosfaturia y fosfatemia se relacionan con los observado de FGF23 intacto, donde las ratas SMet+Nx- $Mg^{2+}0,1\%$ experimentan un incremento significativo respecto a los controles ($p<0,05$ vs SMet). Sin embargo, se detectó un descenso significativo de FGF23 intacto en las ratas SMet+Nx- $Mg^{2+}0,6\%$ ($p<0,05$ vs SMet+Nx- $Mg^{2+}0,1\%$). La cepa de ratas Zucker presenta hiperglucemia. Tras la nefrectomía, los valores de glucosa aumentaron en el grupo SMet+Nx- $Mg^{2+}0,1\%$ ($p<0,05$ vs SMet). El suplemento dietético de Mg^{2+} (0,6%) no indujo cambios significativos en glucosa con ningún grupo. Una de las anomalías presentes en el SMet y ERC es la dislipidemia. Como se observa, tras una administración dietética de Mg^{2+} los niveles de colesterol total y LDL+VLDL descendieron significativamente, mientras que los de colesterol HDL aumentaron ($p<0,05$ vs SMet+Nx- $Mg^{2+}0,1\%$).

Tabla 4. Determinaciones bioquímicas plasmáticas. Para el modelo de ERC con SMet se utilizaron ratas Zucker nefrectomizadas 5/6 (Nx) alimentadas con una dieta alta en P (Ca²⁺0,6% y P 0,9%) y a las que se administró CTR. Esta dieta contenía niveles normales (0,1%) o elevados de Mg²⁺ (0,6%). Los experimentos tuvieron una duración de 28 días. Ratas sham, alimentadas con una dieta normal en P (P 0,6%) y en Mg²⁺ (0,1%), sirvieron como controles. Los datos se representan como valores de las medias \pm SEM (n=8/grupo) *,p<0,05 vs SMet; ***,p<0,001 vs SMet; #,p<0,05 vs SMet+Nx-Mg²⁺0,1%; ##,p<0,01 vs SMet+Nx-Mg²⁺0,1%.

	SMet	SMet+Nx-Mg²⁺0,1%	SMet+Nx-Mg²⁺0,6%
Creatinina (mg/dL)	0,52 \pm 0,1	1,59 \pm 0,2*	0,99 \pm 0,1*##
Fosfato (mg/dL)	8,75 \pm 0,4	13,05 \pm 0,9*	10,63 \pm 0,4*##
Magnesio (mg/dL)	2,30 \pm 0,2	3,97 \pm 0,3*	6,24 \pm 0,8*##
Glucosa (mg/dL)	269 \pm 54,5	426,7 \pm 34,5*	297,7 \pm 35,1
FGF23 (pg/mL)	692,5 \pm 32,2	2275 \pm 270,1***	1229 \pm 142,1##
Colesterol total (mg/dL)	256,2 \pm 19,5	326 \pm 13,5**	285,3 \pm 19,6#
HDL (mg/dL)	67,06 \pm 0,6	64,05 \pm 7,6	82,7 \pm 5,6*##
LDL+VLDL (mg/dL)	189,1 \pm 19,8	256,6 \pm 14**	202,6 \pm 14,9#
Fosfato urinario (mg/24h)	2,98 \pm 0,4	24,97 \pm 2,3*	12,11 \pm 0,8*##
Calcio urinario (mg/24h)	0,63 \pm 0,2	3,57 \pm 0,5***	1,27 \pm 0,4##
Magnesio urinario (mg/24h)	7,08 \pm 1,3	3,37 \pm 0,2*	8,02 \pm 0,9#

Efecto del suplemento de Mg²⁺ sobre la expresión renal de Klotho

Por otro lado, se analizó el efecto del suplemento de Mg²⁺ sobre la expresión de Klotho a nivel renal (Figura 36). Se encontró un descenso en la expresión de Klotho asociado a la ERC (p<0,05 vs SMet). Tras la administración del suplemento de Mg²⁺ en la dieta, la expresión de Klotho mejoró en el grupo SMet+Nx-Mg²⁺0,6% (p<0,05 vs SMet+Nx-Mg²⁺0,1%).

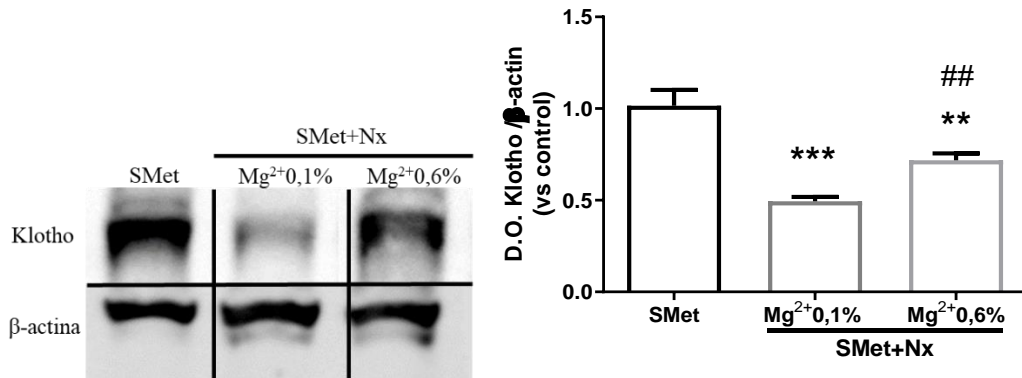


Figura 36. El suplemento de Mg²⁺ incrementa los niveles de Klotho renal en ratas con ERC y SMet, cuya expresión se encuentra reducida respecto de la observada en animales con SMet y función renal normal. La expresión de αKlotho se determinó mediante Western blot en extractos proteicos de riñón. Cada imagen se tomó originalmente de la misma membrana. Las imágenes son representativas de tres experimentos diferentes. Los datos se presentan como valores de la media ± SEM (n=8/grupo). **,p<0,01 vs SMet; ***,p<0,001 vs SMet; ##,p<0,01 vs SMet+Nx-Mg²⁺0,1%.

El suplemento dietético de Mg²⁺ redujo la disfunción vascular asociada al SMet y la ERC *in vivo*

Tras el periodo de tratamiento de 28 días, se determinó la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD). Como se esperaba en esta cepa de ratas, se observaron valores elevados de PAS (Figura 37A) (150±9,04 mmHg) y PAD (Figura 37B) (107±6,16 mmHg) en las ratas control sin nefrectomizar [194]. Los valores de PA aumentaron significativamente en el grupo SMet+Nx-Mg²⁺0,1% (PAS=200±3,80 mmHg; PAD=153±4,75 mmHg) y disminuyeron con la administración del suplemento de Mg²⁺ en la dieta (PAS=157±3,98 mmHg; PAD=118±3,69 mmHg) en donde se encontraron valores de presión similares a los del grupo control.

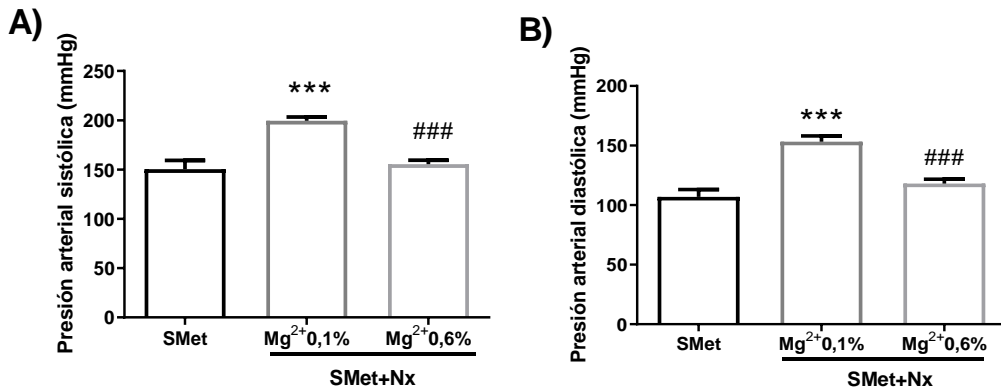


Figura 37. Efecto del suplemento dietético de Mg²⁺ sobre la presión arterial. Zucker nefrectomizadas 5/6 (Nx) fueron alimentadas con una dieta P0,9% y niveles normales (0,1%) o elevados de Mg²⁺ (0,6%), a las que se administró CTR durante de 28 días. A 25 días, la presión arterial sistólica A) y diastólica B) de los grupos experimentales fueron medidas. Los datos son mostrados como valores de la media ± SEM (n=8/grupo). ***,p<0,001vs SMet; ###,p<0,001 vs SMet+Nx-Mg²⁺0,1%.

Con relación a los niveles de ET-1 (Figura 38A), en los animales SMet+Nx-Mg²⁺0,1% se produjo un aumento significativo que no se observó en el grupo de animales que recibieron una dieta suplementada en Mg²⁺0,6%. Respecto al NO, se encontró un descenso significativo en el grupo de animales SMet+Nx-Mg²⁺0,1% con dieta normal. Sin embargo, los animales con suplemento de Mg²⁺ en la dieta no mostraron cambios en los niveles de NO.

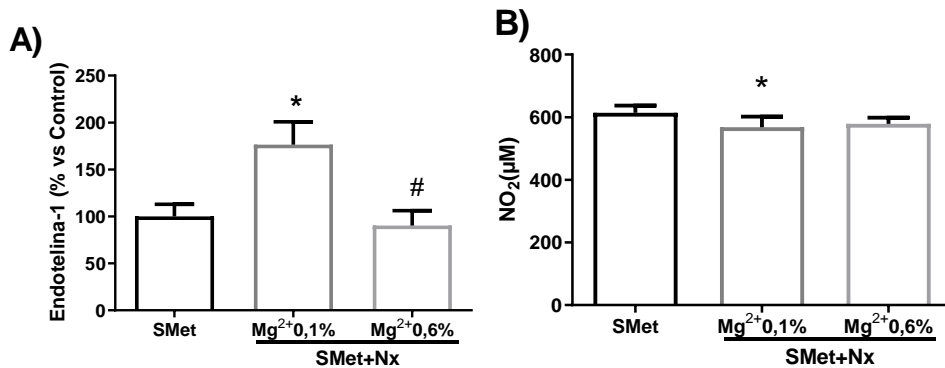


Figura 38. Efecto del suplemento dietético de Mg²⁺ sobre la producción de ET-1 y NO en ratas con ERC y SMet. Las ratas Zucker nefrectomizadas con alto contenido de P en la dieta y Mg²⁺ (0,1%) normal fueron comparadas con aquellas que recibieron suplementos dietéticos de Mg²⁺ (0,6%) durante 28 días. Como controles se usaron ratas Zucker con función renal normal alimentadas con una dieta con contenido normal en P (P 0,6%) y Mg²⁺ (0,1%). Se midió en muestras de plasma los cambios en la producción de A) ET-1 y B) NO entre los grupos experimentales. Los datos son expresados como valores de la media ± SEM (n=8/grupo). *,p<0,05 vs SMet; #,p<0,05 vs SMet+Nx-Mg²⁺0,1%.

El suplemento dietético de Mg²⁺ disminuyó la producción de citoquinas pro-inflamatorias en el tejido aórtico inducida en ratas con SMet y ERC

Como se muestra en la Figura 39, la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-1β y IL-6 en la aorta aumentó significativamente en las ratas SMet+Nx-Mg²⁺0,1% alimentadas con una dieta normal en Mg²⁺ en comparación con las ratas controles. Este aumento no se observó en las ratas que recibieron la dieta con 0,6 % de Mg²⁺, donde se produjo un descenso significativo de expresión de estas citoquinas entre ambos grupos Nx (p<0,05 vs SMet+Nx-Mg²⁺0,1%).

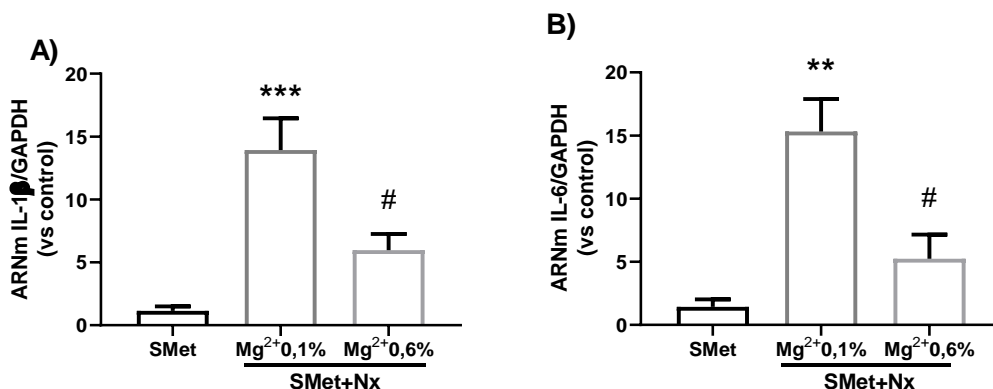


Figura 39. El suplemento de Mg²⁺ en la dieta disminuyó la expresión de citoquinas proinflamatorias en la aorta torácica de ratas con ERC y SMet. Se utilizó un modelo de rata de ERC y SMet que incluía una nefrectomía 5/6 (Nx) más una dieta alta en P (0,9%) y un tratamiento con CTR. Las ratas Nx fueron alimentadas con una dieta normal de Mg²⁺ (0,1%) o recibieron un suplemento dietético de Mg²⁺ (0,6%). Las ratas Zucker con operación alimentadas con una dieta normal de P y Mg²⁺ sirvieron como controles. Se evaluaron los niveles de expresión génica en aorta torácica de IL-1β (A) y IL-6 (B). Los datos son expresados como valores de la media ± SEM (n = 8/grupo). **p<0,01 vs SMet; ***p<0,001 vs SMet; #,p<0,05 vs SMet+Nx-Mg²⁺0,1%.

Puesto que, como se ha observado, el daño renal y la disfunción vascular se relacionan con la expresión génica de citoquinas inflamatorias, se determinó a través de Western Blot la modulación del sistema de señalización NF-κB tras la administración del suplemento dietético de Mg²⁺ (Figura 40). Los resultados obtenidos revelaron un aumento en la translocación nuclear de p65-NF-κB en las ratas SMet+Nx-Mg²⁺0,1% alimentadas con dieta normal. Sin embargo, se observó un descenso significativo de p65 en el grupo con dieta Mg²⁺0,6%, no encontrándose diferencias entre este grupo y el grupo control.

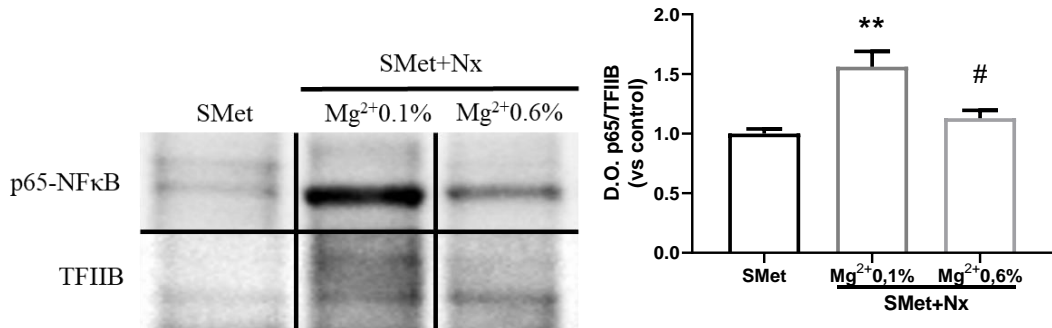


Figura 40. El suplemento de Mg²⁺ previno la activación de la vía de señalización de NF-κB en ratas con ERC y SMet. Ratas SMet+Nx fueron alimentadas con una dieta normal de Mg²⁺ (0,1%) o suplementada (0,6%) durante 28 días, usando como control ratas SMet con dieta normal de Mg²⁺ (0,1%). Se determinó la proteína p65-NF-κB mediante Western blot en extractos nucleares de aorta. Cada imagen se tomó originalmente de la misma membrana. Las imágenes son representativas de tres experimentos diferentes. Los datos son expresados como valores de la media ± SEM (n=8/grupo). **p<0,01 vs SMet; #p<0,05 vs SMet+Nx-Mg²⁺0,1%.

El suplemento dietético de Mg²⁺ disminuyó el estrés oxidativo inducido en ratas con SMet y ERC

Como muestra la Figura 41, el suplemento de Mg²⁺ en la dieta disminuyó la producción de IL-6 respecto de la observada en las ratas Nx alimentadas con una dieta basal de Mg²⁺ (0,1%). Estos resultados corroboran los niveles de expresión de IL-6 observados en el tejido aórtico.

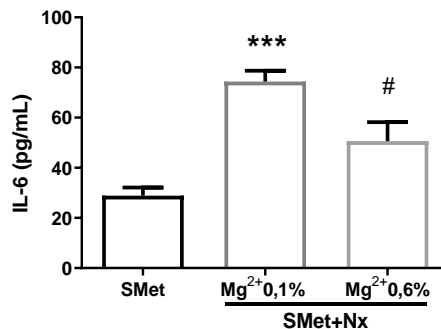


Figura 41. El suplemento de Mg²⁺ previno la producción de la citoquina inflamatoria IL-6 en ratas con ERC y SMet. Niveles plasmáticos de IL-6 en ratas medidos mediante ELISA en ratas con ERC (Nx) y SMet con una dieta alta en P (0,9%) y normal de Mg²⁺ (0,1%) o recibieron un suplemento dietético de Mg²⁺ (0,6%), además con un tratamiento con CTR. Se usó como controles ratas Zucker con operación alimentadas con una dieta normal de P y Mg²⁺. Los resultados son expresados como valores de la media ± SEM (n=8/grupo). ***p<0,001 vs SMet; #p<0,05 vs SMet+Nx-Mg²⁺0,1.

Ya que la ER y el SMet conllevan un aumento de EO, analizamos en el plasma los efectos del suplemento de Mg²⁺ sobre dicho proceso, evaluando la actividad de la GPx y los niveles de MDA

(Figura 42A-B). Los resultados muestran que, concomitantemente al desarrollo de la ER, en las ratas Nx-Mg²⁺0,1% se produce una disminución significativa (p<0,001 vs SMet) de la actividad de la enzima GPx así como un aumento significativo de los niveles de MDA (Figura 42A). La actividad de la GPx aumentó mientras que la peroxidación lipídica disminuyó significativamente tras la administración del suplemento dietético de Mg²⁺ (0,6%) (p<0,05 vs SMet+Nx-Mg²⁺0,1% en ambos casos). Por último, se observó una correlación inversa significativa entre la actividad GPx y los niveles de MDA (Figura 42C).

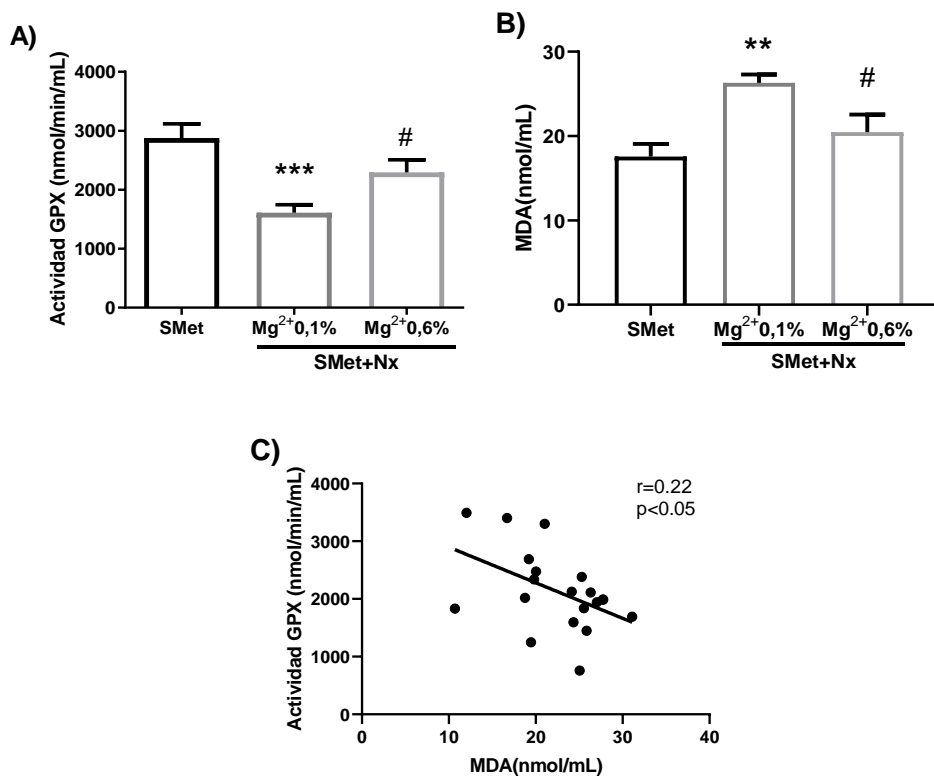


Figura 42. El suplemento de Mg²⁺ en la dieta disminuyó el estrés oxidativo en un modelo experimental de ERC y SMet. A) El suplemento de Mg²⁺ incrementó la actividad de la enzima antioxidante GPx, y redujo B) los niveles de peroxidación lipídica. C) Correlación inversa significativa entre la actividad GPx y los niveles de MDA. Los resultados son expresados como valores de la media ± SEM (n=8/grupo). **,p<0,01 vs SMet; ***,p<0,001 vs SMet; #,p<0,05 vs SMet+Nx-Mg²⁺ 0,1%.

El suplemento dietético con Mg²⁺ restaura las alteraciones de los marcadores proteómicos del SMet, la ERC y la disfunción vascular

Las proteínas cuantificadas en el plasma se analizaron con el algoritmo PLSDA para discriminar los tres grupos experimentales. Los resultados se muestran en la Figura 43, donde puede

observarse una clara estratificación según la inducción de la ERC (controles frente a animales nefrectomizados) a lo largo del primer componente, que también separa en gran medida a los grupos nefrectomizados que recibieron las diferentes cargas de Mg^{2+} en la dieta.

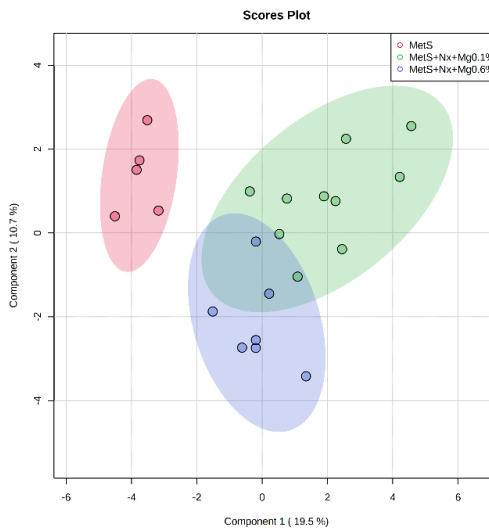


Figura 43. Resultados del algoritmo PLS-DA.

Posteriormente se realizó un estudio ANOVA de los tres grupos muestrales. Se encontraron un total de 22 proteínas expresadas diferencialmente entre las condiciones evaluadas con un valor de $p < 0,05$ (Figura 44).

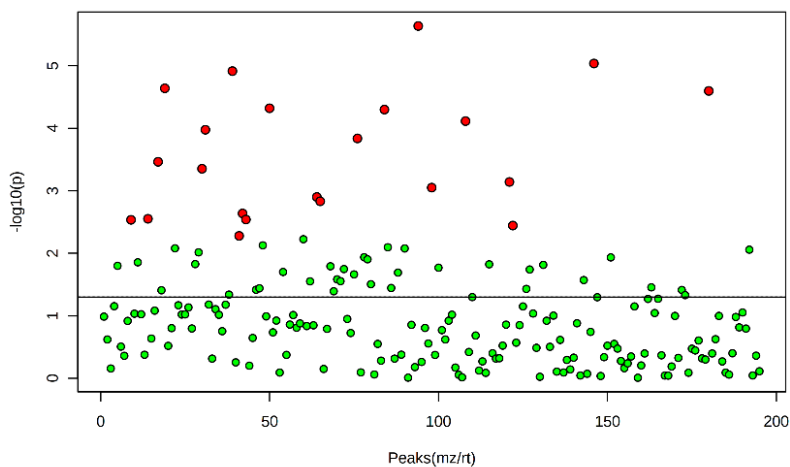


Figura 44. Análisis ANOVA unidireccional por el método LSD de Fisher de 195 proteínas con $p < 0,05$.

Se llevó a cabo un clustering u ordenamiento de los grupos experimentales en función de la abundancia relativa normalizada de cada proteína mediante un mapa de calor jerárquico (Figura 45). Como se puede visualizar claramente, se observa la división de dos clusters. En el primer cluster los grupos con nefrectomía (SMet+Nx-Mg²⁺0,1% y SMet+Nx-Mg²⁺0,6%) presentan una abundancia relativa menor respecto al grupo control, frente al segundo cluster donde la nefrectomía las aumenta. El grupo con suplemento de Mg²⁺ (SMet+Nx-Mg²⁺0,6%) muestra a su vez un cambio de abundancia respecto al grupo SMet+Nx-Mg²⁺0,1% en ambos clusters.

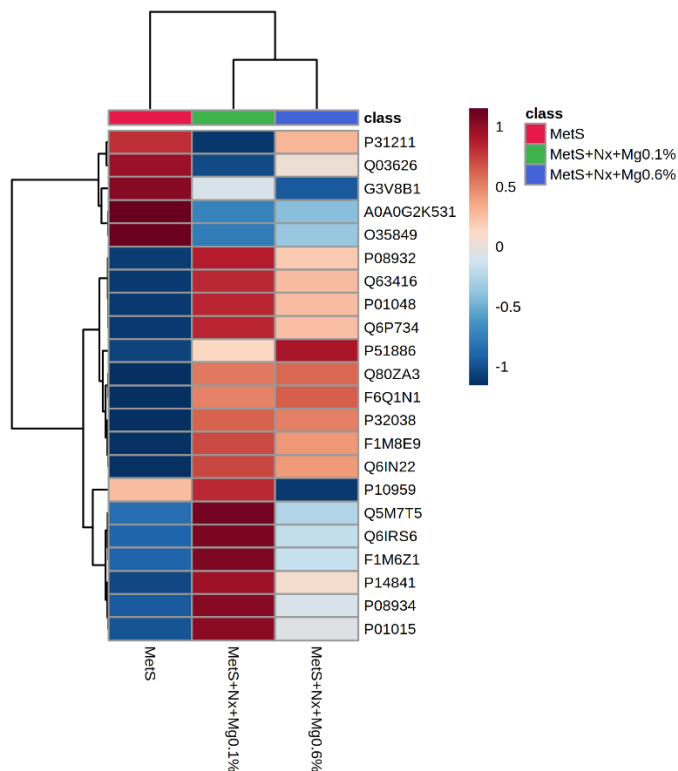


Figura 45. Mapa de calor de las 22 proteínas significativas.

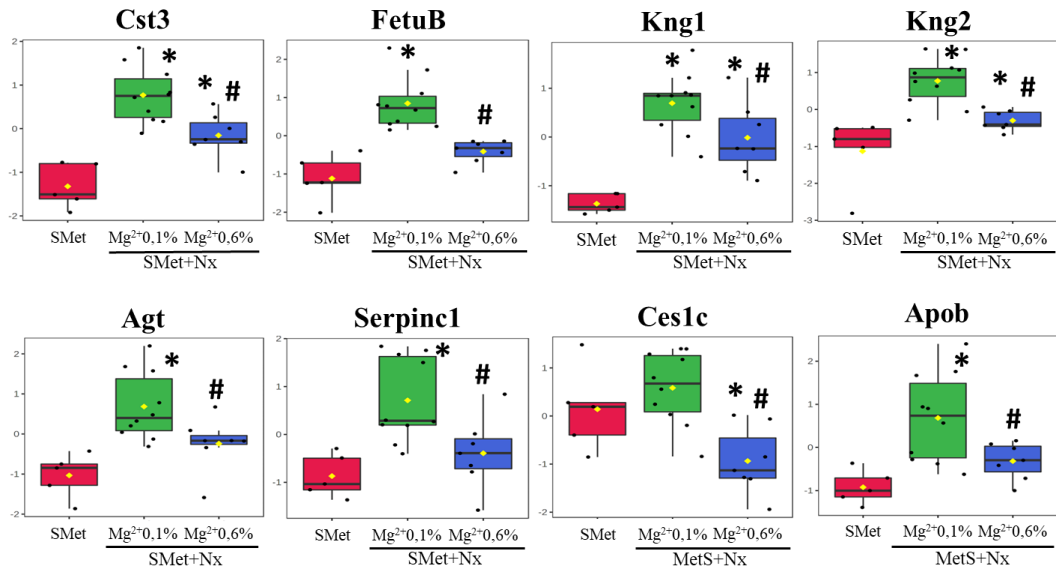
A continuación, en la Tabla 5 se detalla la información de cada una de las 22 proteínas significativas. La significación obtenida con el test LSD de Fisher mostró 11 proteínas diferencialmente expresadas entre los grupos SMet+Nx-Mg²⁺0,1% vs SMet+Nx-Mg²⁺0,6% (Figura 46A). En 8 de estas 11 proteínas, el suplemento de Mg²⁺ en ratas nefrectomizadas produjo un descenso significativo de expresión frente al grupo SMet+Nx-Mg²⁺0,1% (Cistatina-C (Cst3), Fetuina B (Fetub), Cininógeno-1 (Kng1), Cininógeno-2 (Kng2), Angiotensinógeno (Agt), Antitrombina III (Serpinc1), Carboxilasterasa

1C (Ces1c) y Apolipoproteína B-100 (Apob)) (Figura 46A), mientras que 3 proteínas presentaron un aumento de expresión (Lumican, Globulina transportadora de corticoides (Serpina6) y Muriglobulina-1 (Mug1)) (Figura 46B).

Tabla 5. Proteínas diferencialmente expresadas en plasma de rata con SMet-ERC.

Acceso proteína	Gen	Proteína	p-value	Fisher's LSD		
				MetS vs MetS+Nx+Mg0.1%	MetS vs MetS+Nx+Mg0.6%	MetS+Nx+Mg0.1% vs MetS+Nx+Mg0.6%
A0A0G2K531	Gpx3	Glutatión peroxidasa 3	0,00	↓	↓	
P14841	Cst3	Cistatina-C	0,00	↑	↑	↓
Q6IRS6	Fetub	Fetuna B	0,00	↑		↓
P08932	Kng1	Cinínógeno-1	0,00	↑	↑	↓
F1M8E9	Lyz2	Lisozima	0,00	↑	↑	
Q80ZA3	Serpinf1	α-2 antiplasmina	0,00	↑	↑	
F6Q1N1	F13b	Cadena B del factor de coagulación XIII	0,00	↑	↑	
P51886	Lum	Lumican	0,00	↑	↑	↑
P08934	Kng2	Cinínógeno-2	0,00	↑	↑	↓
P01048	Map1	T-cinínógeno-1	0,00	↑	↑	
Q63416	Itih3	Cadena pesada del inhibidor de la inter-α-tripsina H3	0,00	↑	↑	
Q6P734	Serping1	Inhibidor de la proteasa plasmática C1	0,00	↑	↑	
Q6IN22	Ctsb	Catepsina B	0,00	↑	↑	
P32038	Cfd	Factor del complemento D	0,00	↑	↑	
P31211	Serpina6	Globulina transportadora de corticoides	0,00	↓		↑
P01015	Agt	Angiotensinógeno	0,00	↑		↓
Q5M7I5	Serpinc1	Antitrombina-III	0,00	↑		↓
Q03626	Mug1	Murinoglobulina-1	0,00	↓		↑
P10959	Ces1c	Carboxilesterasa 1C	0,00		↓	↓
F1M6Z1	Apob	Apolipoproteína B-100	0,00	↑		↓
O35849	Lcat	Fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa	0,00	↓	↓	
G3V8B1	Gpld1	Fosfolipasa D específica de fosfatidilinositol-glicano	0,01	↓	↓	

A)



B)

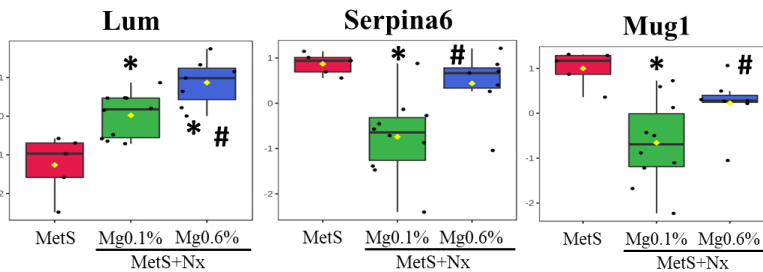


Figura 46. Diagrama de cajas de las proteínas diferencialmente expresadas entre los grupos SMet+Nx-Mg²⁺0,1% vs SMet+Nx-Mg²⁺0,6%. El grupo SMet está representado en color rojo, el grupo SMet+Nx-Mg²⁺0,1% en color verde y el grupo Nx-Mg²⁺0,6% en color azul. Se usó el análisis ANOVA unidireccional por el método LSD de Fisher. A) Proteínas que presentan un descenso de expresión tras el suplemento de Mg²⁺ en el grupo Nx. B) Proteínas que aumentan su expresión en ratas SMet+Nx+Mg²⁺0,6%. *,p<0,05 vs SMet; #,p<0,05 vs SMet+Nx-Mg²⁺0,1%.

La interacción de las 22 proteínas diferencialmente significativas se analizó con la base de datos STRING (Figura 47A). Las proteínas glutatión peroxidasa 3 (Gpx3) y T-cinógeno 1 (Map1) no fueron admitidas por la base de datos. Como se observa en la red IPP, casi la totalidad de las proteínas muestran asociaciones. Las asociaciones del IPP sugirieron 3 clusters relacionadas con la activación del sistema inmune, la regulación de la hemostasia y marcadores de función renal (Figura 47B).

RESULTADOS

Las proteínas expresadas diferencialmente se introdujeron en la base de datos Reactome para obtener el conjunto de rutas proteómicas en las que están implicadas. Las proteínas Fetub, Map1, α -2 antiplasmina (Serpinf1) y Ces1c no fueron reconocidas por la base de datos. El análisis Reactome mostró un conjunto de rutas relacionadas con 1) el sistema inmune, 2) hemostasia, 3) metabolismo de proteínas, 4) unión y captación de ligandos por receptores scavenger, 5) ensamblaje, remodelado y aclaramiento de lipoproteínas en plasma, 6) regulación del metabolismo de proteínas por el receptor α activado por proliferador peroxisomal (PPAR α), 7) desintoxicación de EROs y 8) receptor de unión a ligando peptídico (Figura 48). De acuerdo con el análisis Reactome, las rutas del sistema inmune, hemostasia y metabolismo de proteínas mostraron mayor enriquecimiento. Las alteraciones de estas rutas mayormente enriquecidas están fuertemente presentes en las ECV y ERC.

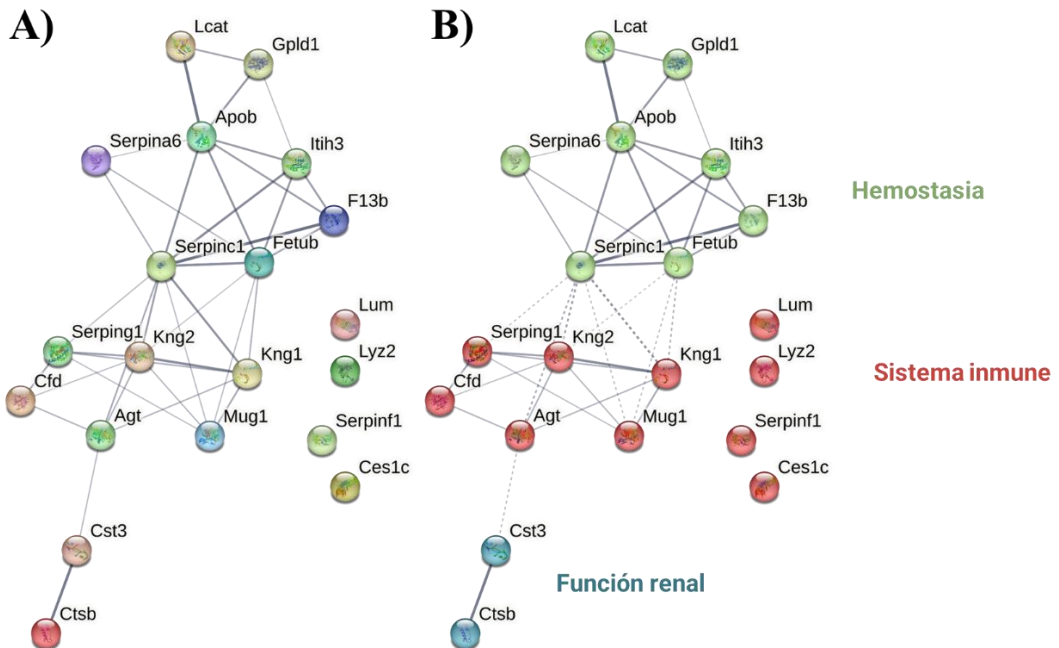


Figura 47. A) Las interacciones proteína-proteína entre las proteínas expresadas diferencialmente se determinaron utilizando la base de datos STRING. Los nodos representan las proteínas y las líneas las IPP. B) Clusters en relación a funciones similares.

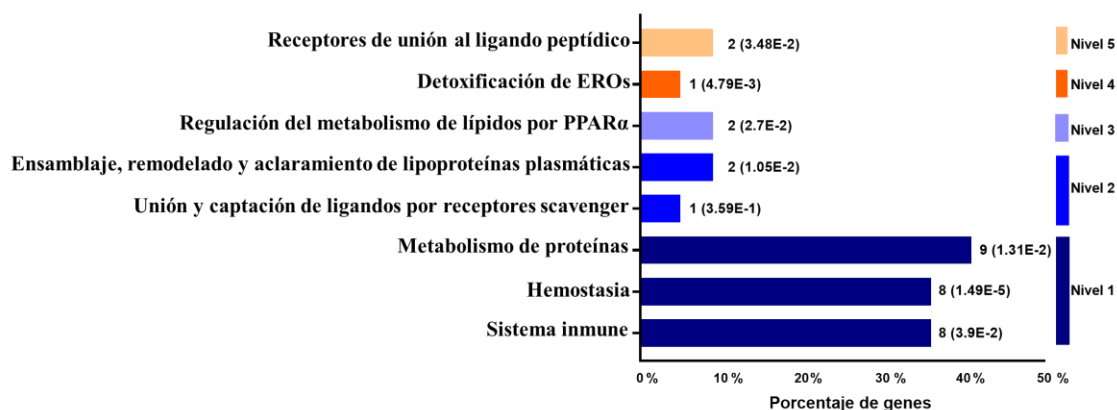


Figura 48. Enriquecimiento de las rutas proteómicas expresadas diferencialmente mediante Reactome en el modelo SMet-ERC. La abscisa representa el porcentaje de genes; la ordenada enumera las vías encontradas en Reactome. Los niveles determinan el nivel de jerarquías en sus respectivas rutas. $P < 0,05$.

- **Sistema inmune (R-HSA-168256.7)**

La ruta del sistema inmune presentó un enriquecimiento de 8 proteínas (Figura 49A). Siete de estas proteínas se regularon al alza en el grupo SMet+Nx-Mg²⁺0,1% respecto al control (Cadena B del factor de coagulación XIII (F13b), Inhibidor de la proteasa plasmática C1 (Serp1), Lisozima (Lyz2), Catepsina B (Ctsb), Factor del complemento D (Cfd), Cst3, Apob), mientras que la proteína MuG1 mostró una disminución ($p < 0,05$ vs SMet). En el grupo SMet+Nx-Mg²⁺0,6% se observaron diferencias significativas en Cst3, Apob y Mug1 respecto al grupo con nefrectomía y Mg²⁺ normal ($p < 0,05$ vs SMet+Nx-Mg²⁺0,1%). No hubo diferencias en Apob y Mug1 entre el grupo control y SMet+Nx-Mg²⁺0,6%. En la Figura 49B se proporciona la red IPP, mostrando las relaciones potenciales de las 8 proteínas presentes en las rutas jerárquicas del sistema inmune en la base de datos Reactome. El análisis de la ruta reveló un conjunto de procesos significativos relacionados con el sistema inmune: sistema inmune innato, cascadas de receptores tipo Toll, cascada del complemento, desgranulación neutrófila, presentación del antígeno MHC clase II, tráfico y procesamiento de TLR endosomal, regulación de la cascada del complemento y activación alternativa del complemento ($p < 0,05$) (Figura 49C, Tabla 6).

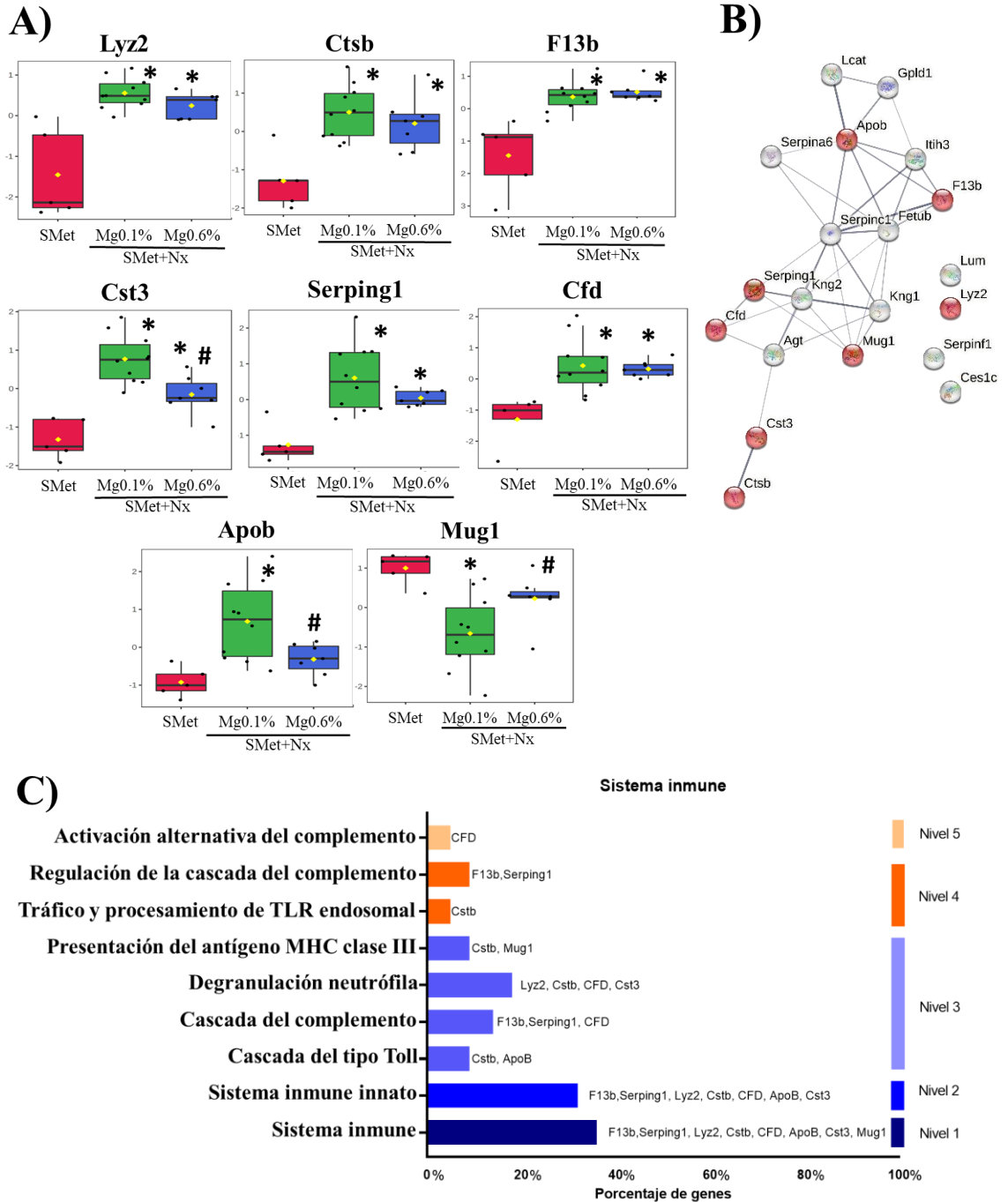


Figura 49. A) Diagrama de cajas de las proteínas diferencialmente expresadas implicadas en el sistema inmune en Reactome y B) correspondiente IPP de STRING de las proteínas (color rojo). C) Enriquecimiento de las rutas implicadas en el sistema inmune en Reactome, La abscisa representa el porcentaje de genes; la ordenada enumera las vías encontradas en Reactome, Los niveles determinan el nivel de jerarquías en sus respectivas rutas. $P < 0,05$. * $p < 0,05$ vs SMet; # $p < 0,05$ vs SMet+Nx-Mg²⁺0,1%.

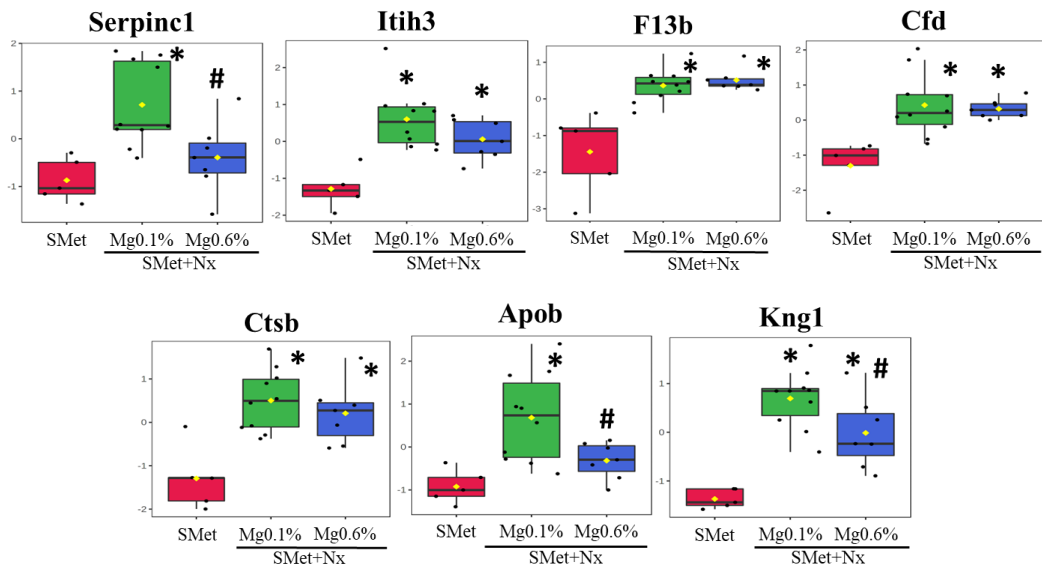
Tabla 6. Rutas significativas pertenecientes a la jerarquía de sistema inmune.

Identificación	Nombre ruta	Gen	pValue	FDR
R-HSA-168256.7	Sistema inmune	F13b	3,9E-2	7,79E-2
		Serping1		
		Lyz2		
		Cstb		
		CFD		
		ApoB		
		Cst3		
R-HSA-168249.8	Sistema inmune innato	F13b	2,93E-3	3,22E-2
		Serping1		
		Lyz2		
		Cstb		
		CFD		
		ApoB		
		Cst3		
R-HSA-168898.7	Cascadas de receptores tipo Toll	Cstb	3,72E-2	7,51E-2
		ApoB		
R-HSA-166658.4	Cascada del complemento	F13b	1,65E-3	1,98E-2
		Serping1		
		CFD		
R-HSA-6798695.2	Desgranulación neutrófila	Lyz2	5,46E-3	4,37E-2
		Cstb		
		CFD		
		Cst3		
R-HSA-2132295.3	Presentación del antígeno MHC clase II	Mug1	2,13E-2	7,51E-2
		Cstb		
R-HSA-1679131.1	Tráfico y procesamiento de TLR endosomal	Cstb	2,4E-2	7,51E-2
R-HSA-977606.5	Regulación de la cascada del complemento	F13b	1,87E-2	7,47E-2
		Serping1		
R-HSA-173736.2	Activación alternativa del complemento	CFD	9,05E-3	6,02E-2

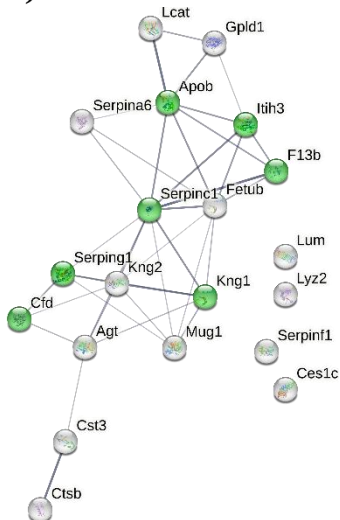
- **Hemostasia (R-HSA-109582.3)**

En el enriquecimiento de la ruta de la hemostasia se encontraron 7 proteínas (Apob, Kng1, Ctsb, Cfd, Serpinc1, F13b y Cadena pesada del inhibidor de la inter- α -tripsina H3 (Itih3)) que se

regularon al alza en el grupo Nx ($p < 0,05$ vs SMet) (Figura 50A). Sin embargo, Apob, Kng1 y Serpinc1 mostraron niveles reducidos de expresión en el grupo SMet+Nx-Mg²⁺0,6% ($p < 0,05$ vs SMet+Nx-Mg²⁺0,1%). La red IPP de las 7 proteínas presentes en las rutas jerárquicas de la hemostasia se muestra en la Figura 50B. El análisis de la ruta reveló un conjunto de procesos significativos relacionados con la hemostasia: activación, señalización y agregación plaquetaria, formación de coágulo de fibrina (cascada de coagulación), respuesta al Ca²⁺ citosólico plaquetario elevado, ruta intrínseca de la formación del coágulo de fibrina, ruta común de la formación del coágulo de fibrina, sensibilización plaquetaria por LDL y desgranulación plaquetaria ($p < 0,05$) (Figura 50C, Tabla 7).

A)

B)



C)

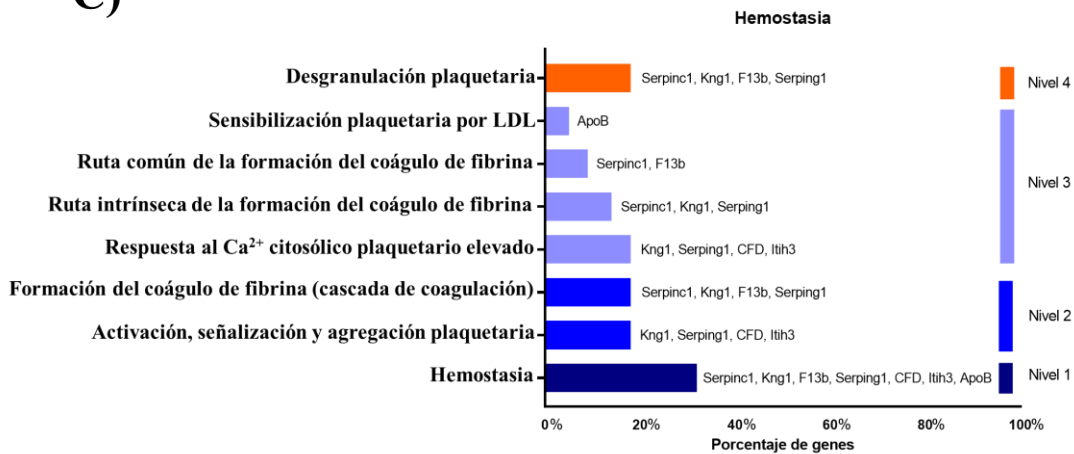


Figura 50. A) Diagrama de cajas de las proteínas significativas implicadas en la hemostasia en Reactome y B) correspondiente IPP de STRING de las proteínas (color verde). C) Enriquecimiento de las rutas implicadas en la hemostasia en Reactome. La abscisa representa el porcentaje de genes; la ordenada enumera las vías encontradas en Reactome. Los niveles determinan el nivel de jerarquías en sus respectivas rutas. $P < 0,05$. * $p < 0,05$ vs SMet; # $p < 0,05$ vs SMet+Nx-Mg²⁺+0,1%.

Tabla 7. Rutas significativas pertenecientes a la jerarquía de hemostasia.

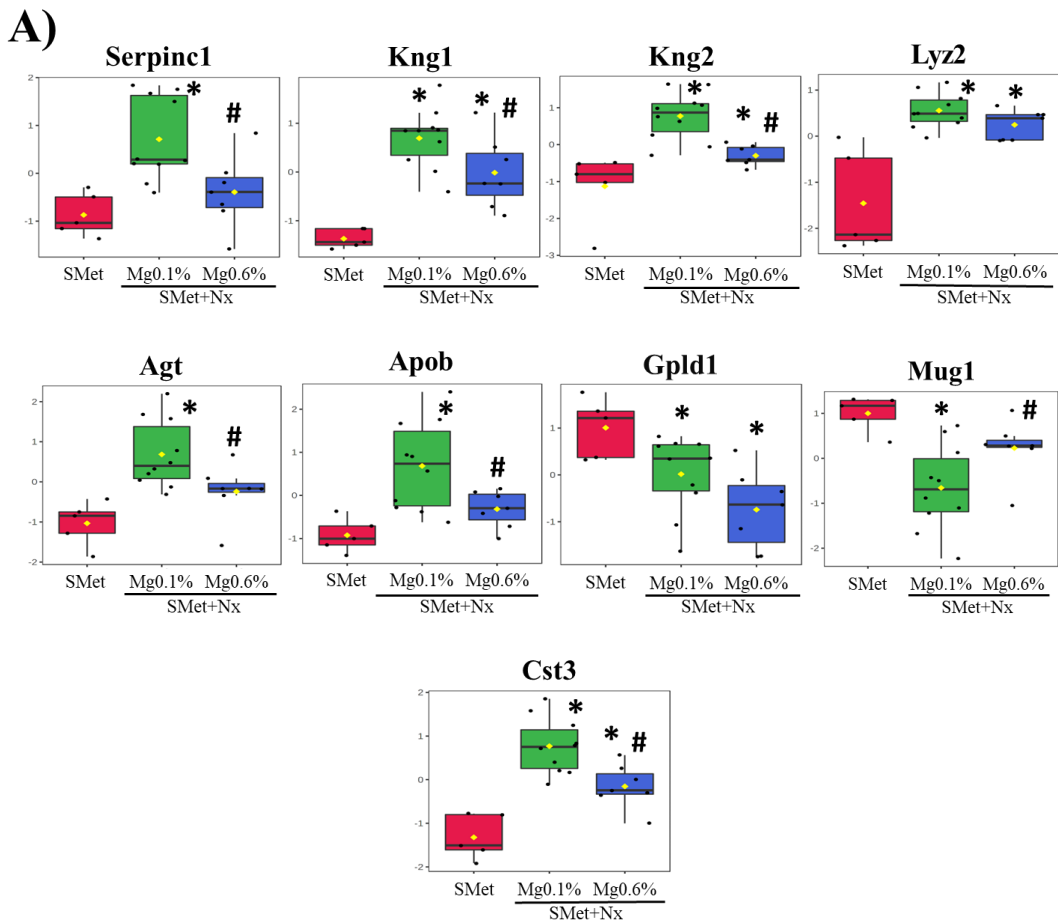
Identificación	Nombre ruta	Gen	pValue	FDR
R-HSA-109582.3	Hemostasia	Serpinc1	1,34E-4	2,4E-3
		Knng1		
		F13b		
		Serpinc1		
		CFD		
		Itih3		
R-HSA-76002.3	Activación, señalización y agregación plaquetaria	ApoB	9,15E-4	1,28E-2
		CFD		
		Knng1		
R-HSA-140877.2	Formación de coágulo de fibrina (cascada de coagulación)	Itih3	5,46E-7	7,04E-5
		Serpinc1		
		Knng1		
		F13b		
R-HSA-76005.2	Respuesta al Ca ²⁺ citosólico plaquetario elevado	Serpinc1	6,89E-5	1,45E-3
		Knng1		
		Itih3		
R-HSA-140837.8	Ruta intrínseca de la formación del coágulo de fibrina	Serpinc1	8,67E-6	5,55E-4
		Knng1		
		Serpinc1		
R-HSA-140875.4	Ruta común de la formación del coágulo de fibrina	Serpinc1	6,7E-4	1,07E-2
R-HSA-432142.2	Sensibilización plaquetaria por LDL	F13b	3,43E-2	7,51E-2
		ApoB		
R-HSA-114608.3	Desgranulación plaquetaria	CFD	5,72E-5	1,43E-3
		Knng1		
		Itih3		
		Serpinc1		

- **Metabolismo de proteínas (R-HSA-392499.9)**

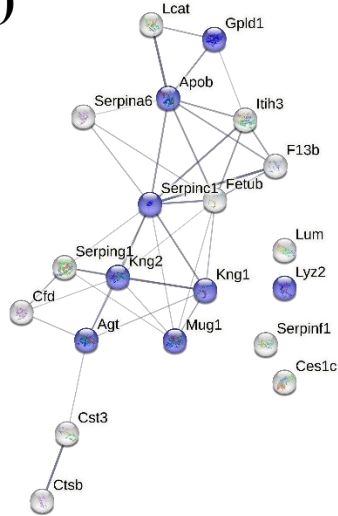
La reparación de proteínas permite revertir el daño a algunas cadenas laterales de aminoácidos causado por EROs, La formación de fibra amiloide y la acumulación de depósitos mayoritariamente extracelulares de proteínas fibrilares, están asociadas con el daño tisular observado en numerosas enfermedades, incluida la insuficiencia cardíaca y renal. La ruta del metabolismo de proteínas presentó un enriquecimiento de 9 proteínas (Figura 51A). En el grupo SMet+Nx+Mg²⁺0,1%, las proteínas

RESULTADOS

Serpinc1, Kng1, Kng2, Lyz2, Apob, Agt y Cst3 se regularon al alza, mientras que la proteína Mug1 y la Fosfolipasa D específica de fosfatidilinositol-glicano (Gpld1) mostraron una disminución ($p < 0,05$ vs SMet). Estas desregulaciones presentaron diferencias significativas tras el suplemento de Mg^{2+} en las proteínas Serpinc1, Kng1, Kng2, Apob, Agt, Cst3 y Mug1 ($p < 0,05$ vs SMet+Nx- $Mg^{2+}0,1\%$). En la Figura 51B se proporciona la red IPP y las relaciones potenciales de las 9 proteínas presentes en las rutas jerárquicas del metabolismo de proteínas en la base de datos Reactome. El conjunto de procesos significativos relacionados con el metabolismo de proteínas fueron los siguientes: modificación postraduccional de proteínas, regulación del transporte y la captación del factor de crecimiento insulínico (IGF) por las proteínas de unión al factor de crecimiento insulínico (IGFBP), formación de fibra amiloide, fosforilación de proteínas postraduccional y metabolismo de Agt a Angiotensina (Ang) ($p < 0,05$) (Figura 51C, Tabla 8).



B)



C)

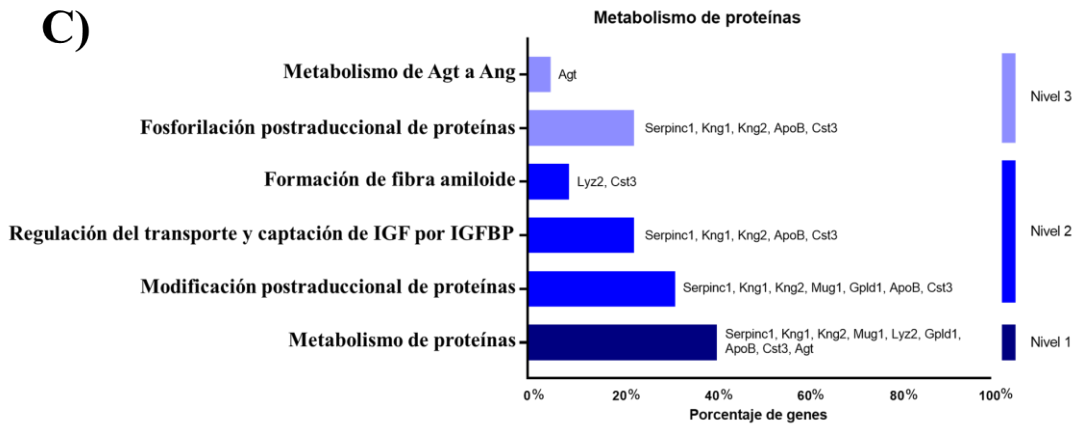


Figura 51. A) Diagrama de cajas de las proteínas significativas implicadas en el metabolismo de proteínas en Reactome y B) correspondiente IPP de STRING de las proteínas (color azul). C) Enriquecimiento de las rutas implicadas en el metabolismo de proteínas en Reactome, La abscisa representa el porcentaje de genes; la ordenada enumera las vías encontradas en Reactome, Los niveles determinan el nivel de jerarquías en sus respectivas rutas. $P < 0,05$. *, $p < 0,05$ vs SMet; #, $p < 0,05$ vs SMet+Nx-Mg²⁺0,1%.

Tabla 8. Rutas significativas pertenecientes a la jerarquía del metabolismo de proteínas.

Identificación	Nombre ruta	Gen	pValue	FDR
R-HSA-392499.9	Metabolismo de proteínas	Serpinc1	1,29E-2	6,02E-2
		Kng1		
		Kng2		
		Mug1		
		Lyz2		
		Gpld1		
		ApoB		
		Cst3		
R-HSA-597592.7	Modificación postraduccional de proteínas	Serpinc1	2,88E-2	7,51E-2
		Kng1		
		Kng2		
		Mug1		
		Gpld1		
		ApoB		
		Cst3		
		R-HSA-381426.2		
Kng1				
Kng2				
ApoB				
Cst3				
R-HSA-977225.6	Formación de fibra amiloide	Lyz2	8,01E-3	6,02E-2
		Cst3		
R-HSA-8957275.1	Fosforilación de proteínas postraduccional	Serpinc1	2,11E-5	9,07E-4
		Kng1		
		Kng2		
		ApoB		
R-HSA-2022377.5	Metabolismo de Agta Ang	Cst3	4,01E-2	8,02E-2
		Agt		

• **Unión y captación de ligandos por receptores scavenger (R-HSA-2173782.1)**

La proteína Apob se encontró relacionada con la ruta de unión y captación de ligandos por receptores secuestradores o scavenger. Se observó un aumento de expresión en el grupo con nefrectomía ($p < 0,05$ vs SMet) que se corrigió tras la administración del suplemento de Mg^{2+} ($p < 0,05$

vs SMet+Nx-Mg²⁺0,1%) (Figuras 52A y 52B). El conjunto de procesos significativos regulados por la unión y captación de ligandos por receptores scavenger se muestra en la Figura 52C: Eliminación por receptores de Clase B, Eliminación por receptores de Clase F y Eliminación por receptores de Clase H (p<0,05) (Tabla 9).

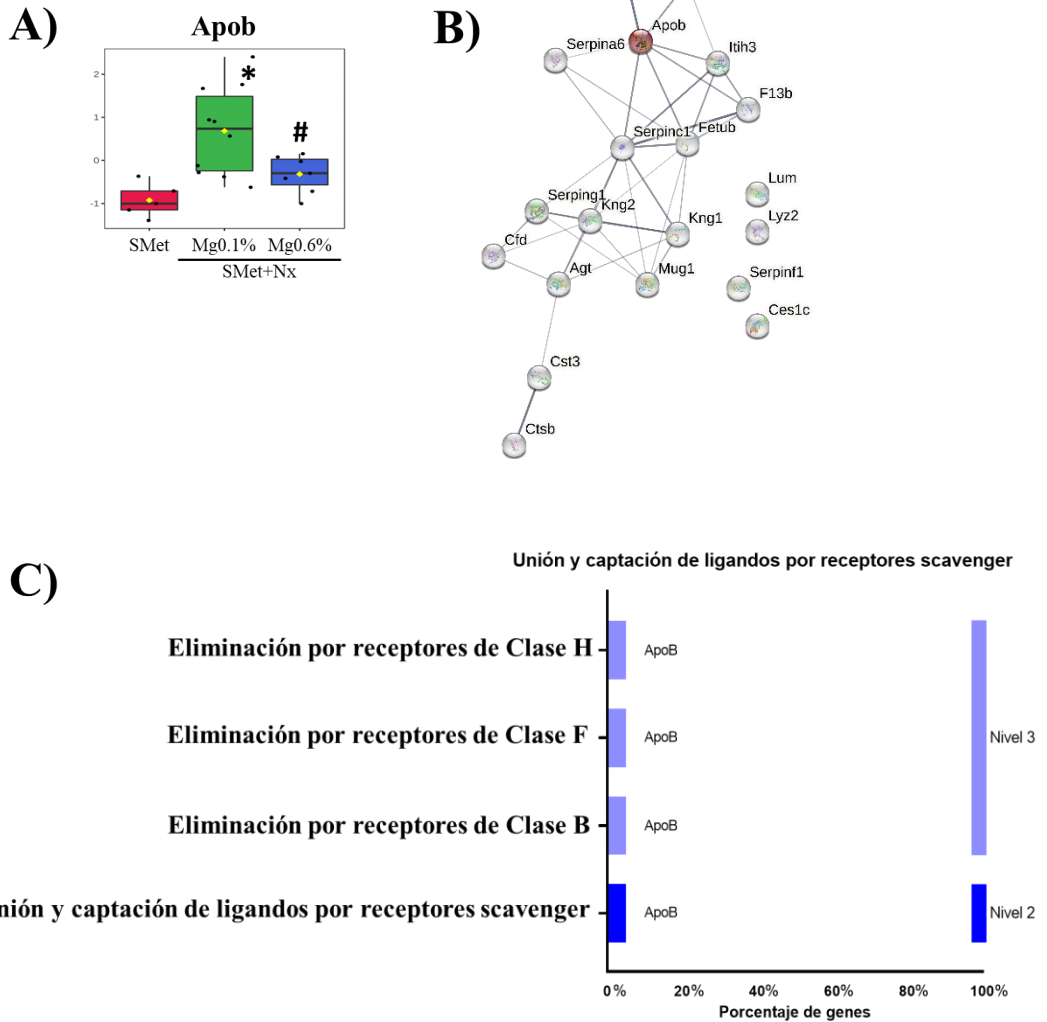


Figura 52. A) Diagrama de cajas de Apob y B) correspondiente IPP de STRING (color marrón). C) Enriquecimiento de las rutas implicadas en la unión y captación de ligandos por receptores scavenger en Reactome. La abscisa representa el porcentaje de genes; la ordenada enumera las vías encontradas en Reactome. Los niveles determinan el nivel de jerarquías en sus respectivas rutas. P<0,05. *, p<0,05 vs SMet; #, p<0,05 vs SMet+Nx-Mg²⁺0,1%.

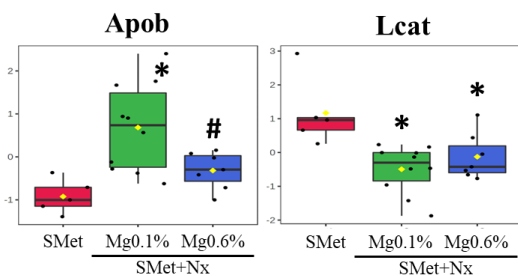
Tabla 9. Rutas significativas pertenecientes a la jerarquía de unión y captación de ligandos por receptores scavenger.

Identificación	Nombre ruta	Gen	pValue	FDR
R-HSA-2173782.1	Unión y captación de ligandos por receptores scavenger	ApoB	2,26E-1	2,26E-1
R-HSA-3000471.2	Eliminación por receptores de Clase B	ApoB	3,13E-2	7,51E-2
R-HSA-3000484.1	Eliminación por receptores de Clase F	ApoB	2,4E-2	7,51E-2
R-HSA-3000497.1	Eliminación por receptores de Clase H	ApoB	2,25E-2	7,51E-2

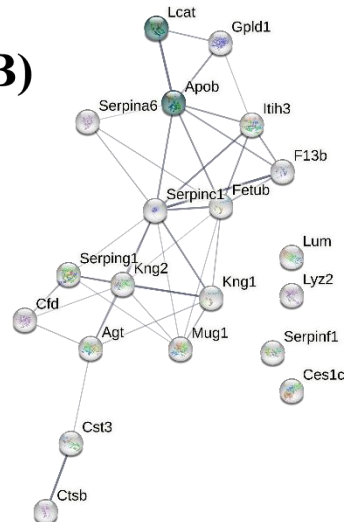
• **Ensamblaje, remodelado y aclaramiento de lipoproteínas plasmáticas (R-HSA-174824.4)**

Las proteínas Apob y Fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa (Lcat) se desregularon en la ruta, mostrándose aumentada y disminuida respectivamente en el grupo SMet+Nx-Mg²⁺0,1% (p<0,05 vs SMet). La administración de Mg²⁺0,6% sólo redujo la expresión de la proteína Apob (p<0,05 vs SMet+Nx-Mg²⁺0,1%) (Figura 53A). Las relaciones potenciales entre ambas proteínas, como se muestran en el IPP de STRING en la Figura 53B se relacionaron en un conjunto de procesos significativos regulados por el ensamblaje, remodelado y aclaramiento de lipoproteínas plasmáticas indicados a continuación: ensamblaje de lipoproteínas plasmáticas, remodelado de lipoproteínas plasmáticas, ensamblaje de quilomicrón, ensamblaje de VLDL, aclaramiento de quilomicrón, aclaramiento de LDL, aclaramiento de VLDL, remodelado de quilomicrón, remodelado de HDL y remodelado de LDL (p<0,05) (Figura 53C, Tabla 10).

A)



B)



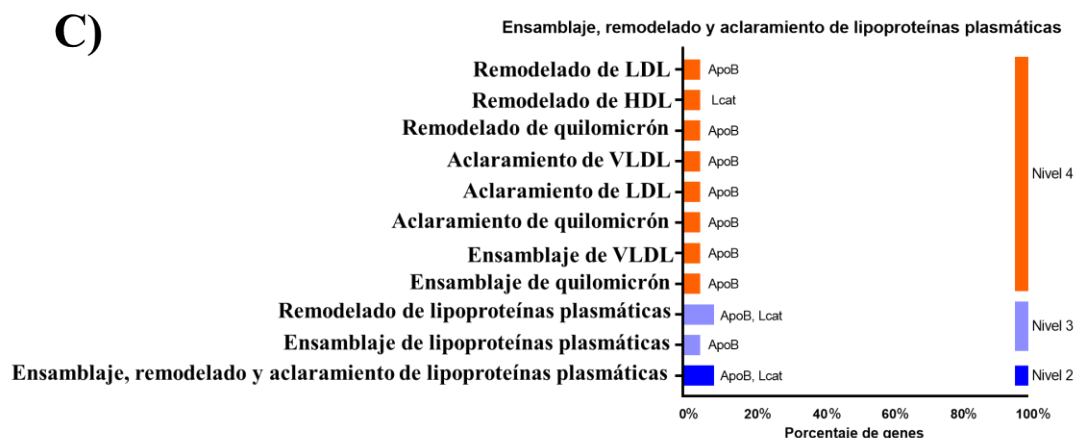


Figura 53. A) Diagrama de cajas de las proteínas significativas implicadas en el ensamblaje de lipoproteínas plasmáticas, remodelado de lipoproteínas plasmáticas en Reactome y B) correspondiente IPP de STRING de las proteínas (color verde). C) Enriquecimiento de las rutas implicadas en el ensamblaje de lipoproteínas plasmáticas, remodelado de lipoproteínas plasmáticas en Reactome. La abscisa representa el porcentaje de genes; la ordenada enumera las vías encontradas en Reactome. Los niveles determinan el nivel de jerarquías en sus respectivas rutas. $P < 0,05$. * $p < 0,05$ vs SMet; # $p < 0,05$ vs SMet+Nx-Mg²⁺0,1%.

Tabla 10. Rutas significativas pertenecientes a la jerarquía de ensamblaje, remodelado y aclaramiento de lipoproteínas plasmáticas.

Identificación	Nombre ruta	Gen	pValue	FDR
R-HSA-174824.4	Ensamblaje, remodelado y aclaramiento de lipoproteínas plasmáticas	ApoB Lcat	1,04E-2	6,02E-2
R-HSA-8963898.1	Ensamblaje de lipoproteínas plasmáticas	ApoB	4,45E-2	8,89E-2
R-HSA-8963899.1	Remodelado de lipoproteínas plasmáticas	ApoB Lcat	3,27E-3	3,27E-2
R-HSA-8963888.1	Ensamblaje del quilomicrón	ApoB	2,1E-2	7,51E-2
R-HSA-8866423.4	Ensamblaje de VLDL	ApoB	1,35E-2	6,02E-2
R-HSA-8964026.1	Aclaramiento de quilomicrón	ApoB	1,35E-2	6,02E-2
R-HSA-8964038.3	Aclaramiento de LDL	ApoB	4,16E-2	8,31E-2
R-HSA-8964046.1	Aclaramiento de VLDL	ApoB	1,5E-2	6,02E-2
R-HSA-8963901.1	Remodelado de quilomicrón	ApoB	2,54E-2	7,51E-2
R-HSA-8964058.2	Remodelado de HDL	Lcat	3,57E-2	7,51E-2
R-HSA-8964041.2	Remodelado de LDL	ApoB	1,5E-2	6,02E-2

- **Metabolismo de lípidos (R-HSA-556833.7)**

Un total de 2 proteínas significativas están presentes en la ruta del metabolismo de lípidos (Figura 54A). Estas son Apob, que se encuentra al alza, y Serpina6 que por el contrario se muestra desregulada, en el grupo SMet+Nx-Mg²⁺0,1% ($p < 0,05$ vs SMet). En ambos, el suplemento de Mg²⁺ normalizó la expresión, no mostrando diferencias respecto al grupo control ($p < 0,05$ vs SMet+Nx-

Mg²⁺0,1%). En la Figura 54B se puede apreciar la red IPP obtenida de STRING de las 2 proteínas presentes en las rutas jerárquicas del metabolismo de lípidos en la base de datos Reactome. El análisis de la ruta reveló un conjunto de procesos significativos: regulación del metabolismo lipídico por PPAR α , PPAR α activa la expresión génica y Biosíntesis de glucocorticoides ($p < 0,05$) (Figura 54C, Tabla 11).

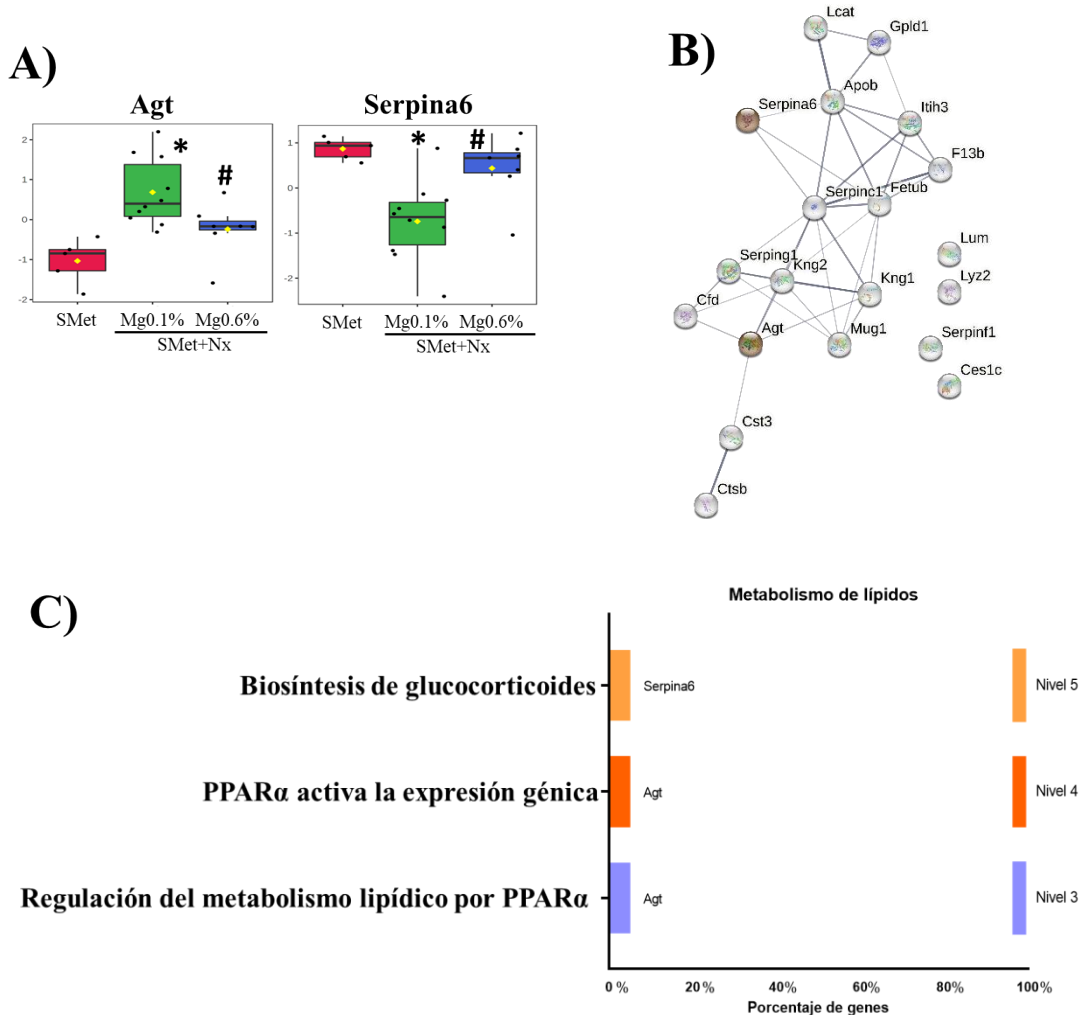


Figura 54. A) Diagrama de cajas de las proteínas significativas implicadas en el metabolismo de lípidos en Reactome y B) correspondiente IPP de STRING de las proteínas (color marrón). C) Enriquecimiento de las rutas implicadas en el metabolismo de lípidos en Reactome, La abscisa representa el porcentaje de genes; la ordenada enumera las vías encontradas en Reactome, Los niveles determinan el nivel de jerarquías en sus respectivas rutas. $P < 0,05$. * $p < 0,05$ vs SMet; # $p < 0,05$ vs SMet+Nx-Mg²⁺0,1%.

Tabla 11. Rutas significativas pertenecientes a la jerarquía del metabolismo de lípidos.

Identificación	Nombre ruta	Gen	pValue	FDR
R-HSA-400206.6	Regulación del metabolismo lipídico por PPAR α	Agt	2,92E-2	7,51E-2
R-HSA-1989781.4	PPAR α activa la expresión génica	Agt	2,86E-2	7,51E-2
R-HSA-194002.2	Biosíntesis de glucocorticoides	Serpina6	4,3E-2	8,6E-2

• **Detoxificación de EROs (R-HSA-3299685.5)**

La proteína significativa implicada en la detoxificación de EROs fue Gpx3. De manera similar a su actividad en plasma, se observó una menor expresión en un modelo SMet-ERC ($p < 0,05$ vs SMet) (Figuras 55A y 55B, Tabla 12). El software STRING no admitió Gpx3.

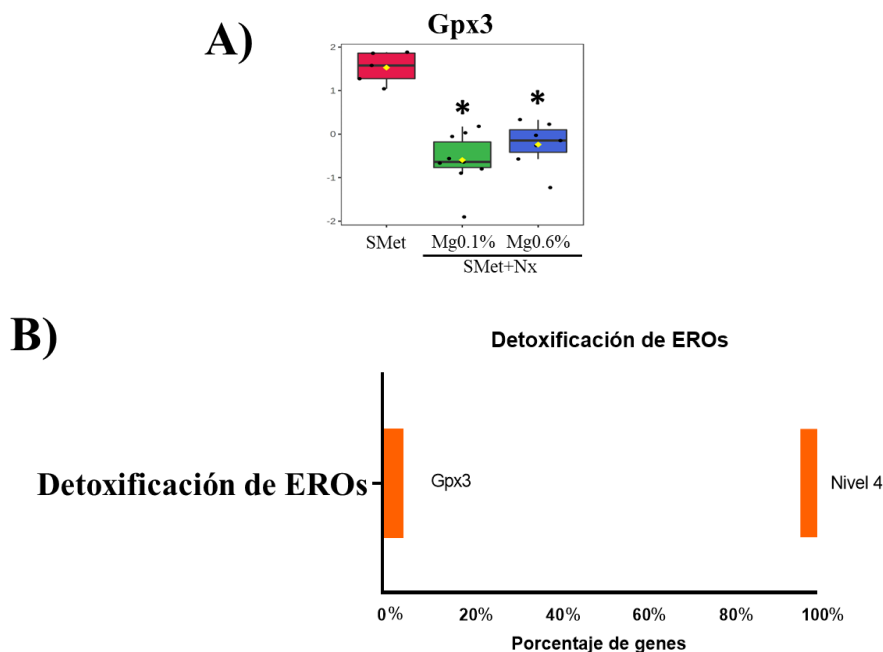


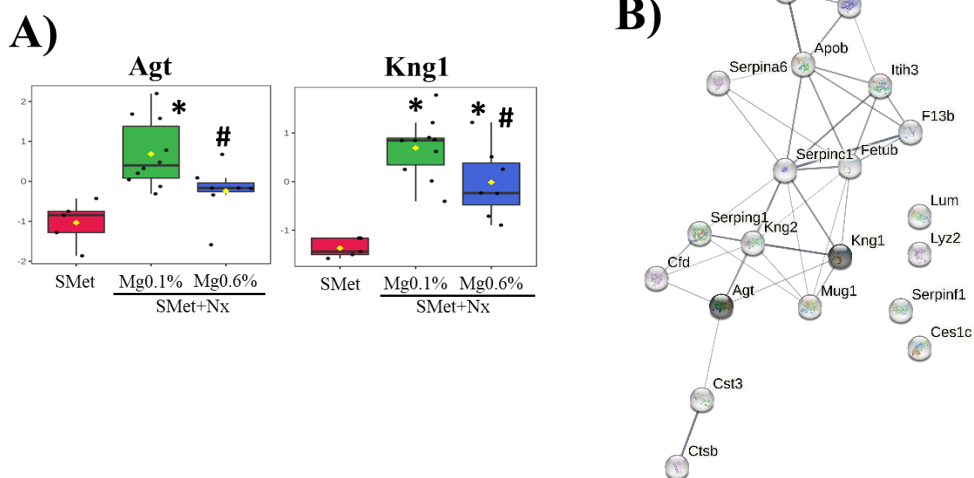
Figura 55. A) Diagrama de cajas de Gpx-3. B) Enriquecimiento de la ruta detoxificación de EROs en Reactome. La abscisa representa el porcentaje de genes; la ordenada enumera las vías encontradas en Reactome. Los niveles determinan el nivel de jerarquías en sus respectivas rutas. $P < 0,05$. * $p < 0,05$ vs SMet.

Tabla 12. Rutas significativas pertenecientes a la jerarquía de la detoxificación de EROs.

Identificación	Nombre ruta	Gen	pValue	FDR
R-HSA-3299685.5	Detoxificación de EROs	Gpx3	4,77E-3	4,29E-2

• **Receptores de unión al ligando peptídico (R-HSA-375276.6)**

Esta ruta pertenece a la jerarquía de receptores acoplados a proteínas G de clase A (GPCR) como el ATR1 de AngII, promotor localizado de EROs, El nivel fisiológico de EROs producido en respuesta a los agonistas de GPCR juega un papel importante en la hipertensión, la diabetes y la insuficiencia cardíaca que contribuyen a la muerte celular y la apoptosis. Las proteínas implicadas en esta ruta de Reactome fueron Kng1 y Agt, ambas reguladas al alza en el grupo SMet+Nx-Mg²⁺0,1% (p<0,05 vs SMet). Éstas mostraron una disminución significativa en el grupo que recibió el suplemento dietético de Mg²⁺, llegando incluso a normalizarse en el caso de la proteína Agt (p<0,05 vs SMet+Nx-Mg²⁺0,1%) (Figura 56A, Tabla 13). La red IPP, que revela las interacciones entre las proteínas y el enriquecimiento de la ruta, se muestra en las Figuras 56B y 56C.



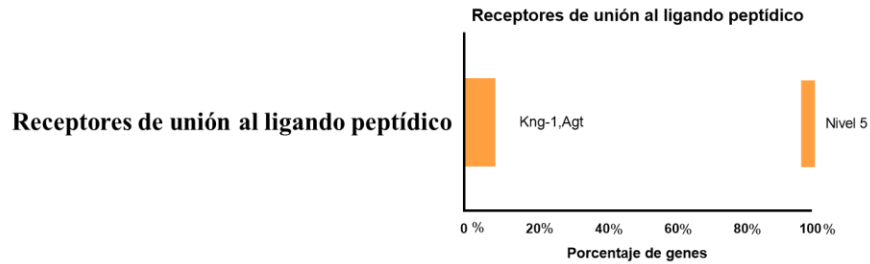


Figura 56. A) Diagrama de cajas de las proteínas significativas implicadas en los receptores de unión al ligando peptídico en Reactome y B) correspondiente IPP de STRING de las proteínas (color negro). C) Enriquecimiento de las rutas implicadas en los receptores de unión al ligando peptídico en Reactome, La abscisa representa el porcentaje de genes; la ordenada enumera las vías encontradas en Reactome, Los niveles determinan el nivel de jerarquías en sus respectivas rutas. $P < 0,05$. * $p < 0,05$ vs SMet; # $p < 0,05$ vs SMet+Nx-Mg²⁺0,1%.

Tabla 13. Rutas significativas pertenecientes a la jerarquía de los receptores de unión al ligando peptídico.

Identificación	Nombre ruta	Gen	pValue	FDR
R-HSA-375276.6	Receptores de unión al ligando peptídico	Kng1 Agt	3,76E-2	7,51E-2

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

En pacientes con ERC es habitual observar la simultaneidad de varios procesos patológicos como, por ejemplo, anemia, hipertensión, alteraciones del metabolismo mineral o inflamación crónica entre otros [130, 131]. Respecto al metabolismo mineral, de particular interés en nuestro grupo de investigación, una de las alteraciones más importantes que ocurre durante la ERC es la presencia de altos niveles séricos de P. Como ya se ha descrito, el exceso de P conduce a la CV a través de la transdiferenciación de las CMLV hacia un fenotipo osteogénico. Las CV favorecen el deterioro cardiovascular y conducen a la generación de eventos cardiovasculares que a menudo acaban con la vida del enfermo renal. Como se observa en esta tesis, el incremento de P en la dieta se asocia con niveles más altos de P sérico y con un mayor deterioro de la función renal. Además, estos altos niveles de P también se relacionan con un incremento del EO tal y como refleja la actividad GPx o los niveles de peroxidación lipídica. A nivel de mecanismo de acción, la asociación entre el exceso de P y el incremento de EO puede justificarse debido a que los niveles elevados de P sérico provocan una sobrecarga de P citosólico en las CMLV, lo que acelera la captación de P mitocondrial que posteriormente promueve la generación de EO [195]. Se ha observado que la sobrecarga de P en las CMLV regula al alza las expresiones de los cotransportadores PiT-1/PiT-2 a través de ERK/mTOR (diana de rapamicina en células de mamífero) y estimula su tráfico hacia la membrana plasmática aumentando el P intracelular [196]. Esto implica un cotransporte de 2 iones Na^+ por cada P y, por lo tanto, implica un flujo de corriente positivo neto que despolariza la membrana plasmática de las CMLV. Esta despolarización permite una mayor entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje de tipo L. Además, la sobrecarga de P en la célula promueve la internalización de P y la extrusión de Mg-ATP en la mitocondria a través de un transportador P/Mg-ATP dependiente de Ca^{2+} desencadenando un aumento de EROs mitocondriales [197, 198]. Por tanto, una mayor entrada de P en la célula desencadena cambios en la entrada y salida de otros iones como Na^+ , Mg^{2+} o Ca^{2+} que generan EROs.

En particular, la generación de EROs puede estar asociada con la translocación nuclear de NF- κ B. Ambos estímulos, pro-oxidante y pro-inflamatorio pueden desencadenar el incremento de expresión de proteínas osteogénicas, como Runx2, osteopontina o fosfatasa alcalina. La activación de estas proteínas y rutas conduce a la transdiferenciación celular y a la transformación fenotípica hacia células de estirpe osteogénica [199]. Como se ha demostrado anteriormente por distintos investigadores y por nuestro grupo de investigación, el exceso de P puede directamente incrementar la respuesta pro-

inflamatoria de las CMLV [193, 200]. De esta manera, se ha demostrado que la señalización que controla la transdiferenciación osteo/condrogénica y la posterior mineralización de las CMLV en presencia de alto P, implica la activación de vías asociadas con la inflamación como son la Wnt/ β -catenina y la NF- κ B [193, 201]. Por ésta y otras razones, como su capacidad para promover EO y CV o su relación con la mayor progresión de ECV, el control del P sérico resulta uno de los objetivos terapéuticos más importantes en el tratamiento de los pacientes con ERC. Por tanto, el potencial efecto directo del P como agente pro-inflamatorio y pro-oxidante sobre las CMLV podría ser responsable de la generación de daño vascular y posteriormente problemas cardiovasculares [193].

Por otro lado, ha sido demostrado que el Mg^{2+} actúa como un efectivo quelante de P y podría ser útil protegiendo al paciente frente a las complicaciones presentes en la ERC, como las CV, el HPTS o la acidosis [202]. Además, también se ha observado que los efectos beneficiosos del Mg^{2+} no sólo estarían relacionados con su acción quelante sobre el P, sino que se han demostrado otros efectos beneficiosos independientes de la reducción de la absorción de P [109]. El Mg^{2+} es esencial para mantener la salud y reducir el riesgo de ECV como evidencian estudios clínicos y experimentales *in vivo* e *in vitro* donde el Mg^{2+} bajo está asociado con procesos inflamatorios, calcificantes y oxidantes [85, 86, 109, 150, 203, 204]. La modulación de la respuesta inflamatoria a nivel endotelial por parte del Mg^{2+} también ha sido ya ampliamente documentada [95, 123, 205]. Varios trabajos han demostrado el papel del Mg^{2+} sobre la disfunción endotelial ya sea a través del control de marcadores proinflamatorios (como pueden ser VCAM-1, TNF- α ó IL-6), alterando los niveles de los vasomoduladores (como NO y ET-1) o modificando las concentraciones de LDL, factor de riesgo ateroesclerótico [206, 207, 208, 209]. De hecho, en un estudio anterior de nuestro grupo ya hemos demostrado que el tratamiento de células endoteliales humanas (HUVEC) con Mg^{2+} prevenía el aumento de la expresión de BMP-2 y p65-NF- κ B inducido por altos niveles de TNF- α recombinante. Por otra parte, se debe reconocer que durante la ERC otros diferentes estímulos pueden llevar a las CMLV a aumentar la producción de citoquinas proinflamatorias y de EROs [19, 134].

Con todo ello, los resultados *in vitro* obtenidos en esta tesis muestran que, en comparación con las CMLV incubadas con una concentración normal de Mg^{2+} , la adición de concentraciones más altas de Mg^{2+} disminuye la producción de EROs, citoquinas proinflamatorias e ICAM-1 incrementadas por los altos niveles de P (Figura 57). Cabe señalar que, en las células tratadas con P normal, sólo llegó a observarse la estimulación de ICAM-1 a nivel de ARNm, pero no a nivel proteico, lo que podría deberse a una regulación postraduccional específica. Sin embargo, los niveles más altos de Mg^{2+} redujeron la cantidad de ICAM-1 a nivel de ARNm y de proteína. Estos resultados son consistentes con los observados en un estudio previo de nuestro laboratorio en donde las CMLV fueron cultivadas

con alto P durante 9 días mostrando un aumento significativo de expresión génica de ICAM-1 pero no sobre la presentación de ICAM-1 en la superficie de estas células.

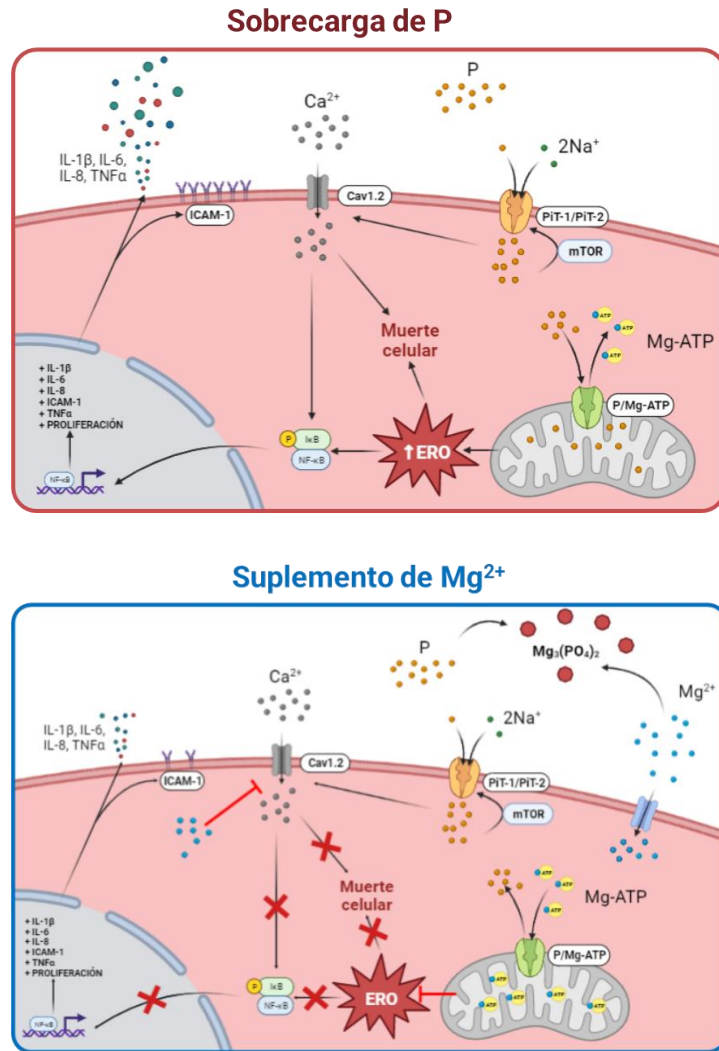


Figura 57. La sobrecarga de P en las CMLV promueve el aumento de producción de ERO, proliferación, muerte celular, translocación nuclear de p65-NF-κB y secreción de citoquinas inflamatorias. Tras la adición de Mg²⁺, los efectos de EO e inflamación fueron disminuidos.

Dado que NF-κB juega un papel clave en la expresión de moléculas de adhesión celular y de citoquinas inflamatorias [139, 193], evaluamos su implicación en el efecto del Mg²⁺ sobre el proceso inflamatorio desarrollado por P. La adición de Mg²⁺ al medio con alto P previno la inflamación de CMLV mediante la inhibición de la vía de señalización NF-κB. Además, también es conocido que NF-κB está involucrado en la modulación de la respuesta inflamatoria por el EO, estimulando la producción

de citoquinas pro-inflamatorias dependientes de EROs [210]. Por tanto, cabe suponer que el efecto inhibitor ejercido por el Mg^{2+} elevado sobre el EO también podría subyacer a su acción moduladora sobre la respuesta inflamatoria dependiente de NF- κ B.

Por otro lado, estudios anteriores destinados a valorar el efecto protector del Mg^{2+} sobre las células vasculares dieron relevancia a las propiedades del Mg^{2+} como antagonista del Ca^{2+} , de modo que la acción del Ca^{2+} es también susceptible de ser modificada por el suplemento de Mg^{2+} [211]. Se sabe que el aumento del Ca^{2+} intracelular puede activar las vías de transducción que conducen a un aumento del EO, la activación de la señalización NF- κ B y la producción de citoquinas proinflamatorias [212, 213]. Así, el Mg^{2+} , actuando como inhibidor fisiológico de los canales de Ca^{2+} , podría alterar el flujo de Ca^{2+} y, con ello, la respuesta inflamatoria.

Del mismo modo, ha sido documentado in vitro que los altos niveles de P incrementan la producción de citoquinas pro-calcificantes en un efecto que es dependiente de ERO/NF- κ B [106, 108, 193]. Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que este efecto va acompañado de la inducción de la proliferación y la muerte celular, estando esta respuesta inhibida por la adición de Mg^{2+} elevado. La proliferación celular es también una característica esencial en el cambio fenotípico de las CMLV, y el incremento del EO es un mecanismo clave para el desarrollo de este proceso [214, 215]. Por lo tanto, no resulta sorprendente encontrar un incremento de EROs en nuestras células estimuladas con alto P. Es probable que el efecto preventivo del Mg^{2+} ocurra a través de la reducción de los niveles de EO y de la inhibición de NF- κ B. Como se mencionó, la membrana mitocondrial interna contiene un transportador dependiente de Ca^{2+} que intercambia P por el complejo Mg-ATP [198]. Un efecto del aumento de Mg^{2+} citoplasmático debido al suplemento provocaría una mayor exportación de P mitocondrial con una mayor importación de Mg-ATP, contrarrestando la captación excesiva de P y sus efectos oxidantes [197]. La deficiencia de Mg^{2+} se ha correlacionado ampliamente con el desarrollo de EO provocado por una producción excesiva de EROs debido a la disfunción mitocondrial y la homeostasis anormal del Ca^{2+} . Se sabe que la deficiencia de Mg^{2+} intracelular inhibe el transporte de Mg^{2+} a la mitocondria alterando el equilibrio electroquímico de la membrana mitocondrial [216]. Bajo hipomagnesemia, el canal MRS2 disminuye la entrada de Mg^{2+} mitocondrial y a su vez el canal SLC41A3 aumenta su salida probablemente como una compensación para que las mitocondrias puedan liberar Mg^{2+} con el fin de hacer frente a la deficiencia de Mg^{2+} . Dicha deficiencia aumenta la producción de EROs mitocondriales, suprime el sistema de defensa antioxidante (como la superóxido dismutasa, la catalasa y el glutatión) y se regula a la baja la ATP sintasa lo que provoca un aumento de la actividad NADPH oxidasa (NOX) [170, 217]. Por otro lado, la deficiencia de Mg^{2+} también aumenta la concentración de Ca^{2+} mitocondrial e intracelular debido al aumento de la extrusión de Mg^{2+}

intracelular al espacio extracelular con la intención de corregir la deficiencia de Mg^{2+} [218]. El exceso de Ca^{2+} mitocondrial e intracelular da como resultado la activación de procesos dependientes de Ca^{2+} , como la liberación de citoquinas inflamatorias y la activación de NOX, de calmodulina y la activación de NOS desacoplada, que exacerban la producción de ERO [219]. Sin embargo, se sabe que el Mg^{2+} está ampliamente involucrado en los mecanismos celulares que controlan tanto el potencial de membrana como la entrada de Ca^{2+} intracelular [220]. En las CMLV, el control del potencial transmembrana por parte del Mg^{2+} hace que disminuya la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} tipo L [220], por lo que es plausible que el suplemento de Mg^{2+} reduzca así la inflamación y el EO tal y como se ha observado en nuestros resultados.

Además, se ha demostrado que las EROs y las citoquinas proinflamatorias inducen la apoptosis en células vasculares (CMLV y células endoteliales) [214, 215, 221], lo que podría justificar la mortalidad celular obtenida en las CMLV tratadas con alto P [222]. Este hecho fue demostrado por Xiao y colaboradores, observando que el alto contenido de P activa simultáneamente tanto la señalización de apoptosis como la proliferación en las CMLV [223]. En esta misma línea, un estudio reciente en CMLV tratadas con alto contenido de fructosa mostró un aumento de los niveles de inflamación, EO, proliferación y apoptosis, efectos mediados por la activación de NF- κ B [224]. Nuestros resultados muestran un importante papel de las CMLV como dianas del Mg^{2+} en la protección del sistema vascular contra la inflamación. Así, el reconocido papel protector del Mg^{2+} a nivel vascular podría explicarse, al menos parcialmente, por su efecto anti-inflamatorio.

Una vez observado el efecto modulador del suplemento de Mg^{2+} sobre el EO y la inflamación *in vitro* en las CMLV, nos dirigimos a comprobar si este efecto se observaba también en un modelo experimental de EO e inflamación asociado a la CV en ratas. Para ello, se empleó un modelo *in vivo* de insuficiencia renal basado en la realización de una Nx5/6, administración de niveles elevados de P en la dieta y dosis de 20 ng/kg i.p. de CTR lo cual reproduce con relativa fidelidad las CV asociadas a la ERC. Para valorar el efecto del suplemento de Mg^{2+} sobre este modelo se estudió el efecto de una dieta con contenido normal (0,1%) o elevado de Mg^{2+} (0,6%). Debemos discutir primero que no hay consenso acerca del contenido basal de Mg^{2+} en la dieta. En algunos estudios se ha considerado un contenido del 0,05% de Mg^{2+} como cantidad basal o normal [225], mientras que en otros se establece un 0,1% como cantidad basal [226]. Consideramos que, en estudios experimentales con ratas, pueda ser necesaria una concentración dietética ligeramente superior a 0,05% sobre todo en aquellas condiciones experimentales donde pudiera verse afectada la absorción de Mg^{2+} . Dado que la ERC puede alterar la absorción/excreción de Mg^{2+} , la cantidad de Mg^{2+} normal para nuestros experimentos fue considerada como 0,1% [227]. Esta premisa ha sido también considerada por otros investigadores,

estableciendo un porcentaje de 0,1% como el valor basal de Mg^{2+} en la dieta y un porcentaje de Mg^{2+} 0,6% como la cantidad adecuada para mantener elevados niveles séricos de Mg^{2+} en los que valorar su efecto [228, 229, 230, 231]. Además, es conocido también que un alto contenido de P en la dieta puede reducir la absorción y/o la disponibilidad de Mg^{2+} debido a la aglutinación de estos dos elementos en forma de sales que posteriormente son excretados, hallazgo que se observa a menudo en la enfermedad renal [227].

Nuestros resultados mostraron que las ratas alimentadas con un Mg^{2+} normal (0,1%) sometidas a nefrectomía 5/6 y con alto P en la dieta (P 1,2%) y CTR tuvieron un incremento significativo en la respuesta inflamatoria sistémica, como se deduce de la elevación en el plasma de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL1 β e IL-6, que están relacionadas con las respuestas de fase aguda. Además, también se acompañó de un aumento de la actividad plasmática de la GPx, un conocido marcador de EO. Estos resultados sostienen por tanto que la uremia, y el elevado contenido de P en la dieta conducen a un incremento del EO e inflamación. Posteriormente, la inflamación podría conducir al desarrollo de calcificaciones vasculares y extraóseas. Múltiples estudios han demostrado que la progresión y la gravedad de la ERC están fuertemente asociadas con la exacerbación del EO y el estado inflamatorio [232], la CV [109] y una alta tasa de morbilidad y mortalidad cardiovascular [233].

Nuestros resultados obtenidos en el modelo de EO e inflamación asociado a la CV (Figura 58) respaldan los hallazgos anteriores observados *in vitro* en las CMLV cultivadas en medio HP con suplemento de Mg^{2+} . Es interesante subrayar que los efectos beneficiosos de Mg^{2+} no se desarrollaron exclusivamente a nivel renal, sino que fue observado un importante efecto a nivel vascular que contribuye muy probablemente a mejorar el estado general de los animales. Se trata del desarrollo de un efecto directo antioxidante y anti-inflamatorio sobre la pared vascular. Los resultados observados mostraron que el suplemento de Mg^{2+} en la dieta redujo significativamente el grado de inflamación de la aorta, el daño vascular y la dilatación observada en las ratas Nx- Mg^{2+} 0,1%. Esto es de especial interés ya que la vasculatura se erige como una diana inflamatoria clave para el progreso de las comorbilidades asociadas a la ERC como son el desarrollo de patologías vasculares como la CV o la aterosclerosis.

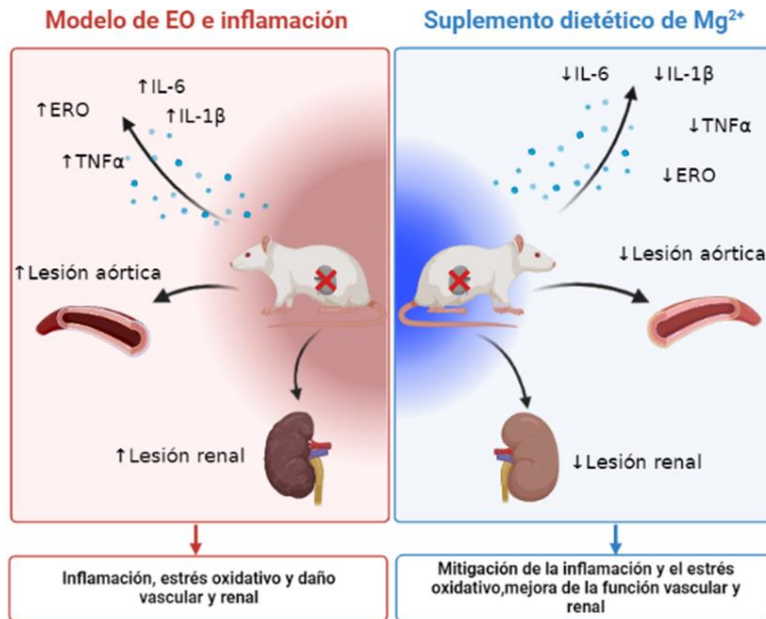


Figura 58. En un modelo in vivo de EO e inflamación asociado a la CV, el efecto de la uremia promueve inflamación, EO, además de daño vascular y renal. Un suplemento dietético de Mg²⁺ (0,6%) es capaz de mitigar los efectos de la inflamación y el EO, junto con una mejora de la función vascular y renal.

Estudios previos del grupo ya han valorado la contribución del suplemento dietético de Mg²⁺ sobre el desarrollo de CV [109]. Sin embargo, su implicación sobre la aterosclerosis en los modelos experimentales de uremia que se han explorado en esta tesis no había sido aún valorada. Otros autores han sugerido ya una relación significativa entre los niveles de Mg²⁺ y el establecimiento de aterosclerosis u otras patologías vasculares [85, 207, 234]. De esta manera se ha reportado un mayor riesgo de aterosclerosis carotídea en los pacientes con los niveles más bajos de Mg²⁺ [235], así como una fuerte asociación entre hipomagnesemia y aterogénesis en pacientes con ERC [236]. Por otro lado, el suplemento de Mg²⁺ y un nivel moderadamente más alto de Mg²⁺ promueve un efecto protector a nivel vascular [206, 208, 237, 238, 239].

Con respecto a la relación del Mg²⁺ con la función renal es conocido que el Mg²⁺ se absorbe en el intestino y que el exceso de Mg²⁺ se excreta tanto por la orina como por las heces. El riñón desempeña un papel principal en el equilibrio del Mg²⁺, ya que los niveles de Mg²⁺ sérico están controlados principalmente por su excreción en la orina. En el contexto urémico, a medida que la función renal se deteriora, la capacidad renal de eliminación de Mg²⁺ se reduce progresivamente hasta llegar a un punto en el que puede ser insuficiente para equilibrar la absorción intestinal de Mg²⁺ y la ingesta dietética se

convierte en el principal determinante de los niveles séricos de Mg^{2+} [240, 241]. En nuestro estudio, el suplemento dietético de Mg^{2+} (0,6%) produjo un leve aumento estadísticamente significativo de los niveles séricos de Mg^{2+} en comparación con el de los animales que recibieron la dieta normal de Mg^{2+} . Hay que tener en cuenta que un suplemento dietético de Mg^{2+} a veces puede ser difícilmente observable en suero. Sin embargo, la excreción urinaria de Mg^{2+} si refleja con mayor rapidez estos cambios. Por ello el uso de una correcta valoración en suero y en orina puede ser una posible herramienta para detectar estas variaciones en pacientes.

Los resultados obtenidos mostraron como el suplemento de Mg^{2+} evitó en gran medida el incremento de EO y la inflamación vascular desarrollada en condiciones de uremia. Curiosamente, algunas alteraciones fisiológicas observadas en la ERC, como el aumento de la producción de EROs y la liberación de citoquinas inflamatorias, se asemejan inversamente a las relacionadas con la deficiencia de Mg^{2+} [138, 139, 242]. De hecho, el mismo conjunto de citoquinas proinflamatorias que observamos en nuestro estudio resultaron estar elevadas en otro estudio en ratas normales con deficiencia de Mg^{2+} [243]. Es interesante comprobar, cómo la restauración de los niveles de Mg^{2+} vía oral tras la hipomagnesemia promovió una mejor respuesta antiinflamatoria y una mejor función endotelial [206].

En un contexto vascular, pudimos comprobar como una dieta alta en P promueve la expresión de citoquinas inflamatorias a nivel vascular y cómo se regularon éstas a la baja como consecuencia del suplemento dietético con Mg^{2+} . Estos hallazgos señalan también a la pared vascular como un actor clave en el proceso inflamatorio que puede estar involucrado directamente con la alteración vascular encontrada en la ERC. Además, es probable que este patrón inflamatorio vascular pueda tener un papel específico en el desarrollo de la alteración vascular relacionada con la insuficiencia renal. De hecho, el análisis histológico mostró que el suplemento con Mg^{2+} redujo en gran medida el daño vascular observado en los tejidos aórticos de las ratas urémicas reduciendo el grado de inflamación, dilatación y el remodelado vascular observado en las aortas de las ratas Nx- Mg^{2+} 0,1%.

En las ratas nefrectomizadas del modelo de EO e inflamación asociado a la CV, la administración del suplemento dietético de Mg^{2+} se asoció también con un menor daño renal y por tanto con una marcada mejoría de su función. Estudios clínicos sugieren que valores moderadamente altos de Mg^{2+} tienen efectos beneficiosos descendiendo la mortalidad de pacientes con ERC [244]. Del mismo modo, niveles bajos de Mg^{2+} se asocian con una mayor incidencia y progresión de la ERC [245] y con una disminución del FG en la población general [246]. Además, resultados clínicos obtenidos en nuestro grupo de investigación revelan que, en un total de 1271 pacientes con fallo renal avanzado, se observa que niveles de Mg^{2+} séricos por debajo de 2,1 mM se asocian directamente con un aumento en

la mortalidad siendo esto independiente del estado nutricional (datos en revisión). De hecho, se ha señalado que la alteración de la homeostasis del Mg^{2+} desarrollando hipomagnesemia podría exacerbar la fibrosis renal, unos de los procesos fisiopatológicos principales de la ERC que contribuye a su progresión [247].

La acción quelante del Mg^{2+} sobre el P está ampliamente documentada. De hecho, hoy día la industria farmacéutica dispone ya de productos que contienen Mg^{2+} dirigidos a disminuir la absorción de P en pacientes con ERC [248]. Por este motivo, uno de los principales mecanismos por los que el Mg^{2+} puede proteger frente a la lesión renal inducida puede deberse a su acción sobre la disminución de la absorción de P [245]. Como ya se ha comentado la sobrecarga de P promueve el daño renal, la apoptosis de las células tubulares, así como la calcificación del tejido renal y vascular [245]. Se ha demostrado que el Mg^{2+} suprime la apoptosis inducida por P en estas células tubulares, además de inhibir la nefrocalcinosis [245]. Estos efectos están mediados también por una reducción del EO, inflamación y daño celular provocado por los cristales de $Ca_3(PO_4)_2$. El efecto beneficioso del suplemento de Mg^{2+} sobre el daño vascular se debe también entre otros, a la capacidad del Mg^{2+} de reemplazar a los iones de Ca^{2+} en la estructura de la hidroxiapatita [249]. Estos cristales, productos de la sobresaturación de Ca^{2+} y P en circulación, inducen la calcificación de las CMLV, así como la inflamación/EO y también puede ser una causa de lesión renal [250, 251]. El Mg^{2+} conduce a una pérdida de la estructura cristalina de la hidroxiapatita e inhibe la maduración de las partículas de calmodulina, lo que inhibe la CV y la producción de EO, así como la liberación de citoquinas inflamatorias y la activación de NOX [219, 252]. Por otro lado, en nuestro grupo de investigación hemos observado que el Mg^{2+} también inhibe la vía de señalización Wnt/ β -catenina y la activación de los genes osteogénicos para reducir la CV [108]. También el Mg^{2+} favorece la formación del mineral whitlockita en detrimento de hidroxiapatita. En este caso, los depósitos de $Ca_3(PO_4)_2$ y Mg^{2+} da lugar a una cristalización amorfa con cristales más solubles y, por lo tanto, potencialmente reversibles [253].

El efecto del Mg^{2+} podría también ser beneficioso a nivel de otros aspectos de la ERC. Desde el punto de vista del metabolismo mineral, la reducción de la hiperfosfatemia se asocia con un aumento del Ca^{2+} sérico y un descenso de la PTH y el FGF23 [254], pudiendo ser promovido por el suplemento de Mg^{2+} . Además, el Mg^{2+} también podría mejorar la uremia al prevenir la CV y la calcificación de los tejidos blandos [108, 109] inducida por niveles altos de P que probablemente contribuyan al empeoramiento de la insuficiencia renal.

El aumento de Mg^{2+} en la dieta en ratas Nx ($Mg^{2+}0,6\%$ vs la dieta normal con $Mg^{2+}0,1\%$) disminuyó la magnitud de la insuficiencia renal, y redujo el daño tisular, el EO y la inflamación (Figura

59). En resumen, los resultados obtenidos *in vivo* en ratas urémicas sugieren que un suplemento de Mg^{2+} en la dieta podría tener efectos beneficiosos en la ERC. Estos hallazgos respaldan la necesidad de mantener los niveles séricos de Mg^{2+} en un rango fisiológico en los pacientes, con el fin de prevenir los efectos adversos asociados a la hipomagnesemia. De hecho, distintos estudios *in vitro* han relacionado que los niveles bajos de Mg^{2+} afectan directamente a las células vasculares. La disfunción endotelial causada por la deficiencia de Mg^{2+} puede contribuir a generar un entorno proinflamatorio, protrombótico y proaterogénico que conduce a la enfermedad vascular [122]. De la misma manera en CMLV, la deficiencia de Mg^{2+} promueve el desarrollo de hipertensión, aterogénesis, enfermedad vascular y accidente cerebrovascular [234, 255].

Dado que el suplemento de Mg^{2+} mejoró los parámetros de inflamación y EO en ratas Wistar con ERC, se decidió evaluar el efecto del suplemento dietético de Mg^{2+} en un modelo más severo de daño con un mayor componente inflamatorio y de estrés oxidativo. Para ello se usó un modelo animal de ratas Zucker con SMet y ERC. Nuestros resultados mostraron que, en comparación con animales con SMet alimentadas con un Mg^{2+} normal, las ratas con ERC mostraban un aumento significativo de los marcadores de EO e inflamación, así como de la PA. Por el contrario, en las ratas con SMet y ERC que recibieron un suplemento dietético de Mg^{2+} , los niveles de estos parámetros se mantuvieron similares a los de las ratas control.

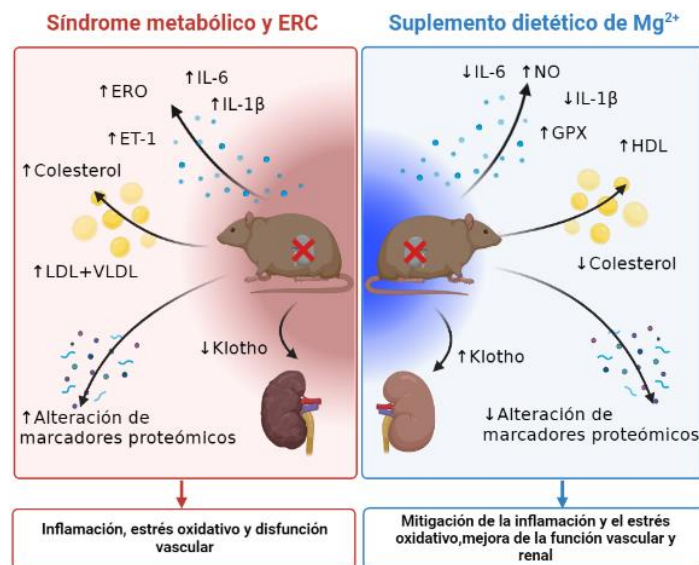


Figura 58. En un modelo *in vivo* de SMet y ERC, el efecto de las patologías concomitantes promueven inflamación, EO y disfunción vascular. El suplemento de Mg^{2+} (0,6%) en la dieta disminuye los efectos de la inflamación y el EO, junto con una mejora de la función vascular y renal.

Patologías de alta prevalencia como el SMet y la ERC están asociadas a la ECV. Tanto en SMet como en ERC, las alteraciones vasculares están causalmente asociadas con la inducción de EO e inflamación. Además, el SMet se ha asociado claramente con la ERC [256]. Se ha demostrado que los pacientes con un SMet no controlado presentan un mayor riesgo de deterioro rápido de la función renal en comparación con aquellos con patrones dietéticos controlados [257]. De hecho, el manejo terapéutico del SMet puede tener un efecto beneficioso en la prevención y el enlentecimiento de la progresión de la enfermedad renal [256]. Dado que cada vez hay más evidencias de que algunos parámetros del metabolismo mineral son posibles factores de riesgo cardiovascular como el P, Mg^{2+} , FGF23, Vit D o Klotho [128], un manejo sobre estos parámetros podría tener un efecto beneficioso sobre la ERC y el SMet concurrentes. En nuestro estudio, el suplemento dietético con Mg^{2+} fue capaz de mejorar la uremia y restablecer total o parcialmente los niveles fisiológicos de algunos de estos parámetros, como el P ó el FGF23. En pacientes con ERC, los niveles elevados de FGF23 se han asociado con hipertrofia de ventrículo izquierdo incrementando la mortalidad cardiovascular. A nivel vascular, resultados obtenidos por nuestro grupo han revelado que los altos niveles de FGF23 también provocan un cambio fenotípico en las CMLV. Este cambio de fenotipo desde el contráctil al sintético conlleva un aumento de la rigidez arterial y el deterioro de la función vascular, lo que en última instancia empeora la enfermedad cardiovascular [39]. Por lo tanto, la reducción de FGF23 que promueve el suplemento dietético de Mg^{2+} protege también de forma indirecta frente al daño cardiovascular.

También hemos demostrado en esta tesis un efecto protector de Mg^{2+} sobre la expresión renal de Klotho. Hubo una marcada disminución de este co-receptor en el grupo SMet+Nx con dieta normal de Mg^{2+} (0,1%), que fue corregida con el suplemento dietético de Mg^{2+} 0,6%. Datos de otros grupos detallan el efecto vasculoprotector del Klotho sobre la aterosclerosis y la disfunción endotelial [258, 259]. Entre los efectos vasculoprotectores de Klotho se encuentra el aumento de producción de NO, el incremento de la expresión de superóxido dismutasa al inhibir la señalización insulina/IGF-1, así como suprime la vía de señalización Wnt, la apoptosis y la síntesis de aldosterona [260]. Además, experimentos realizados con alto contenido de Mg^{2+} en la dieta inhibieron la calcificación en ratones knock-out para Klotho [261]. Hallazgos realizados por Zhou y colaboradores observaron cómo los niveles séricos de Klotho están inversamente asociados con HTA [262]. Incluso estudios recientes apoyan una interacción entre Klotho y la HTA en la que la deficiencia de Klotho facilita el envejecimiento vascular y la disfunción endotelial [263]. Wang y colaboradores observaron como en CMLV de aorta de ratas transfectadas con ADNc de Klotho, el aumento de expresión de Klotho que no sólo disminuyó la expresión de la proteína NOX y la producción de superóxido intracelular, sino

que también atenuó la producción de superóxido, el daño oxidativo y la apoptosis inducidos por AngII [264].

Además, en nuestro modelo experimental de SMet el suplemento de Mg^{2+} mejoró parámetros clave en el desarrollo del SMet como los niveles de glucosa, el perfil lipídico o la hipertensión arterial, hasta niveles similares a los del grupo control. Nuestros resultados muestran que el suplemento de Mg^{2+} disminuyó colesterol y LDL+VLDL y aumentó HDL. Estos resultados están de acuerdo con los hallazgos de T. Vaskonen y colaboradores, donde observan como el enriquecimiento en la dieta de Ca^{2+} y Mg^{2+} mejora el perfil lipídico de ratas Zucker obesas [265]. Se ha comprobado *in vitro* que niveles reducidos de Mg^{2+} se asocian con un incremento en el transporte de LDL y su oxidación, así como en la liberación de PDGF y moléculas de adhesión, todos ellos aspectos clave que pueden favorecer el desarrollo de la ECV [79].

Nuestros resultados mostraron que en la uremia se agrava la HTA inducida por el SMet. En este contexto, pudimos observar como el suplemento dietético de Mg^{2+} disminuyó significativamente la PA de los animales con uremia y SMet. Uno de los mecanismos por los cuales el Mg^{2+} podría reducir la PA es actuando como un bloqueador natural de los canales de Ca^{2+} . En un metaanálisis que englobó seis estudios y 20.119 casos de HTA, se encontró una relación inversa entre el Mg^{2+} dietético y la HTA cuando se compararon los grupos con la ingesta más alta y baja de Mg^{2+} [266]. Así, el incremento de la ingesta de Mg^{2+} se asoció con una reducción del riesgo de HTA. Otro metaanálisis que incluyó 11 estudios con 543 pacientes con factores de riesgo para la HTA como resistencia a la insulina, prediabetes o enfermedades no transmisibles como DT2 o ERC, encontró que la administración de suplementos de Mg^{2+} redujo también tanto la PAS como PAD [267]. Los resultados obtenidos en esta tesis respecto a la PA son también consistentes con los cambios observados en la producción de ET-1 y NO. Los animales alimentados con altos niveles de Mg^{2+} en la dieta mostraron niveles similares a los controles, indicando así una mejoría de la disfunción vascular presente en este modelo experimental. Se ha demostrado que el Mg^{2+} potencia la producción de mediadores vasodilatadores locales y facilita la respuesta vascular a las sustancias vasoactivas. En un estudio realizado en ratones tratados con hipoxia crónica, un suplemento de Mg^{2+} atenuó la respuesta contráctil inducida por ET-1 y mejoró la vasodilatación a través de la liberación de NO del endotelio [268]. Además, en ratas hipertensas la adición de Mg^{2+} en la dieta no sólo atenuó el efecto de la ET-1 sino que redujo su expresión génica [269].

Tanto la inflamación como el EO son característicos del SMet y la ERC que contribuyen a trastornos vasculares como la aterosclerosis [270, 271, 272, 273]. Nuestros resultados mostraron que

en las ratas con SMet y ERC alimentadas con una dieta normal de Mg^{2+} , se produjo una respuesta inflamatoria vascular, como se deduce de la elevación de la expresión de las citoquinas inflamatorias IL-6 y IL-1 β en el tejido aórtico, además de la activación de NF- κ B. Este efecto se vio atenuado tras el suplemento dietético de Mg^{2+} al 0,6%, no observándose diferencias respecto al grupo control. Nuestros hallazgos subrayan que la existencia simultánea de SMet y ERC contribuyen a una inflamación significativa de la pared vascular y este proceso patológico puede ser modulado por el Mg^{2+} en la dieta.

El EO se ha asociado también ampliamente con el SMet y la ERC [272, 273]. En nuestro estudio, la actividad plasmática de la enzima GPx, descendió significativamente en aquellas ratas con SMet y ERC alimentadas con una dieta normal de Mg^{2+} , lo que conduce a un agotamiento de la batería endógena antioxidante y a la aparición de EROS que afectan a macromoléculas celulares (proteínas, ADN, lípidos, glucosa...) que terminan generando EO, disfunción celular y tisular. Ciertamente, la inhibición de la actividad GPx se correlacionó con el aumento de MDA, un biomarcador de daño oxidativo derivado de la peroxidación lipídica. Fue muy relevante demostrar que tanto la actividad GPx plasmática como los niveles de MDA del grupo suplementado con Mg^{2+} fueron restituidos hasta valores similares a los del grupo control. En este sentido hay que mencionar que el riñón es el principal órgano responsable de la producción de GPx, que posteriormente se excreta al plasma. La deficiencia de esta enzima durante la ERC en pacientes y animales de experimentación se ha relacionado con eventos cardiovasculares [274, 275]. Cabe destacar que en los pacientes con SMet la peroxidación de LDL es elevada, lo que favorece la aterosclerosis y la ECV en la ERC [276]. Por lo tanto, la prevención de la disminución de la actividad plasmática de la GPx mediante la administración de suplementos de Mg^{2+} podría proteger del excesivo EO y, por lo tanto, del mayor riesgo de ECV dependiente del SMet y la ERC. Además, los altos niveles de oxLDL son citotóxicos en el riñón y se ha observado que reducen la expresión de Klotho renal [277]. Por lo tanto, es probable que la preservación de Klotho renal y la función renal por la suplementación de Mg^{2+} que hemos observado también podría ser mediada a través de la reducción del EO. Los efectos de Klotho como inhibidor del EO ya han sido descritos en otros tejidos y células [278, 279]. Además, el EO también se puede generar por la sobreactivación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), el cual puede ser activado por la deficiencia de Mg^{2+} [280]. La AngII activa NOX y disminuye la expresión de los transportadores TRPM6 y TRPM7, lo que aumenta aún más la deficiencia de Mg^{2+} intracelular [247]. Debido a que la producción de AngII y aldosterona son dependientes de Ca^{2+} , una infusión de Mg^{2+} en humanos disminuye la producción de estos, al inhibir la entrada de Ca^{2+} celular [281]. Asimismo, la deficiencia de Mg^{2+} y el aumento de Ca^{2+} estimula la actividad de la fosfolipasa A2 [282]; enzima encargada de movilizar los ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos que pueden ser fácilmente oxidados por EROs para formar

hidroperóxidos lipídicos. A su vez, los hidroperóxidos pueden descomponerse para formar nuevos radicales, iniciando así reacciones en cadena de ramificación que conducen a una peroxidación autosostenida [280]. Hay resultados que demuestran como un estado deficiente en Mg^{2+} se asocia con diabetes, un control glucémico deficiente y resistencia a la insulina [181]. Por otro lado, el aumento de la ingesta de Mg^{2+} mejoró la sensibilidad a la insulina, la hiperglucemia, la hiperlipidemia y redujo la peroxidación lipídica en ratas alimentadas con fructosa [283]. Además, dado que se ha demostrado que el EO está asociado a alteraciones en las vías de señalización de ET-1 y NO [284], la modulación del EO ejercida por el suplemento de Mg^{2+} también podría haber tenido un papel en el mantenimiento de los niveles de ET-1 y NO y, por tanto, de la presión arterial y la función vascular que hemos observado.

Resultados previos de otros grupos de investigación realizados en pacientes con SMet usando técnicas multiómicas proporcionaron información relevante acerca de los perfiles moleculares implicados en la patología [285]. También se observó que el suplemento de Mg^{2+} durante 4 semanas en pacientes con sobrepeso condujo a cambios favorables en la expresión génica y el perfil proteómico con efectos beneficiosos en varias vías metabólicas relacionadas con el metabolismo de la insulina y la glucosa, la inflamación y la homeostasis del Mg^{2+} como son C1QTNF9 (complemento C1q y proteína 9 relacionada con factor de necrosis tumoral), PPBP (proteína básica pro-plaquetaria), y los canales TRPM6 y TRPM7, respectivamente [286]. En esta tesis, con el fin de dilucidar el efecto del suplemento de Mg^{2+} sobre la disfunción vascular y la inflamación en el SMet-ERC, se procedió a realizar un análisis proteómico. Los resultados, evidenciaron un total de 22 proteínas expresadas diferencialmente debido a los cambios inducidos por la nefrectomía. De estas proteínas, 11 presentaron cambios en el grupo Nx tras el suplemento de Mg^{2+} . El análisis de las rutas proteómicas reveló un conjunto de 8 rutas implicadas significativamente en el efecto del Mg^{2+} . En consecuencia, el presente estudio nos permitió también establecer la identificación de un perfil proteómico concreto que podría ser igualmente útil como biomarcador de daño presente en pacientes con SMet y en la ERC.

Del total de las 22 proteínas, excepto Ces1c, las demás proteínas presentaron cambios significativos entre el grupo control y el grupo SMet+Nx- $Mg^{2+}0,1\%$. De esta manera, como se ha comentado, el análisis estadístico mostró 11 proteínas diferencialmente expresadas entre los grupos nefrectomizados alimentados con Mg^{2+} normal y elevado. El suplemento de Mg^{2+} produjo un descenso significativo de expresión de proteínas como Cst3, Fetub, Kng1, Kng2, Agt, Serpinc1, Cesc1 y Apob, mientras que Lumican, Serpina6 y Mug1 mostraron una regulación al alza. Por otro lado, el suplemento de Mg^{2+} revirtió los efectos provocados por la nefrectomía en 6 proteínas de tal manera que no se observaron cambios respecto al grupo control, en tales proteínas como Fetub, Serpina6, Agt, Serpinc1,

Mug1 y Apob. Otros grupos de investigación han mostrado cambios en la abundancia de estas proteínas diferencialmente expresadas en pacientes con ECV [287, 288] y SMet [285, 289]. Nuestros resultados mostraron un aumento de la expresión proteica de Lumican tras la nefrectomía, que a su vez aumenta tras la administración del suplemento de Mg^{2+} . Ésta es una proteína de la matriz extracelular unida al colágeno cuya función es el mantenimiento de la integridad del tejido conectivo en varios órganos, entre ellos la pared arterial. En la aterosclerosis coronaria, Lumican contribuye a la fibrogénesis de la placa, con una mayor inflamación aterosclerótica y se relaciona incluso con un aumento de la PA en pacientes obesos [290]. Por otra parte, aunque el aumento de los niveles séricos de Lumican se ha asociado con un aumento del colágeno y de la fibrosis, la sobreexpresión de Lumican (en grasa visceral e hígado) se ha asociado con una adaptación positiva para sensibilizar a la insulina y el aclaramiento de la glucosa [291]. En consecuencia, el papel de Lumican sobre las comorbilidades relacionadas con la ECV son controvertidos y su interpretación podría depender de un contexto patológico específico.

El análisis de las rutas proteómicas mostró también un conjunto de rutas implicadas en el sistema inmune, hemostasia, metabolismo de proteínas, unión y captación de ligandos por receptores depuradores, ensamblaje, remodelado y aclaramiento de lipoproteínas en plasma, metabolismo de lípidos, detoxificación de EROs y receptor de unión a ligando peptídico. Es de particular interés mencionar que el perfil proteómico encontrado en los análisis realizados reveló cambios en los niveles de proteínas relacionadas con el metabolismo de lípidos y lipoproteínas que se modulan tanto por la existencia de daño renal como por el suplemento de Mg^{2+} . Este efecto podría estar mediado a través de dos vías clave identificadas en la base de datos de reactoma: regulación del metabolismo lipídico por PPAR α y ensamblaje, remodelación y aclaramiento de lipoproteínas plasmáticas. Así, la proteína Lcat, que se ha asociado inversamente con la progresión del daño renal [292], disminuyó de forma similar en ambos grupos de ratas Zucker nefrectomizadas con $Mg^{2+}0,1\%$ y $Mg^{2+}0,6\%$ y no se observó ningún cambio en la Lcat tras el suplemento de $Mg^{2+}0,6\%$. Sin embargo, mientras que Agt, Apob y Serpina6 estaban altamente desregulados en las ratas urémicas, el suplemento con Mg^{2+} mantuvo los niveles de estas proteínas similares a los de ratas sanas control. Cabe destacar además que todas ellas están relacionadas con la ECV. Se ha descrito una asociación inversa entre Serpina6 y la ECV y el riesgo inflamatorio [293]. En particular, se ha demostrado que la IL-6 inhibe la expresión génica y proteica de la Serpina6 *in vitro* permitiendo que más cortisol “libre” actúe en la vasculatura en la aterosclerosis en un intento de amortiguar la respuesta inflamatoria [294]. Sin embargo, los aumentos prolongados en el cortisol libre pueden volverse desadaptativos y potenciar el desarrollo de placas [295]. La Apob, un componente esencial de las VLDL y sus metabolitos, y un componente proteico estructural clave de las principales lipoproteínas aterogénicas [296], es un buen indicador de ECV, resistencia a la insulina,

SMet e inflamación [288]. El Agt, precursor de la AngII, es un elemento clave del SRAA, que está fuertemente implicado en la ECV [297]. También se han establecido efectos independientes de la AngII sobre la función renal [298]. Es importante mencionar que estas proteínas también parecen estar implicadas en otras vías relacionadas con el sistema inmunitario, la hemostasia o el metabolismo de proteínas. Es probable que la modulación de dos proteínas pleiotrópicas como la ApoB y la Agt, con muchos efectos fisiológicos estrechamente relacionados con el riesgo de ECV, sea un mecanismo subyacente al efecto protector del Mg^{2+} dietético que hemos observado.

El análisis proteómico también destacó a la detoxificación de EROs como otra vía importante a través de la modulación de la abundancia sérica de la GPx3 extracelular, una enzima antioxidante que apareció regulada a la baja en los animales nefrectomizados en comparación con los controles. Los pacientes con ERC muestran una deficiencia de esta enzima [299] y es un factor importante que contribuye al desarrollo de cardiopatías inducidas por insuficiencia renal [300]. En nuestro estudio no se observaron diferencias en la cantidad de GPx3 entre los dos regímenes de Mg^{2+} dietético, aunque la actividad GPx medida en plasma estaba más reducida en las ratas con Mg^{2+} normal que en las suplementadas con Mg^{2+} . Además, los procesos relacionados con el sistema inmunitario y la hemostasia incluyen proteínas que muestran una abundancia alterada como resultado de la concurrencia de SMet y ERC. En general, los niveles de estas proteínas aparecieron aumentados en la disfunción renal. Esto incluye Kng1, un importante factor proinflamatorio y prooxidante perteneciente al sistema calicreína-quinina que regula la función cardiovascular y renal [301, 302], la Cst3, un biomarcador reconocido de daño renal, SMet y predictor de ECV [303, 304] y la ApoB citada anteriormente. También hay que mencionar que el sistema calicreína-quinina constituye una cascada multienzimática compleja que usa el Kng1 como precursor con un potente factor vasodilatador, mediador de respuestas inflamatorias y antioxidantes frente al EO [305, 306]. Además, es interesante señalar que este aumento de Kng1, Cst3 y Apob se evitó total o parcialmente mediante la administración del suplemento de Mg^{2+} en la dieta. Por otro lado, la Mug1 que se ha asociado inversamente con la respuesta inflamatoria [307], mostró una reducción en el grupo Nx- Mg^{2+} 0,1%. Mug1 es un homólogo de la α 2-macroglobulina humana, otro inhibidor de proteasas y un componente principal del plasma humano que inhibe factores de coagulación y la calicreína plasmática entre otros [308]. De forma similar, los ratones deficientes en Mug1 también muestran niveles plasmáticos elevados de citoquinas entre las que se encuentran IL-1 β , IL-6 y TNF α , lo que indica su implicación con la inflamación [309].

La deficiencia de Mg^{2+} se asocia con un mayor riesgo de múltiples manifestaciones preclínicas y clínicas presentes en el SMet [310]. Los resultados de varios estudios clínicos han demostrado que el aumento de la síntesis y la liberación de citoquinas proinflamatorias desencadenan un proceso de

inflamación crónica en el SMet [311]. Por otro lado, la hipomagnesemia desencadena una inflamación crónica de bajo grado [179]. La ingesta de Mg^{2+} es inversamente proporcional a los parámetros que identifican el SMet junto con los niveles de insulina en ayunas. Esto sugiere que una mayor ingesta de Mg^{2+} podría tener un papel protector frente al riesgo de desarrollar SMet [310]. En este mismo sentido, otras investigaciones han observado que jóvenes con una ingesta alta de Mg^{2+} tienen menor riesgo de desarrollar SMet y ese riesgo es dependiente de la dosis de Mg ingerida [312]. Estos hallazgos respaldan nuestros resultados y apoyan la idea de que el suplemento de Mg^{2+} puede desempeñar un papel importante en la prevención de la fisiopatología del SMet.

Debemos reconocer que el presente trabajo tiene también algunas limitaciones. Una de ellas es la ausencia de un estudio en pacientes que aborde las condiciones experimentales estudiadas. Nuestros datos podrían proporcionar nuevos conocimientos sobre los efectos beneficiosos del aumento de los niveles plasmáticos de Mg^{2+} facilitando una prevención del desarrollo de lesiones cardiovasculares y daños renales que pueden ayudar en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos en el futuro. Hay que reconocer que faltan ensayos clínicos independientes con tamaños de población aceptables en los que se valore con precisión tanto los potenciales efectos beneficiosos del Mg como el mayor riesgo en los casos de hipermagnesemia.

Como resumen de este segundo bloque de experimentos se concluye que en el modelo de rata con SMet y ERC con alto P en la dieta, el suplemento dietético con Mg^{2+} protege frente a la inflamación y el EO desarrollado durante el SMet y la ERC, permitiendo una mejora de la función vascular que repercute sobre la progresión de la ERC y la ECV. En conjunto, consideramos que, nuestros hallazgos demuestran que el suplemento de Mg^{2+} muestra un papel protector frente a la inflamación y la disfunción vascular inducidas en condiciones experimentales (niveles elevados de P y uremia) que se asocian habitualmente con el desarrollo de alteraciones cardiovasculares como las encontradas en el SMet. Además, mediante el análisis proteómico, hemos podido identificar posibles biomarcadores que nos ayuden a controlar el avance de las patologías aquí analizadas. Todo ello, sugiere que el mantenimiento del Mg^{2+} puede convertirse en una herramienta útil e inmediata para el manejo de los pacientes en diferentes estadios de la ERC, así como afectados por patologías con elevado riesgo de sufrir disfunciones vasculares, como el SMet.

Si bien la utilidad de los suplementos de Mg^{2+} deben ser objeto de más estudios, la prevención de la hipomagnesemia también debe ser considerada como un elemento importante a tener en cuenta para prevenir la progresión de la ERC y la ECV. Un diagnóstico y un tratamiento tardío de la hipomagnesemia puede incrementar la progresión de la ERC y los factores de riesgo cardiovascular.

Por lo tanto, la hipomagnesemia debe reconocerse y tratarse de la forma más precoz posible para que no repercuta negativamente en el pronóstico y la evolución clínica del paciente.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

- En estas células el incremento de magnesio en el medio de cultivo disminuye el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria a través de la inhibición de la vía NF- κ B.
- En ratas con insuficiencia renal crónica, el suplemento de magnesio en la dieta disminuye el estrés oxidativo y la inflamación tanto a nivel renal como vascular.
- En un modelo experimental de síndrome metabólico y enfermedad renal crónica, el suplemento dietético con magnesio protege frente al estrés oxidativo y la inflamación vascular mejorando con ello la función vascular.
- Los niveles plasmáticos de magnesio podrían considerarse como una herramienta útil para prevenir el daño vascular y renal de pacientes con enfermedad renal crónica, especialmente de aquellos afectados por patologías con elevado riesgo de disfunción vascular, como el síndrome metabólico.

REFERENCIAS

- [1] R. Vanholder *et al.*, “Reducing the costs of chronic kidney disease while delivering quality health care: a call to action,” *Nat Rev Nephrol*, vol. 13, no. 7, pp. 393–409, Jul. 2017, doi: 10.1038/NRNEPH.2017.63.
- [2] M. Gorostidi *et al.*, “Spanish Society of Nephrology document on KDIGO guidelines for the assessment and treatment of chronic kidney disease,” *Nefrologia*, vol. 34, no. 3, pp. 302–316, 2014, doi: 10.3265/NEFROLOGIA.PRE2014.FEB.12464.
- [3] D. Prié and G. Friedlander, “Reciprocal control of 1,25-dihydroxyvitamin D and FGF23 formation involving the FGF23/Klotho system,” *Clin J Am Soc Nephrol*, vol. 5, no. 9, pp. 1717–1722, Sep. 2010, doi: 10.2215/CJN.02680310.
- [4] A. M. Cusumano, “KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease–Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD),” *Kidney Int Suppl*, vol. 31, no. 113, pp. 49–55, 2009, doi: 10.1038/KI.2009.188.
- [5] M. Mizobuchi, H. Ogata, and F. Koiwa, “Secondary Hyperparathyroidism: Pathogenesis and Latest Treatment,” *Ther Apher Dial*, vol. 23, no. 4, pp. 309–318, 2019, doi: 10.1111/1744-9987.12772.
- [6] S. Moe *et al.*, “Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO),” *Kidney Int*, vol. 69, no. 11, pp. 1945–1953, Jun. 2006, doi: 10.1038/SJ.KI.5000414.
- [7] S. M. Sprague, K. J. Martin, and D. W. Coyne, “Phosphate Balance and CKD–Mineral Bone Disease,” *Kidney Int Rep*, vol. 6, no. 8, p. 2049, Aug. 2021, doi: 10.1016/J.EKIR.2021.05.012.
- [8] J. Cunningham, F. Locatelli, and M. Rodriguez, “Secondary hyperparathyroidism: pathogenesis, disease progression, and therapeutic options,” *Clin J Am Soc Nephrol*, vol. 6, no. 4, pp. 913–921, Apr. 2011, doi: 10.2215/CJN.06040710.
- [9] G. B. John, C. Y. Cheng, and M. Kuro-O, “Role of Klotho in Aging, Phosphate Metabolism, and CKD,” *Am J Kidney Dis*, vol. 58, no. 1, p. 127, Jul. 2011, doi: 10.1053/J.AJKD.2010.12.027.
- [10] A. Kale, H. Sankrityayan, H. J. Anders, and A. B. Gaikwad, “Epigenetic and non-epigenetic regulation of Klotho in kidney disease,” *Life Sci*, vol. 264, p. 118644, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.LFS.2020.118644.
- [11] E. Slatopolsky, A. Brown, and A. Dusso, “Calcium, phosphorus and vitamin D disorders in uremia,” *Contrib Nephrol*, vol. 149, pp. 261–271, 2005, doi: 10.1159/000085687.
- [12] M. Tinawi, “Disorders of Calcium Metabolism: Hypocalcemia and Hypercalcemia,” *Cureus*, vol. 13, no. 1, Jan. 2021, doi: 10.7759/CUREUS.12420.
- [13] P. Evenepoel, J. Bover, and P. Ureña Torres, “Parathyroid hormone metabolism and signaling in health and chronic kidney disease,” *Kidney Int*, vol. 90, no. 6, pp. 1184–1190, Dec. 2016, doi: 10.1016/J.KINT.2016.06.041.

- [14] S. C. Hebert and E. M. Brown, “The scent of an ion: calcium-sensing and its roles in health and disease,” *Curr Opin Nephrol Hypertens.*, 1996. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8834161/> (accessed Mar. 16, 2022).
- [15] D. Pietrobon, F. di Virgilio, and T. Pozzan, “Structural and functional aspects of calcium homeostasis in eukaryotic cells,” *Eur J Biochem*, vol. 193, no. 3, pp. 599–622, 1990, doi: 10.1111/J.1432-1033.1990.TB19378.X.
- [16] T. Isakova *et al.*, “Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease,” *Kidney Int*, vol. 79, no. 12, pp. 1370–1378, 2011, doi: 10.1038/KI.2011.47.
- [17] J. L. Shaker and L. Deftos, “Calcium and Phosphate Homeostasis,” *Endocrine and Reproductive Physiology*, pp. 77-e1, Jan. 2018, doi: 10.1016/b978-0-323-08704-9.00004-x.
- [18] G. Dalfino *et al.*, “Bone morphogenetic protein-2 may represent the molecular link between oxidative stress and vascular stiffness in chronic kidney disease,” *Atherosclerosis*, vol. 211, no. 2, pp. 418–423, Aug. 2010, doi: 10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2010.04.023.
- [19] J. S. Shao *et al.*, “Vascular Bmp Msx2 Wnt signaling and oxidative stress in arterial calcification,” *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1117, pp. 40–50, 2007, doi: 10.1196/ANNALS.1402.075.
- [20] M. Albalate Ramón, P. de Sequera Ortíza, E. Izquierdo García, and M. Rodríguez Portillo, “Trastornos del Calcio, Fósforo y Magnesio | Nefrología al día,” *Nefrología al día*. <https://www.nefrologiaaldia.org/es-articulo-trastornos-del-calcio-fosforo-magnesio-206> (accessed Mar. 16, 2022).
- [21] T. Knöpfel, N. Himmerkus, D. Günzel, M. Bleich, N. Hernando, and C. A. Wagner, “Paracellular transport of phosphate along the intestine,” *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 317, no. 2, pp. G233–G241, Aug. 2019, doi: 10.1152/AJPGI.00032.2019/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH30071976280005.JPEG.
- [22] A. J. King *et al.*, “Inhibition of sodium/hydrogen exchanger 3 in the gastrointestinal tract by tenapanor reduces paracellular phosphate permeability,” *Sci Transl Med*, vol. 10, no. 456, Aug. 2018, doi: 10.1126/SCITRANSLMED.AAM6474.
- [23] M. T. Château, C. Araiz, S. Descamps, and S. Galas, “Klotho interferes with a novel FGF-signalling pathway and insulin/Igf-like signalling to improve longevity and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*,” *Aging*, vol. 2, no. 9, pp. 567–581, Feb. 2022, doi: 10.18632/AGING.100195.
- [24] S. K. Murali, P. Roschger, U. Zeitz, K. Klaushofer, O. Andrukhova, and R. G. Erben, “FGF23 Regulates Bone Mineralization in a 1,25(OH)2D3 and Klotho-Independent Manner,” *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 31, no. 1, pp. 129–142, Jan. 2016, doi: 10.1002/JBMR.2606.
- [25] V. S. Tagliabracci *et al.*, “Dynamic regulation of FGF23 by Fam20C phosphorylation, GalNAc-T3 glycosylation, and furin proteolysis,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 111, no. 15, pp. 5520–5525, Apr. 2014, doi: 10.1073/PNAS.1402218111/SUPPL_FILE/PNAS.201402218SI.PDF.

- [26] R. Goetz *et al.*, “Conversion of a paracrine fibroblast growth factor into an endocrine fibroblast growth factor,” *J Biol Chem*, vol. 287, no. 34, pp. 29134–29146, Aug. 2012, doi: 10.1074/JBC.M112.342980.
- [27] A. Grabner *et al.*, “Activation of Cardiac Fibroblast Growth Factor Receptor 4 Causes Left Ventricular Hypertrophy,” *Cell Metab*, vol. 22, no. 6, pp. 1020–1032, 2015, doi: 10.1016/J.CMET.2015.09.002.
- [28] I. Urakawa *et al.*, “Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23,” *Nature*, vol. 444, no. 7120, pp. 770–774, Dec. 2006, doi: 10.1038/NATURE05315.
- [29] S. Singh *et al.*, “Fibroblast growth factor 23 directly targets hepatocytes to promote inflammation in chronic kidney disease.,” *Kidney Int*, vol. 90, no. 5, pp. 985–996, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.kint.2016.05.019.
- [30] S. Liu and L. D. Quarles, “How fibroblast growth factor 23 works,” *J Am Soc Nephrol*, vol. 18, no. 6, pp. 1637–1647, Jun. 2007, doi: 10.1681/ASN.2007010068.
- [31] R. G. Erben and O. Andrukhova, “FGF23-Klotho signaling axis in the kidney,” *Bone*, vol. 100, pp. 62–68, Jul. 2017, doi: 10.1016/J.BONE.2016.09.010.
- [32] T. Shimada *et al.*, “FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis,” *J Bone Miner Res*, vol. 19, no. 3, pp. 429–435, Mar. 2004, doi: 10.1359/JBMR.0301264.
- [33] H. Tsujikawa, Y. Kurotaki, T. Fujimori, K. Fukuda, and Y. I. Nabeshima, “Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system,” *Mol Endocrinol*, vol. 17, no. 12, pp. 2393–2403, Dec. 2003, doi: 10.1210/ME.2003-0048.
- [34] X. Lu and M. C. Hu, “Klotho/FGF23 Axis in Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease,” *Kidney Diseases*, vol. 3, no. 1, p. 15, 2017, doi: 10.1159/000452880.
- [35] J. Ärnlov *et al.*, “Serum FGF23 and risk of cardiovascular events in relation to mineral metabolism and cardiovascular pathology,” *Clin J Am Soc Nephrol*, vol. 8, no. 5, pp. 781–786, May 2013, doi: 10.2215/CJN.09570912.
- [36] N. Silswal *et al.*, “FGF23 directly impairs endothelium-dependent vasorelaxation by increasing superoxide levels and reducing nitric oxide bioavailability,” *Am J Physiol Endocrinol Metab*, vol. 307, no. 5, pp. E426–E436, Sep. 2014, doi: 10.1152/AJPENDO.00264.2014.
- [37] J. H. Ix *et al.*, “Fibroblast growth factor-23 and death, heart failure, and cardiovascular events in community-living individuals: CHS (Cardiovascular Health Study),” *J Am Coll Cardiol*, vol. 60, no. 3, pp. 200–207, Jul. 2012, doi: 10.1016/J.JACC.2012.03.040.
- [38] C. Faul *et al.*, “FGF23 induces left ventricular hypertrophy,” *J Clin Invest*, vol. 121, no. 11, pp. 4393–4408, Nov. 2011, doi: 10.1172/JCI46122.
- [39] N. Vergara *et al.*, “The Direct Effect of Fibroblast Growth Factor 23 on Vascular Smooth Muscle Cells Phenotype and Function,” *Nephrol Dial Transplant*, Jul. 2022, doi: 10.1093/NDT/GFAC220.

- [40] S. Soriano *et al.*, “The effect of phosphate binders, calcium and lanthanum carbonate on FGF23 levels in chronic kidney disease patients,” *Clin Nephrol*, vol. 80, no. 1, pp. 17–22, 2013, doi: 10.5414/CN107764.
- [41] O. M. Gutiérrez *et al.*, “Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis,” *N Engl J Med*, vol. 359, no. 6, pp. 584–592, Aug. 2008, doi: 10.1056/NEJM0A0706130.
- [42] C. Rodelo-Haad *et al.*, “Phosphate control in reducing FGF23 levels in hemodialysis patients,” *PLoS One*, vol. 13, no. 8, Aug. 2018, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0201537.
- [43] M. E. Rodríguez-Ortiz *et al.*, “Inflammation both increases and causes resistance to FGF23 in normal and uremic rats,” *Clin Sci (Lond)*, vol. 134, no. 1, pp. 15–32, Jan. 2020, doi: 10.1042/CS20190779.
- [44] N. Ito *et al.*, “Regulation of FGF23 expression in IDG-SW3 osteocytes and human bone by pro-inflammatory stimuli,” *Mol Cell Endocrinol*, vol. 399, pp. 208–218, Jan. 2015, doi: 10.1016/J.MCE.2014.10.007.
- [45] A. Daryadel *et al.*, “Erythropoietin stimulates fibroblast growth factor 23 (FGF23) in mice and men,” *Pflugers Arch*, vol. 470, no. 10, pp. 1569–1582, Oct. 2018, doi: 10.1007/S00424-018-2171-7/FIGURES/10.
- [46] J. R. Muñoz-Castañeda *et al.*, “Differential regulation of renal Klotho and FGFR1 in normal and uremic rats,” *FASEB J*, vol. 31, no. 9, pp. 3858–3867, Sep. 2017, doi: 10.1096/FJ.201700006R.
- [47] I. Nemere, “The ins and outs of phosphate homeostasis,” *Kidney Int*, vol. 72, no. 2, pp. 140–142, 2007, doi: 10.1038/SJ.KI.5002005.
- [48] M. C. Hu *et al.*, “Renal Production, Uptake, and Handling of Circulating α Klotho,” *J Am Soc Nephrol*, vol. 27, no. 1, pp. 79–90, Jan. 2016, doi: 10.1681/ASN.2014101030.
- [49] R. Mencke *et al.*, “Human alternative Klotho mRNA is a nonsense-mediated mRNA decay target inefficiently spliced in renal disease,” *JCI Insight*, vol. 2, no. 20, Oct. 2017, doi: 10.1172/JCI.INSIGHT.94375.
- [50] M. Kuro-o, “The Klotho proteins in health and disease,” *Nat Rev Nephrol*, vol. 15, no. 1, pp. 27–44, Jan. 2019, doi: 10.1038/S41581-018-0078-3.
- [51] S. Li, L. Yu, A. He, and Q. Liu, “Klotho Inhibits Unilateral Ureteral Obstruction-Induced Endothelial-to-Mesenchymal Transition via TGF- β 1/Smad2/Snail1 Signaling in Mice,” *Front Pharmacol*, vol. 10, no. APR, 2019, doi: 10.3389/FPHAR.2019.00348.
- [52] S. Iurciuc, A. M. Cimpean, F. Mitu, R. Heredeia, and M. Iurciuc, “Vascular aging and subclinical atherosclerosis: why such a ‘never ending’ and challenging story in cardiology?,” *Clin Interv Aging*, vol. 12, pp. 1339–1345, Aug. 2017, doi: 10.2147/CIA.S141265.
- [53] R. Mencke and J. L. Hillebrands, “The role of the anti-ageing protein Klotho in vascular physiology and pathophysiology,” *Ageing Res Rev*, vol. 35, pp. 124–146, May 2017, doi: 10.1016/J.ARR.2016.09.001.

- [54] M. Kuro-o *et al.*, “Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing,” *Nature*, vol. 390, no. 6655, pp. 45–51, Nov. 1997, doi: 10.1038/36285.
- [55] T. Shimada *et al.*, “Targeted ablation of *Fgf23* demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism,” *J Clin Invest*, vol. 113, no. 4, pp. 561–568, Feb. 2004, doi: 10.1172/JCI19081.
- [56] W. L. Lau *et al.*, “Vitamin D receptor agonists increase *klotho* and osteopontin while decreasing aortic calcification in mice with chronic kidney disease fed a high phosphate diet,” *Kidney Int*, vol. 82, no. 12, pp. 1261–1270, Dec. 2012, doi: 10.1038/KI.2012.322.
- [57] M. F. Holick, “Vitamin D deficiency,” *N Engl J Med*, vol. 357, no. 3, pp. 266–281, 2007, doi: 10.1056/NEJMRA070553.
- [58] L. A. Plum and H. F. Deluca, “Vitamin D, disease and therapeutic opportunities,” *Nat Rev Drug Discov*, vol. 9, no. 12, pp. 941–955, Dec. 2010, doi: 10.1038/NRD3318.
- [59] A. S. Dusso and M. Tokumoto, “Defective renal maintenance of the vitamin D endocrine system impairs vitamin D renoprotection: a downward spiral in kidney disease,” *Kidney Int*, vol. 79, no. 7, pp. 715–729, 2011, doi: 10.1038/KI.2010.543.
- [60] S. W. Chang and H. C. Lee, “Vitamin D and health - The missing vitamin in humans,” *Pediatr Neonatol*, vol. 60, no. 3, pp. 237–244, Jun. 2019, doi: 10.1016/J.PEDNEO.2019.04.007.
- [61] J. E. Manson, P. M. Brannon, C. J. Rosen, and C. L. Taylor, “Vitamin D Deficiency - Is There Really a Pandemic?,” *N Engl J Med*, vol. 375, no. 19, pp. 1817–1820, Nov. 2016, doi: 10.1056/NEJMP1608005.
- [62] Y. Y. Chau and J. Kumar, “Vitamin D in Chronic Kidney Disease,” *Indian J Pediatr*, vol. 79, no. 8, p. 1062, Aug. 2012, doi: 10.1007/S12098-012-0765-1.
- [63] J. F. Habener, “Regulation of parathyroid hormone secretion and biosynthesis,” *Annu Rev Physiol*, vol. 43, pp. 211–223, 1981, doi: 10.1146/ANNUREV.PH.43.030181.001235.
- [64] Tapia Hugo, Mora Carmen, and Navarro Juan, “Magnesio en la Enfermedad Renal Crónica | Nefrología,” *Nefrología*, 2007. <https://www.revistanefrologia.com/es-magnesio-enfermedad-renal-cronica-articulo-X0211699507022176> (accessed Mar. 15, 2022).
- [65] K. Pasternak, J. Kocot, and A. Horecka, “Biochemistry of magnesium,” *J Elem*, vol. 15, no. 3, pp. 601–616, 2010, doi: 10.5601/JELEM.2010.15.3.601-616.
- [66] J. H. F. de Baaij, J. G. J. Hoenderop, and R. J. M. Bindels, “Regulation of magnesium balance: lessons learned from human genetic disease,” *Clin Kidney J*, vol. 5, no. Suppl 1, p. i15, Feb. 2012, doi: 10.1093/NDTPLUS/SFR164.
- [67] A. C. Alfrey, N. L. Miller, and R. Trow, “Effect of age and magnesium depletion on bone magnesium pools in rats,” *J Clin Invest*, vol. 54, no. 5, pp. 1074–1081, 1974, doi: 10.1172/JCI107851.
- [68] G. Kazakova, T. Safronova, D. Golubchikov, O. Shevtsova, and J. v. Rau, “Resorbable Mg²⁺-Containing Phosphates for Bone Tissue Repair,” *Materials*, vol. 14, no. 17, Sep. 2021, doi: 10.3390/MA14174857.

- [69] W. Jahnen-Dechent and M. Ketteler, “Magnesium basics,” *Clin Kidney J*, vol. 5, no. Suppl 1, Feb. 2012, doi: 10.1093/NDTPLUS/SFR163.
- [70] N. K. Subramanian, P. J. White, M. R. Broadley, and G. Ramsay, “The three-dimensional distribution of minerals in potato tubers,” *Ann Bot*, vol. 107, no. 4, pp. 681–691, Apr. 2011, doi: 10.1093/AOB/MCR009.
- [71] J. Ayuk and N. J. L. Gittoes, “Contemporary view of the clinical relevance of magnesium homeostasis,” *Ann Clin Biochem*, vol. 51, no. 2, pp. 179–188, 2014, doi: 10.1177/0004563213517628.
- [72] E. J. Hoorn and R. Zietse, “Disorders of calcium and magnesium balance: a physiology-based approach,” *Pediatr Nephrol*, vol. 28, no. 8, pp. 1195–1206, Aug. 2013, doi: 10.1007/S00467-012-2350-2.
- [73] D. Yamazaki *et al.*, “Basolateral Mg²⁺ extrusion via CNNM4 mediates transcellular Mg²⁺ transport across epithelia: a mouse model,” *PLoS Genet*, vol. 9, no. 12, 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1003983.
- [74] L. M. M. Gommers, J. G. J. Hoenderop, R. J. M. Bindels, and J. H. F. de Baaij, “Hypomagnesemia in Type 2 Diabetes: A Vicious Circle?,” *Diabetes*, vol. 65, no. 1, pp. 3–13, Jan. 2016, doi: 10.2337/DB15-1028.
- [75] X. Qu *et al.*, “Magnesium and the risk of cardiovascular events: a meta-analysis of prospective cohort studies,” *PLoS One*, vol. 8, no. 3, Mar. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0057720.
- [76] K. Kostov and L. Halacheva, “Role of Magnesium Deficiency in Promoting Atherosclerosis, Endothelial Dysfunction, and Arterial Stiffening as Risk Factors for Hypertension,” *Int J Mol Sci*, vol. 19, no. 6, Jun. 2018, doi: 10.3390/IJMS19061724.
- [77] H. D. Kruse, E. R. Orent, and E. v McCollum, “Studies on magnesium deficiency in animals. 1. Symptomatology resulting: from magnesium deprivation.,” *Biochemical Laboratory, School of Hygiene and Public Health, the Johns Hopkins University, Baltimore*, 1932. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19321401459> (accessed Mar. 15, 2022).
- [78] C. Bubici, S. Papa, K. Dean, and G. Franzoso, “Mutual cross-talk between reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B: molecular basis and biological significance,” *Oncogene*, vol. 25, no. 51, pp. 6731–6748, Oct. 2006, doi: 10.1038/SJ.ONC.1209936.
- [79] S. Ferrè, E. Baldoli, M. Leidi, and J. A. M. Maier, “Magnesium deficiency promotes a pro-atherogenic phenotype in cultured human endothelial cells via activation of NFκB,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1802, no. 11, pp. 952–958, Nov. 2010, doi: 10.1016/J.BBADIS.2010.06.016.
- [80] R. D. Abbott *et al.*, “Dietary magnesium intake and the future risk of coronary heart disease (the Honolulu Heart Program),” *Am J Cardiol*, vol. 92, no. 6, pp. 665–669, Sep. 2003, doi: 10.1016/S0002-9149(03)00819-1.
- [81] Y. Song, P. M. Ridker, J. A. E. Manson, N. R. Cook, J. E. Buring, and S. Liu, “Magnesium intake, C-reactive protein, and the prevalence of metabolic syndrome in middle-aged and older

- U.S. women,” *Diabetes Care*, vol. 28, no. 6, pp. 1438–1444, Jun. 2005, doi: 10.2337/diacare.28.6.1438.
- [82] A. A. Evangelopoulos *et al.*, “An inverse relationship between cumulating components of the metabolic syndrome and serum magnesium levels,” *Nutr Res*, vol. 28, no. 10, pp. 659–663, Oct. 2008, doi: 10.1016/j.nutres.2008.07.001.
- [83] S. H. Park, S. K. Kim, and Y. J. Bae, “Relationship between serum calcium and magnesium concentrations and metabolic syndrome diagnostic components in middle-aged Korean men,” *Biol Trace Elem Res*, vol. 146, no. 1, pp. 35–41, Apr. 2012, doi: 10.1007/S12011-011-9224-5/TABLES/3.
- [84] F. Liao, A. R. Folsom, and F. L. Brancati, “Is low magnesium concentration a risk factor for coronary heart disease? The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study,” *Am Heart J*, vol. 136, no. 3, pp. 480–490, 1998, doi: 10.1016/S0002-8703(98)70224-8.
- [85] M. E. Rodríguez-Ortiz *et al.*, “Serum Magnesium is associated with Carotid Atherosclerosis in patients with high cardiovascular risk (CORDIOPREV Study),” *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/S41598-019-44322-Z.
- [86] D. Wang *et al.*, “Magnesium Supplementation Attenuates Pulmonary Hypertension via Regulation of Magnesium Transporters,” *Hypertension*, vol. 77, no. 2, pp. 617–631, 2021, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.14909.
- [87] E. Baldoli, S. Castiglioni, and J. A. M. Maier, “Regulation and function of TRPM7 in human endothelial cells: TRPM7 as a potential novel regulator of endothelial function,” *PLoS One*, vol. 8, no. 3, Mar. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0059891.
- [88] R. Kumar and J. R. Thompson, “The regulation of parathyroid hormone secretion and synthesis,” *J Am Soc Nephrol*, vol. 22, no. 2, pp. 216–224, Feb. 2011, doi: 10.1681/ASN.2010020186.
- [89] M. E. Rodríguez-Ortiz *et al.*, “Magnesium modulates parathyroid hormone secretion and upregulates parathyroid receptor expression at moderately low calcium concentration,” *Nephrol Dial Transplant*, vol. 29, no. 2, pp. 282–289, Feb. 2014, doi: 10.1093/NDT/GFT400.
- [90] M. Yamamoto, T. Yamaguchi, M. Yamauchi, S. Yano, and T. Sugimoto, “Acute-onset hypomagnesemia-induced hypocalcemia caused by the refractoriness of bones and renal tubules to parathyroid hormone,” *J Bone Miner Metab*, vol. 29, no. 6, pp. 752–755, Nov. 2011, doi: 10.1007/S00774-011-0275-7.
- [91] R. B. Brown, A. Haq, C. F. Stanford, and M. S. Razzaque, “Vitamin D, phosphate, and vasculotoxicity,” *Can J Physiol Pharmacol*, vol. 93, no. 12, pp. 1077–1082, Sep. 2015, doi: 10.1139/CJPP-2015-0083.
- [92] T. S. Orchard *et al.*, “Magnesium intake, bone mineral density, and fractures: results from the Women’s Health Initiative Observational Study,” *Am J Clin Nutr*, vol. 99, no. 4, pp. 926–933, Apr. 2014, doi: 10.3945/AJCN.113.067488.
- [93] M. S. Razzaque, “Magnesium: Are We Consuming Enough?,” *Nutrients*, vol. 10, no. 12, Dec. 2018, doi: 10.3390/NU10121863.

- [94] H. B. Ravn, T. L. Korsholm, and E. Falk, "Oral magnesium supplementation induces favorable antiatherogenic changes in ApoE-deficient mice," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 21, no. 5, pp. 858–862, 2001, doi: 10.1161/01.ATV.21.5.858.
- [95] T. M. Paravicini, A. Yogi, A. Mazur, and R. M. Touyz, "Dysregulation of vascular TRPM7 and annexin-1 is associated with endothelial dysfunction in inherited hypomagnesemia," *Hypertension*, vol. 53, no. 2, pp. 423–429, 2009, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.124651.
- [96] D. J. Kim *et al.*, "Magnesium intake in relation to systemic inflammation, insulin resistance, and the incidence of diabetes," *Diabetes Care*, vol. 33, no. 12, pp. 2604–2610, Dec. 2010, doi: 10.2337/DC10-0994.
- [97] S. A. Chacko *et al.*, "Relations of dietary magnesium intake to biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction in an ethnically diverse cohort of postmenopausal women," *Diabetes Care*, vol. 33, no. 2, pp. 304–310, Feb. 2010, doi: 10.2337/DC09-1402.
- [98] S. Hadj-Rabia *et al.*, "Multiplex epithelium dysfunction due to CLDN10 mutation: the HELIX syndrome," *Genetics in Medicine*, vol. 20, no. 2, pp. 190–201, Feb. 2018, doi: 10.1038/GIM.2017.71.
- [99] Z. Armaly *et al.*, "Tumor Lysis Syndrome in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Rare Case Report from Nephrology," *Am J Case Rep*, vol. 20, pp. 1776–1780, 2019, doi: 10.12659/AJCR.917211.
- [100] C. Ronco *et al.*, "Cardio-renal syndromes: report from the consensus conference of the acute dialysis quality initiative," *Eur Heart J*, vol. 31, no. 6, pp. 703–711, Mar. 2010, doi: 10.1093/EURHEARTJ/EHP507.
- [101] P. Stenvinkel and T. E. Larsson, "Chronic kidney disease: a clinical model of premature aging," *Am J Kidney Dis*, vol. 62, no. 2, pp. 339–351, Aug. 2013, doi: 10.1053/J.AJKD.2012.11.051.
- [102] G. K. Owens, M. S. Kumar, and B. R. Wamhoff, "Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease," *Physiol Rev*, vol. 84, no. 3, pp. 767–801, Jul. 2004, doi: 10.1152/PHYSREV.00041.2003.
- [103] S. S. M. Rensen, P. A. F. M. Doevendans, and G. J. J. M. van Eys, "Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity," *Neth Heart J*, vol. 15, no. 3, pp. 100–108, 2007, doi: 10.1007/BF03085963.
- [104] J. H. Brown, N. P. Vites, C. D. Short, R. Gokal, N. P. Mallick, and L. P. Hunt, "Comparative mortality from cardiovascular disease in patients with chronic renal failure," *Nephrol Dial Transplant*, vol. 9, no. 8, pp. 1136–1142, 1994, doi: 10.1093/NDT/9.8.1136.
- [105] S. M. Moe and T. B. Drüeke, "Management of secondary hyperparathyroidism: the importance and the challenge of controlling parathyroid hormone levels without elevating calcium, phosphorus, and calcium-phosphorus product," *Am J Nephrol*, vol. 23, no. 6, pp. 369–379, 2003, doi: 10.1159/000073945.

- [106] J. M. Martínez-Moreno *et al.*, “In vascular smooth muscle cells paricalcitol prevents phosphate-induced Wnt/ β -catenin activation,” *Am J Physiol Renal Physiol*, vol. 303, no. 8, Oct. 2012, doi: 10.1152/AJPRENAL.00684.2011.
- [107] G. M. London, B. Pannier, S. J. Marchais, and A. P. Guerin, “Calcification of the aortic valve in the dialyzed patient,” *J Am Soc Nephrol*, vol. 11, no. 4, pp. 778–783, Apr. 2000, doi: 10.1681/ASN.V114778.
- [108] A. M. De Oca *et al.*, “Magnesium inhibits Wnt/ β -catenin activity and reverses the osteogenic transformation of vascular smooth muscle cells,” *PLoS One*, vol. 9, no. 2, Feb. 2014, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0089525.
- [109] J. M. Diaz-Tocados *et al.*, “Dietary magnesium supplementation prevents and reverses vascular and soft tissue calcifications in uremic rats,” *Kidney Int*, vol. 92, no. 5, pp. 1084–1099, Nov. 2017, doi: 10.1016/J.KINT.2017.04.011.
- [110] I. Alesutan *et al.*, “Inhibition of osteo/chondrogenic transformation of vascular smooth muscle cells by MgCl₂ via calcium-sensing receptor,” *J Hypertens*, vol. 35, no. 3, pp. 523–532, 2017, doi: 10.1097/HJH.0000000000001202.
- [111] S. Karbach, P. Wenzel, A. Waisman, T. Munzel, and A. Daiber, “eNOS uncoupling in cardiovascular diseases--the role of oxidative stress and inflammation,” *Curr Pharm Des*, vol. 20, no. 22, pp. 3579–3594, Jun. 2014, doi: 10.2174/13816128113196660748.
- [112] S. Steven, T. Münzel, and A. Daiber, “Exploiting the Pleiotropic Antioxidant Effects of Established Drugs in Cardiovascular Disease,” *Int J Mol Sci*, vol. 16, no. 8, pp. 18185–18223, Aug. 2015, doi: 10.3390/IJMS160818185.
- [113] O. Andrukhova *et al.*, “Vitamin D is a regulator of endothelial nitric oxide synthase and arterial stiffness in mice,” *Mol Endocrinol*, vol. 28, no. 1, pp. 53–64, Jan. 2014, doi: 10.1210/ME.2013-1252.
- [114] G. Yan, B. You, S. P. Chen, J. K. Liao, and J. Sun, “Tumor necrosis factor-alpha downregulates endothelial nitric oxide synthase mRNA stability via translation elongation factor 1-alpha 1,” *Circ Res*, vol. 103, no. 6, pp. 591–597, Sep. 2008, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.173963.
- [115] M. Yanagisawa *et al.*, “A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells,” *Nature*, vol. 332, no. 6163, pp. 411–415, 1988, doi: 10.1038/332411A0.
- [116] A. Inoue *et al.*, “The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 86, no. 8, pp. 2863–2867, 1989, doi: 10.1073/PNAS.86.8.2863.
- [117] A. P. Davenport *et al.*, “Endothelin,” *Pharmacol Rev*, vol. 68, no. 2, pp. 357–418, Apr. 2016, doi: 10.1124/PR.115.011833.
- [118] K. Kostov, “The Causal Relationship between Endothelin-1 and Hypertension: Focusing on Endothelial Dysfunction, Arterial Stiffness, Vascular Remodeling, and Blood Pressure Regulation,” *Life*, vol. 11, no. 9, Sep. 2021, doi: 10.3390/LIFE11090986.

- [119] D. M. Pollock, T. L. Keith, and R. F. Highsmith, "Endothelin receptors and calcium signaling," *FASEB J*, vol. 9, no. 12, pp. 1196–1204, Sep. 1995, doi: 10.1096/FASEBJ.9.12.7672512.
- [120] K. Miyagawa and N. Emoto, "Current state of endothelin receptor antagonism in hypertension and pulmonary hypertension," *Ther Adv Cardiovasc Dis*, vol. 8, no. 5, pp. 202–216, 2014, doi: 10.1177/1753944714541511.
- [121] J. J. Maguire and A. P. Davenport, "Endothelin receptors and their antagonists," *Semin Nephrol*, vol. 35, no. 2, pp. 125–136, Mar. 2015, doi: 10.1016/J.SEMNEPHROL.2015.02.002.
- [122] J. A. M. Maier, C. Malpuech-Brugère, W. Zimowska, Y. Rayssiguier, and A. Mazur, "Low magnesium promotes endothelial cell dysfunction: implications for atherosclerosis, inflammation and thrombosis," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1689, no. 1, pp. 13–21, May 2004, doi: 10.1016/J.BBADIS.2004.01.002.
- [123] J. A. Maier, S. Castiglioni, L. Locatelli, M. Zocchi, and A. Mazur, "Magnesium and inflammation: Advances and perspectives," *Semin Cell Dev Biol*, vol. 115, pp. 37–44, Jul. 2021, doi: 10.1016/J.SEMCDB.2020.11.002.
- [124] J. A. M. Maier, "Endothelial cells and magnesium: implications in atherosclerosis," *Clin Sci (Lond)*, vol. 122, no. 9, pp. 397–407, May 2012, doi: 10.1042/CS20110506.
- [125] M. R. Rooney *et al.*, "Serum magnesium and the incidence of coronary artery disease over a median 27 years of follow-up in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study and a meta-analysis," *Am J Clin Nutr*, vol. 111, no. 1, pp. 52–60, Jan. 2020, doi: 10.1093/AJCN/NQZ256.
- [126] J. R. Sheu *et al.*, "Mechanisms involved in the antiplatelet activity of magnesium in human platelets," *Br J Haematol*, vol. 119, no. 4, pp. 1033–1041, 2002, doi: 10.1046/J.1365-2141.2002.03967.X.
- [127] M. C. Izquierdo *et al.*, "Klotho, phosphate and inflammation/ageing in chronic kidney disease," *Nephrol Dial Transplant*, vol. 27 Suppl 4, no. SUPPL.4, Dec. 2012, doi: 10.1093/NDT/GFS426.
- [128] T. M. Doherty *et al.*, "Calcification in atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, no. 20, pp. 11201–11206, Sep. 2003, doi: 10.1073/PNAS.1932554100.
- [129] R. Vattikuti and D. A. Towler, "Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective," *Am J Physiol Endocrinol Metab*, vol. 286, no. 5, May 2004, doi: 10.1152/AJPENDO.00552.2003.
- [130] P. Stenvinkel *et al.*, "IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly," *Kidney Int*, vol. 67, no. 4, pp. 1216–1233, 2005, doi: 10.1111/J.1523-1755.2005.00200.X.
- [131] R. Jofré, P. Rodríguez-Benitez, J. M. López-Gómez, and R. Pérez-García, "Inflammatory syndrome in patients on hemodialysis," *J Am Soc Nephrol*, vol. 17, no. 12 Suppl 3, Dec. 2006, doi: 10.1681/ASN.2006080926.

- [132] B. T. Lee *et al.*, “Association of C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6 with chronic kidney disease,” *BMC Nephrol*, vol. 16, no. 1, May 2015, doi: 10.1186/S12882-015-0068-7.
- [133] S. D. Cohen, T. M. Phillips, P. Khetpal, and P. L. Kimmel, “Cytokine patterns and survival in haemodialysis patients,” *Nephrol Dial Transplant*, vol. 25, no. 4, pp. 1239–1243, Apr. 2010, doi: 10.1093/NDT/GFP625.
- [134] T. V. M. Z. and E. M., “Dyslipidemia associated with chronic kidney disease,” *Open Cardiovasc Med J*, vol. 5, no. 1, pp. 41–48, Mar. 2011, doi: 10.2174/1874192401105010041.
- [135] E. L. Schiffrin, M. L. Lipman, and J. F. E. Mann, “Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system,” *Circulation*, vol. 116, no. 1, pp. 85–97, Jul. 2007, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.678342.
- [136] K. Benz *et al.*, “Vascular inflammation and media calcification are already present in early stages of chronic kidney disease,” *Cardiovasc Pathol*, vol. 27, pp. 57–67, Mar. 2017, doi: 10.1016/J.CARPATH.2017.01.004.
- [137] M. Masuda, S. Miyazaki-Anzai, M. Levi, T. C. Ting, and M. Miyazaki, “PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP signaling contributes to TNF α -induced vascular calcification,” *J Am Heart Assoc*, vol. 2, no. 5, 2013, doi: 10.1161/JAHA.113.000238.
- [138] C. Y. Lin, P. S. Tsai, Y. C. Hung, and C. J. Huang, “L-type calcium channels are involved in mediating the anti-inflammatory effects of magnesium sulphate,” *Br J Anaesth*, vol. 104, no. 1, pp. 44–51, 2010, doi: 10.1093/BJA/AEP336.
- [139] J. Sugimoto *et al.*, “Magnesium decreases inflammatory cytokine production: a novel innate immunomodulatory mechanism,” *J Immunol*, vol. 188, no. 12, pp. 6338–6346, Jun. 2012, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1101765.
- [140] C. A. Dinarello, “Biologic basis for interleukin-1 in disease - PubMed,” *Blood*, 1996. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8630372/> (accessed Apr. 03, 2022).
- [141] M. O. Huising, R. J. M. Stet, H. F. J. Savelkoul, and B. M. L. Verburg-Van Kemenade, “The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines; IL-18 in teleost fish,” *Dev Comp Immunol*, vol. 28, no. 5, pp. 395–413, May 2004, doi: 10.1016/J.DCI.2003.09.005.
- [142] T. Wæhre *et al.*, “Increased expression of interleukin-1 in coronary artery disease with downregulatory effects of HMG-CoA reductase inhibitors,” *Circulation*, vol. 109, no. 16, pp. 1966–1972, Apr. 2004, doi: 10.1161/01.CIR.0000125700.33637.B1.
- [143] K. Maedler *et al.*, “Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets,” *J Clin Invest*, vol. 110, no. 6, pp. 851–860, Sep. 2002, doi: 10.1172/JCI15318.
- [144] N. Roy and S. E. Rosas, “IL-6 Is Associated with Progression of Coronary Artery Calcification and Mortality in Incident Dialysis Patients,” *Am J Nephrol*, vol. 52, no. 9, pp. 745–752, Nov. 2021, doi: 10.1159/000518652.

- [145] M. E. Trujillo, S. Sullivan, I. Harten, S. H. Schneider, A. S. Greenberg, and S. K. Fried, "Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro," *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 89, no. 11, pp. 5577–5582, Nov. 2004, doi: 10.1210/JC.2004-0603.
- [146] P. Bao, G. Liu, and Y. Wei, "Association between IL-6 and related risk factors of metabolic syndrome and cardiovascular disease in young rats," *Int J Clin Exp Med*, 2015. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26550286/> (accessed Apr. 02, 2022).
- [147] E. Bernberg, M. A. Ulleryd, M. E. Johansson, and G. M. L. Bergström, "Social disruption stress increases IL-6 levels and accelerates atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice," *Atherosclerosis*, vol. 221, no. 2, pp. 359–365, Apr. 2012, doi: 10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2011.11.041.
- [148] T. Eleftheriadis, G. Antoniadis, V. Liakopoulos, C. Kartsios, I. Stefanidis, and G. Galaktidou, "Paricalcitol reduces basal and lipopolysaccharide-induced (LPS) TNF-alpha and IL-8 production by human peripheral blood mononuclear cells," *Int Urol Nephrol*, vol. 42, no. 1, pp. 181–185, Mar. 2010, doi: 10.1007/S11255-009-9541-1.
- [149] J. Bouabdallah *et al.*, "Endothelial cells exposed to phosphate and indoxyl sulphate promote vascular calcification through interleukin-8 secretion," *Nephrol Dial Transplant*, vol. 34, no. 7, pp. 1125–1134, Jul. 2019, doi: 10.1093/NDT/GFY325.
- [150] M. Rodriguez-Morán and F. Guerrero-Romero, "Elevated concentrations of TNF-alpha are related to low serum magnesium levels in obese subjects," *Magnes Res*, 2004. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15724867/> (accessed Apr. 02, 2022).
- [151] T. Horiuchi, H. Mitoma, S. I. Harashima, H. Tsukamoto, and T. Shimoda, "Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents," *Rheumatology (Oxford)*, vol. 49, no. 7, pp. 1215–1228, Mar. 2010, doi: 10.1093/RHEUMATOLOGY/KEQ031.
- [152] G. Sánchez-Duffhues *et al.*, "Inflammation induces endothelial-to-mesenchymal transition and promotes vascular calcification through downregulation of BMPR2," *J Pathol*, vol. 247, no. 3, pp. 333–346, Mar. 2019, doi: 10.1002/PATH.5193.
- [153] Y. Tintut, J. Patel, M. Territo, T. Saini, F. Parhami, and L. L. Demer, "Monocyte/macrophage regulation of vascular calcification in vitro," *Circulation*, vol. 105, no. 5, pp. 650–655, Feb. 2002, doi: 10.1161/HC0502.102969.
- [154] K. Ioannou *et al.*, "Inflammation, Endothelial Dysfunction and Increased Left Ventricular Mass in Chronic Kidney Disease (CKD) Patients: A Longitudinal Study," *PLoS One*, vol. 10, no. 9, Sep. 2015, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0138461.
- [155] T. Hashimoto, K. Shibata, K. Honda, and K. Nobe, "Acetic acid treatment causes renal inflammation and chronic kidney disease in mice," *J Pharmacol Sci*, vol. 146, no. 3, pp. 160–168, Jul. 2021, doi: 10.1016/J.JPHS.2021.04.002.
- [156] E. Birben, U. M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, and O. Kalayci, "Oxidative stress and antioxidant defense," *World Allergy Organ J*, vol. 5, no. 1, pp. 9–19, 2012, doi: 10.1097/WOX.0B013E3182439613.

- [157] J. Himmelfarb and R. M. Hakim, "Oxidative stress in uremia," *Curr Opin Nephrol Hypertens*, vol. 12, no. 6, pp. 593–598, Nov. 2003, doi: 10.1097/00041552-200311000-00004.
- [158] R. Che, Y. Yuan, S. Huang, and A. Zhang, "Mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of renal diseases," *Am J Physiol Renal Physiol*, vol. 306, no. 4, Feb. 2014, doi: 10.1152/AJPRENAL.00571.2013.
- [159] A. Sureshbabu, S. W. Ryter, and M. E. Choi, "Oxidative stress and autophagy: crucial modulators of kidney injury," *Redox Biol*, vol. 4, pp. 208–214, Apr. 2015, doi: 10.1016/J.REDOX.2015.01.001.
- [160] H. F. Tbahriti, A. Kaddous, M. Bouchenak, and K. Mekki, "Effect of different stages of chronic kidney disease and renal replacement therapies on oxidant-antioxidant balance in uremic patients," *Biochem Res Int*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/358985.
- [161] M. Jankowska, B. Rutkowski, and A. Dębska-Ślizień, "Vitamins and Microelement Bioavailability in Different Stages of Chronic Kidney Disease," *Nutrients*, vol. 9, no. 3, Mar. 2017, doi: 10.3390/NU9030282.
- [162] R. Vanholder *et al.*, "Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability," *Kidney Int*, vol. 63, no. 5, pp. 1934–1943, May 2003, doi: 10.1046/J.1523-1755.2003.00924.X.
- [163] G. A. Block, T. E. Hulbert-Shearon, N. W. Levin, and F. K. Port, "Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study," *Am J Kidney Dis*, vol. 31, no. 4, pp. 607–617, 1998, doi: 10.1053/AJKD.1998.V31.PM9531176.
- [164] I. R. Barrows, A. Ramezani, and D. S. Raj, "Inflammation, Immunity, and Oxidative Stress in Hypertension-Partners in Crime?," *Adv Chronic Kidney Dis*, vol. 26, no. 2, pp. 122–130, Mar. 2019, doi: 10.1053/J.ACKD.2019.03.001.
- [165] M. K. Sagoo and L. Gnudi, "Diabetic nephropathy: Is there a role for oxidative stress?," *Free Radic Biol Med*, vol. 116, pp. 50–63, Feb. 2018, doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2017.12.040.
- [166] A. Duni, V. Liakopoulos, K. P. Rapsomanikis, and E. Dounousi, "Chronic Kidney Disease and Disproportionally Increased Cardiovascular Damage: Does Oxidative Stress Explain the Burden?," *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2017, 2017, doi: 10.1155/2017/9036450.
- [167] M. Liu *et al.*, "Magnesium supplementation improves diabetic mitochondrial and cardiac diastolic function," *JCI Insight*, vol. 4, no. 1, Jan. 2019, doi: 10.1172/JCI.INSIGHT.123182.
- [168] P. J. Pearson, P. R. B. Evora, J. F. Secombe, and H. v. Schaff, "Hypomagnesemia inhibits nitric oxide release from coronary endothelium: protective role of magnesium infusion after cardiac operations," *Ann Thorac Surg*, vol. 65, no. 4, pp. 967–972, 1998, doi: 10.1016/S0003-4975(98)00020-4.
- [169] N. C. Shah *et al.*, "Mg deficiency results in modulation of serum lipids, glutathione, and NO synthase isozyme activation in cardiovascular tissues: relevance to de novo synthesis of

- ceramide, serum Mg and atherogenesis,” *Int J Clin Exp Med.*, 2011. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21686135/> (accessed Apr. 03, 2022).
- [170] M. Tamura, M. Kanno, and T. Kai, “Destabilization of neutrophil NADPH oxidase by ATP and other trinucleotides and its prevention by Mg(2+),” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1510, no. 1–2, pp. 270–277, Feb. 2001, doi: 10.1016/S0005-2736(00)00358-8.
- [171] P. Libako, W. Nowacki, E. Rock, Y. Rayssiguier, and A. Mazur, “Phagocyte priming by low magnesium status: input to the enhanced inflammatory and oxidative stress responses,” *Magnes Res*, vol. 23, no. 1, pp. 1–4, Mar. 2010, doi: 10.1684/MRH.2009.0201.
- [172] S. Ryu *et al.*, “Time-dependent association between metabolic syndrome and risk of CKD in Korean men without hypertension or diabetes,” *Am J Kidney Dis*, vol. 53, no. 1, pp. 59–69, 2009, doi: 10.1053/J.AJKD.2008.07.027.
- [173] J. Chen *et al.*, “The metabolic syndrome and chronic kidney disease in U.S. adults,” *Ann Intern Med*, vol. 140, no. 3, Feb. 2004, doi: 10.7326/0003-4819-140-3-200402030-00007.
- [174] K. R. Tuttle, “Renal manifestations of the metabolic syndrome,” *Nephrol Dial Transplant*, vol. 20, no. 5, pp. 861–864, May 2005, doi: 10.1093/NDT/GFH767.
- [175] S. M. Grundy *et al.*, “Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement,” *Circulation*, vol. 112, no. 17, pp. 2735–2752, Oct. 2005, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.169404.
- [176] N. Halberg, I. Wernstedt-Asterholm, and P. E. Scherer, “The adipocyte as an endocrine cell,” *Endocrinol Metab Clin North Am*, vol. 37, no. 3, pp. 753–768, Sep. 2008, doi: 10.1016/J.ECL.2008.07.002.
- [177] J. Kaur, “A comprehensive review on metabolic syndrome,” *Cardiol Res Pract*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/943162.
- [178] Y. Matsuzawa, T. Funahashi, S. Kihara, and I. Shimomura, “Adiponectin and metabolic syndrome,” *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 24, no. 1, pp. 29–33, Jan. 2004, doi: 10.1161/01.ATV.0000099786.99623.EF.
- [179] F. H. Nielsen, “Magnesium deficiency and increased inflammation: current perspectives,” *J Inflamm Res*, vol. 11, p. 25, Jan. 2018, doi: 10.2147/JIR.S136742.
- [180] S. Y. Ju, W. S. Choi, S. M. Ock, C. M. Kim, and D. H. Kim, “Dietary magnesium intake and metabolic syndrome in the adult population: dose-response meta-analysis and meta-regression,” *Nutrients*, vol. 6, no. 12, pp. 6005–6019, Dec. 2014, doi: 10.3390/NU6126005.
- [181] J. Bertinato, K. C. Wang, and S. Hayward, “Serum Magnesium Concentrations in the Canadian Population and Associations with Diabetes, Glycemic Regulation, and Insulin Resistance,” *Nutrients*, vol. 9, no. 3, Mar. 2017, doi: 10.3390/NU9030296.
- [182] R. D. Feldman and G. S. Bierbrier, “Insulin-mediated vasodilation: impairment with increased blood pressure and body mass,” *The Lancet*, vol. 342, no. 8873, pp. 707–709, Sep. 1993, doi: 10.1016/0140-6736(93)91708-T.

- [183] R. Sarzani, F. Salvi, P. Dessì-Fulgheri, and A. Rappelli, “Renin-angiotensin system, natriuretic peptides, obesity, metabolic syndrome, and hypertension: an integrated view in humans,” *J Hypertens*, vol. 26, no. 5, pp. 831–843, 2008, doi: 10.1097/HJH.0B013E3282F624A0.
- [184] M. Pevsner-Fischer, E. Blacher, E. Tatirovsky, I. Z. Ben-Dov, and E. Elinav, “The gut microbiome and hypertension,” *Curr Opin Nephrol Hypertens*, vol. 26, no. 1, pp. 1–8, 2017, doi: 10.1097/MNH.0000000000000293.
- [185] J. Ma and H. Li, “The role of gut microbiota in atherosclerosis and hypertension,” *Front Pharmacol*, vol. 9, no. SEP, Sep. 2018, doi: 10.3389/FPHAR.2018.01082.
- [186] J. Segura *et al.*, “Development of chronic kidney disease and cardiovascular prognosis in essential hypertensive patients,” *J Am Soc Nephrol*, vol. 15, no. 6, pp. 1616–1622, Jun. 2004, doi: 10.1097/01.asn.0000127045.14709.75.
- [187] L. E. Simental-Mendia, A. Sahebkar, M. Rodriguez-Moran, G. Zambrano-Galvan, and F. Guerrero-Romero, “Effect of Magnesium Supplementation on Plasma C-reactive Protein Concentrations: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials,” *Curr Pharm Des*, vol. 23, no. 31, May 2017, doi: 10.2174/1381612823666170525153605.
- [188] P. Chomczynski and N. Sacchi, “The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on,” *Nat Protoc*, vol. 1, no. 2, pp. 581–585, Jul. 2006, doi: 10.1038/NPROT.2006.83.
- [189] I. Lopez *et al.*, “Calcimimetic R-568 decreases extraosseous calcifications in uremic rats treated with calcitriol,” *J Am Soc Nephrol*, vol. 17, no. 3, pp. 795–804, Mar. 2006, doi: 10.1681/ASN.2005040342.
- [190] D. Tsikas, “Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research,” *Journal of Chromatography B*, vol. 851, no. 1–2, pp. 51–70, May 2007, doi: 10.1016/J.JCHROMB.2006.07.054.
- [191] L. Flohé and W. A. Günzler, “Assays of glutathione peroxidase,” *Methods Enzymol*, vol. 105, no. C, pp. 114–120, Jan. 1984, doi: 10.1016/S0076-6879(84)05015-1.
- [192] M. Ralser, J. Vowinckel, F. Capuano, K. Campbell, M. J. Deery, and K. S. Lilley, “The beauty of being (label)-free: Sample preparation methods for SWATH-MS and next-generation targeted proteomics,” *F1000Res*, vol. 2, Apr. 2014, doi: 10.12688/F1000RESEARCH.2-272.V2/DOI.
- [193] J. M. Martínez-Moreno *et al.*, “High phosphate induces a pro-inflammatory response by vascular smooth muscle cells and modulation by vitamin D derivatives,” *Clin Sci (Lond)*, vol. 131, no. 13, pp. 1449–1463, 2017, doi: 10.1042/CS20160807.
- [194] T. W. Kurtz, R. C. Morris, and H. A. Pershadsingh, “The Zucker fatty rat as a genetic model of obesity and hypertension,” *Hypertension*, vol. 13, no. 6 Pt 2, pp. 896–901, 1989, doi: 10.1161/01.HYP.13.6.896.
- [195] T. T. Nguyen *et al.*, “Intracellular alkalinization by phosphate uptake via type III sodium-phosphate cotransporter participates in high-phosphate-induced mitochondrial oxidative stress

- and defective insulin secretion,” *FASEB J*, vol. 30, no. 12, pp. 3979–3988, Dec. 2016, doi: 10.1096/FJ.201600455RR.
- [196] N. T. Nguyen *et al.*, “Oxidative stress by Ca²⁺ overload is critical for phosphate-induced vascular calcification,” *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 319, no. 6, pp. H1302–H1312, Nov. 2020, doi: 10.1152/AJPHEART.00305.2020.
- [197] T. Hagen, C. J. Lagace, J. S. Modica-Napolitano, and J. R. Aprille, “Permeability transition in rat liver mitochondria is modulated by the ATP-Mg/Pi carrier,” *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 285, no. 2, Aug. 2003, doi: 10.1152/AJPGI.00052.2003.
- [198] J. R. Aprille, “Mechanism and regulation of the mitochondrial ATP-Mg/P(i) carrier,” *J Bioenerg Biomembr*, vol. 25, no. 5, pp. 473–481, Oct. 1993, doi: 10.1007/BF01108404.
- [199] M. M. Zhao *et al.*, “Mitochondrial reactive oxygen species promote p65 nuclear translocation mediating high-phosphate-induced vascular calcification in vitro and in vivo,” *Kidney Int*, vol. 79, no. 10, pp. 1071–1079, 2011, doi: 10.1038/KI.2011.18.
- [200] D. Zhang *et al.*, “High Phosphate-Induced Calcification of Vascular Smooth Muscle Cells is Associated with the TLR4/NF- κ b Signaling Pathway,” *Kidney Blood Press Res*, vol. 42, no. 6, pp. 1205–1215, 2017, doi: 10.1159/000485874.
- [201] Y. Saito *et al.*, “Suppression of Wnt Signaling and Osteogenic Changes in Vascular Smooth Muscle Cells by Eicosapentaenoic Acid,” *Nutrients*, vol. 9, no. 8, Aug. 2017, doi: 10.3390/NU9080858.
- [202] H. Quiñones, T. Hamdi, K. Sakhaee, A. Pasch, O. W. Moe, and C. Y. C. Pak, “Control of metabolic predisposition to cardiovascular complications of chronic kidney disease by effervescent calcium magnesium citrate: a feasibility study,” *J Nephrol*, vol. 32, no. 1, pp. 93–100, Feb. 2019, doi: 10.1007/S40620-018-0559-2.
- [203] X. He, Q. Bai, X. Zhang, and L. Zhang, “MgCl₂ Attenuates ox-LDL-Induced Vascular Smooth Muscle-Derived Foam Cells Pyroptosis by Downregulating the TLR4/NF- κ B Signaling Pathway,” *Biol Trace Elem Res*, 2023, doi: 10.1007/S12011-023-03585-4.
- [204] C. Vida *et al.*, “A high magnesium concentration in citrate dialysate prevents oxidative stress and damage in human monocytes in vitro,” *Clin Kidney J*, vol. 14, no. 5, pp. 1403–1411, May 2020, doi: 10.1093/CKJ/SFAA131.
- [205] J. A. M. Maier, D. Bernardini, Y. Rayssiguier, and A. Mazur, “High concentrations of magnesium modulate vascular endothelial cell behaviour in vitro,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1689, no. 1, pp. 6–12, May 2004, doi: 10.1016/J.BBADIS.2004.02.004.
- [206] M. Kharitonova, I. Iezhitsa, A. Zheltova, A. Ozerov, A. Spasov, and A. Skalny, “Comparative angioprotective effects of magnesium compounds,” *J Trace Elem Med Biol*, vol. 29, pp. 227–234, Jan. 2015, doi: 10.1016/J.JTEMB.2014.06.026.
- [207] J. A. M. Maier, “Low magnesium and atherosclerosis: An evidence-based link,” *Mol Aspects Med*, vol. 24, no. 1–3, pp. 137–146, Feb. 2003, doi: 10.1016/S0098-2997(02)00095-X.

- [208] L. C. Del Gobbo, F. Imamura, J. H. Y. Wu, M. C. De Oliveira Otto, S. E. Chiuve, and D. Mozaffarian, “Circulating and dietary magnesium and risk of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis of prospective studies,” *Am J Clin Nutr*, vol. 98, no. 1, pp. 160–173, Jul. 2013, doi: 10.3945/AJCN.112.053132.
- [209] H. Kawano, S. Yokoyama, T. L. Smith, Nishida H I, T. Taguchi, and F. A. Kummerow, “Effect of magnesium on secretion of platelet-derived growth factor by cultured human umbilical arterial endothelial cells - PubMed,” *Magnesium research*, 1995. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7547174/> (accessed Apr. 02, 2023).
- [210] G. Gloire and J. Piette, “Redox regulation of nuclear post-translational modifications during NF-kappaB activation,” *Antioxid Redox Signal*, vol. 11, no. 9, pp. 2209–2222, Sep. 2009, doi: 10.1089/ARS.2009.2463.
- [211] F. Gao, B. Ding, L. Zhou, X. Gao, H. Guo, and H. Xu, “Magnesium sulfate provides neuroprotection in lipopolysaccharide-activated primary microglia by inhibiting NF-κB pathway,” *J Surg Res*, vol. 184, no. 2, pp. 944–950, Oct. 2013, doi: 10.1016/J.JSS.2013.03.034.
- [212] J. Hao, J. Tang, L. Zhang, X. Li, and L. Hao, “The Crosstalk between Calcium Ions and Aldosterone Contributes to Inflammation, Apoptosis, and Calcification of VSMC via the AIF-1/NF- κ B Pathway in Uremia,” *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2020, 2020, doi: 10.1155/2020/3431597.
- [213] G. Kumar, P. K. Chatterjee, S. Madankumar, S. F. Mehdi, X. Xue, and C. N. Metz, “Magnesium deficiency with high calcium-to-magnesium ratio promotes a metastatic phenotype in the CT26 colon cancer cell line,” *Magnes Res*, vol. 33, no. 3, pp. 68–85, 2020, doi: 10.1684/MRH.2020.0470.
- [214] A. L. Durham, M. Y. Speer, M. Scatena, C. M. Giachelli, and C. M. Shanahan, “Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness,” *Cardiovasc Res*, vol. 114, no. 4, pp. 590–600, Mar. 2018, doi: 10.1093/CVR/CVY010.
- [215] Y. Taniyama and K. K. Griendling, “Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms,” *Hypertension*, vol. 42, no. 6, pp. 1075–1081, Dec. 2003, doi: 10.1161/01.HYP.0000100443.09293.4F.
- [216] M. Liu and S. C. Dudley, “Magnesium, Oxidative Stress, Inflammation, and Cardiovascular Disease,” *Antioxidants (Basel)*, vol. 9, no. 10, pp. 1–31, Oct. 2020, doi: 10.3390/ANTIOX9100907.
- [217] N. C. Shah *et al.*, “Mg deficiency results in modulation of serum lipids, glutathione, and NO synthase isozyme activation in cardiovascular tissues: relevance to de novo synthesis of ceramide, serum Mg and atherogenesis,” *Int J Clin Exp Med*, vol. 4, no. 2, pp. 103–118, 2011, Accessed: Apr. 02, 2023. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21686135/>
- [218] C. A. Blomeyer, J. N. Bazil, D. F. Stowe, R. K. Dash, and A. K. S. Camara, “Mg(2+) differentially regulates two modes of mitochondrial Ca(2+) uptake in isolated cardiac mitochondria: implications for mitochondrial Ca(2+) sequestration,” *J Bioenerg Biomembr*, vol. 48, no. 3, pp. 175–188, Jun. 2016, doi: 10.1007/S10863-016-9644-1.

- [219] A. Mazur, J. A. M. Maier, E. Rock, E. Gueux, W. Nowacki, and Y. Rayssiguier, "Magnesium and the inflammatory response: potential physiopathological implications," *Arch Biochem Biophys*, vol. 458, no. 1, pp. 48–56, Feb. 2007, doi: 10.1016/J.ABB.2006.03.031.
- [220] S. Brunet, T. Scheuer, and W. A. Catterall, "Cooperative regulation of Ca(v)1.2 channels by intracellular Mg(2+), the proximal C-terminal EF-hand, and the distal C-terminal domain," *J Gen Physiol*, vol. 134, no. 2, pp. 81–94, Aug. 2009, doi: 10.1085/JGP.200910209.
- [221] M. O. J. Grootaert *et al.*, "Vascular smooth muscle cell death, autophagy and senescence in atherosclerosis," *Cardiovasc Res*, vol. 114, no. 4, pp. 622–634, Mar. 2018, doi: 10.1093/CVR/CSVY007.
- [222] F. F. Liu *et al.*, "Stanniocalcin 2 Is Upregulated by Calcium-Sensing Receptor and Protects Human Vascular Smooth Muscle Cells from High-Phosphate-Induced Apoptosis," *Cardiorenal Med*, vol. 12, no. 5–6, pp. 214–228, Oct. 2022, doi: 10.1159/000527441.
- [223] Y. Xiao, Y. Y. Du, C. Gao, and W. Kong, "[Dynamic alteration of microRNA in high phosphorus induced calcification of vascular smooth muscle cell]," *Beijing da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Peking University. Health sciences*, vol. 48, no. 5, pp. 756–765, Oct. 2016, Accessed: Apr. 02, 2023. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27752152/>
- [224] J. Kalra, S. Mangali, A. Bhat, K. Jadhav, and A. Dhar, "Selective inhibition of PKR improves vascular inflammation and remodelling in high fructose treated primary vascular smooth muscle cells," *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, vol. 1866, no. 3, Mar. 2020, doi: 10.1016/J.BBADIS.2019.165606.
- [225] Y. Toba, Y. Kajita, R. Masuyama, Y. Takada, K. Suzuki, and S. Aoe, "Dietary magnesium supplementation affects bone metabolism and dynamic strength of bone in ovariectomized rats," *J Nutr*, vol. 130, no. 2, pp. 216–220, 2000, doi: 10.1093/JN/130.2.216.
- [226] D. Bayle *et al.*, "Magnesium Deficiency Alters Expression of Genes Critical for Muscle Magnesium Homeostasis and Physiology in Mice," *Nutrients*, vol. 13, no. 7, Jul. 2021, doi: 10.3390/NU13072169.
- [227] P. G. Brannan, P. Vergne Marini, C. Y. C. Pak, A. R. Hull, and J. S. Fordtran, "Magnesium absorption in the human small intestine. Results in normal subjects, patients with chronic renal disease, and patients with absorptive hypercalciuria," *J Clin Invest*, vol. 57, no. 6, pp. 1412–1418, 1976, doi: 10.1172/JCI108410.
- [228] P. Laurant, D. Hayoz, H. Brunner, and A. Berthelot, "Dietary magnesium intake can affect mechanical properties of rat carotid artery," *Br J Nutr*, vol. 84, no. 5, pp. 757–764, 2000, doi: 10.1017/s0007114500002129.
- [229] P. Finckenberg *et al.*, "Magnesium supplementation prevents angiotensin II-induced myocardial damage and CTGF overexpression," *J Hypertens*, vol. 23, no. 2, pp. 375–380, 2005, doi: 10.1097/00004872-200502000-00020.
- [230] L. ElZohary, W. B. Weglicki, J. J. Chmielinska, J. H. Kramer, and I. Tong Mak, "Mg-supplementation attenuated lipogenic and oxidative/nitrosative gene expression caused by

- Combination Antiretroviral Therapy (cART) in HIV-1-transgenic rats,” *PLoS One*, vol. 14, no. 1, Jan. 2019, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0210107.
- [231] A. García-Legorreta *et al.*, “Effect of Dietary Magnesium Content on Intestinal Microbiota of Rats,” *Nutrients*, vol. 12, no. 9, pp. 1–11, Sep. 2020, doi: 10.3390/NU12092889.
- [232] S. F. Rapa, B. R. Di Iorio, P. Campiglia, A. Heidland, and S. Marzocco, “Inflammation and Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease-Potential Therapeutic Role of Minerals, Vitamins and Plant-Derived Metabolites,” *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 1, Jan. 2019, doi: 10.3390/IJMS21010263.
- [233] O. M. Akchurin and F. Kaskel, “Update on inflammation in chronic kidney disease,” *Blood Purif*, vol. 39, no. 1–3, pp. 84–92, Jun. 2015, doi: 10.1159/000368940.
- [234] B. M. Altura and B. T. Altura, “Magnesium and cardiovascular biology: an important link between cardiovascular risk factors and atherogenesis - PubMed,” *Cell Mol Biol Res.*, 1995. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8867781/> (accessed Apr. 02, 2023).
- [235] J. Ma *et al.*, “Associations of serum and dietary magnesium with cardiovascular disease, hypertension, diabetes, insulin, and carotid arterial wall thickness: The aric study,” *J Clin Epidemiol*, vol. 48, no. 7, pp. 927–940, 1995, doi: 10.1016/0895-4356(94)00200-A.
- [236] R. Dey, M. Rajappa, S. Parameswaran, and G. Revathy, “Hypomagnesemia and atherogenic dyslipidemia in chronic kidney disease: surrogate markers for increased cardiovascular risk,” *Clin Exp Nephrol*, vol. 19, no. 6, pp. 1054–1061, Dec. 2015, doi: 10.1007/S10157-015-1097-Z.
- [237] M. Helfand *et al.*, “Emerging risk factors for coronary heart disease: a summary of systematic reviews conducted for the U.S. Preventive Services Task Force,” *Ann Intern Med*, vol. 151, no. 7, pp. 496–507, Oct. 2009, doi: 10.7326/0003-4819-151-7-200910060-00010.
- [238] J. J. Dinicolantonio, J. Liu, and J. H. O’Keefe, “Magnesium for the prevention and treatment of cardiovascular disease,” *Open Heart*, vol. 5, no. 2, Jul. 2018, doi: 10.1136/OPENHRT-2018-000775.
- [239] M. Mortazavi, F. Moeinzadeh, M. Saadatian, S. Shahidi, J. C. McGee, and A. Minagar, “Effect of magnesium supplementation on carotid intima-media thickness and flow-mediated dilatation among hemodialysis patients: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial,” *Eur Neurol*, vol. 69, no. 5, pp. 309–316, May 2013, doi: 10.1159/000346427.
- [240] J. Cunningham, M. Rodríguez, and P. Messa, “Magnesium in chronic kidney disease Stages 3 and 4 and in dialysis patients,” *Clin Kidney J*, vol. 5, no. Suppl 1, Feb. 2012, doi: 10.1093/NDTPLUS/SFR166.
- [241] J. F. Navarro-González, C. Mora-Fernández, and J. García-Pérez, “Clinical implications of disordered magnesium homeostasis in chronic renal failure and dialysis,” *Semin Dial*, vol. 22, no. 1, pp. 37–44, Jan. 2009, doi: 10.1111/J.1525-139X.2008.00530.X.
- [242] F. H. Nielsen, “Dietary fatty acid composition alters magnesium metabolism, distribution, and marginal deficiency response in rats,” *Magnes Res*, vol. 22, no. 4, pp. 280–288, Dec. 2009, doi: 10.1684/MRH.2009.0188.

- [243] C. Malpuech-Brugère *et al.*, “Inflammatory response following acute magnesium deficiency in the rat,” *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, vol. 1501, no. 2–3, pp. 91–98, Jun. 2000, doi: 10.1016/S0925-4439(00)00018-1.
- [244] E. Lacson, W. Wang, L. Ma, and J. Passlick-Deetjen, “Serum Magnesium and Mortality in Hemodialysis Patients in the United States: A Cohort Study,” *Am J Kidney Dis*, vol. 66, no. 6, pp. 1056–1066, Dec. 2015, doi: 10.1053/J.AJKD.2015.06.014.
- [245] Y. Sakaguchi *et al.*, “Magnesium modifies the association between serum phosphate and the risk of progression to end-stage kidney disease in patients with non-diabetic chronic kidney disease,” *Kidney Int*, vol. 88, no. 4, pp. 833–842, Oct. 2015, doi: 10.1038/KI.2015.165.
- [246] S. Ferrè *et al.*, “Low serum magnesium is associated with faster decline in kidney function: the Dallas Heart Study experience,” *J Investig Med*, vol. 67, no. 6, pp. 987–994, Aug. 2019, doi: 10.1136/JIM-2018-000966.
- [247] B. Sontia, A. C. I. Montezano, T. Paravicini, F. Tabet, and R. M. Touyz, “Downregulation of renal TRPM7 and increased inflammation and fibrosis in aldosterone-infused mice: effects of magnesium,” *Hypertension*, vol. 51, no. 4, pp. 915–921, Apr. 2008, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.100339.
- [248] A. L. M. De Francisco *et al.*, “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*, vol. 25, no. 11, pp. 3707–3717, Nov. 2010, doi: 10.1093/NDT/GFQ292.
- [249] D. Laurencin *et al.*, “Magnesium incorporation into hydroxyapatite,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 7, pp. 1826–1837, 2011, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2010.11.017.
- [250] P. Aghagolzadeh *et al.*, “Calcification of vascular smooth muscle cells is induced by secondary calciprotein particles and enhanced by tumor necrosis factor- α ,” *Atherosclerosis*, vol. 251, pp. 404–414, Aug. 2016, doi: 10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2016.05.044.
- [251] E. R. Smith, E. Hanssen, L. P. McMahon, and S. G. Holt, “Fetuin-A-containing calciprotein particles reduce mineral stress in the macrophage,” *PLoS One*, vol. 8, no. 4, Apr. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0060904.
- [252] Y. Sakaguchi, “The emerging role of magnesium in CKD,” *Clin Exp Nephrol*, vol. 26, no. 5, pp. 379–384, May 2022, doi: 10.1007/S10157-022-02182-4.
- [253] W. C. O’Neill, “Vascular calcification: not so crystal clear,” *Kidney Int*, vol. 71, no. 4, pp. 282–283, 2007, doi: 10.1038/SJ.KI.5002119.
- [254] M. Rodriguez, A. Martin-Malo, M. E. Martinez, A. Torres, A. J. Felsenfeld, and F. Llach, “Calcemic response to parathyroid hormone in renal failure: role of phosphorus and its effect on calcitriol,” *Kidney Int*, vol. 40, no. 6, pp. 1055–1062, 1991, doi: 10.1038/KI.1991.314.
- [255] L. Bussière, A. Mazur, E. Gueux, W. Nowacki, and Y. Rayssiguier, “Triglyceride-rich lipoproteins from magnesium-deficient rats are more susceptible to oxidation by cells and promote proliferation of cultured vascular smooth muscle cells,” *Magnes Res*, vol. 8, no. 2, pp.

- 151–157, 1995, Accessed: Apr. 02, 2023. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7547176/>
- [256] L. Lin, W. Tan, X. Pan, E. Tian, Z. Wu, and J. Yang, “Metabolic Syndrome-Related Kidney Injury: A Review and Update,” *Front Endocrinol (Lausanne)*, vol. 13, Jun. 2022, doi: 10.3389/FENDO.2022.904001.
- [257] A. Syauby, C. Y. Hsu, H. A. Lee, H. H. Rau, and J. C. J. Chao, “Association between Dietary Patterns and Kidney Function Parameters in Adults with Metabolic Syndrome: A Cross-Sectional Study,” *Nutrients*, vol. 13, no. 1, pp. 1–14, Jan. 2020, doi: 10.3390/NU13010040.
- [258] H. Y. Ding and H. X. Ma, “Significant roles of anti-aging protein klotho and fibroblast growth factor23 in cardiovascular disease,” *J Geriatr Cardiol*, vol. 12, no. 4, pp. 439–447, 2015, doi: 10.11909/J.ISSN.1671-5411.2015.04.017.
- [259] N. Keles *et al.*, “Is serum Klotho protective against atherosclerosis in patients with type 1 diabetes mellitus?,” *J Diabetes Complications*, vol. 30, no. 1, pp. 126–132, Jan. 2016, doi: 10.1016/J.JDIACOMP.2015.09.013.
- [260] M. Kanbay *et al.*, “Role of Klotho in the Development of Essential Hypertension,” *Hypertension*, vol. 77, no. 3, pp. 740–750, Mar. 2021, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.16635.
- [261] A. D. ter Braake *et al.*, “Magnesium prevents vascular calcification in Klotho deficiency,” *Kidney Int*, vol. 97, no. 3, pp. 487–501, Mar. 2020, doi: 10.1016/J.KINT.2019.09.034.
- [262] X. Zhou, K. Chen, Y. Wang, M. Schuman, H. Lei, and Z. Sun, “Antiaging Gene Klotho Regulates Adrenal CYP11B2 Expression and Aldosterone Synthesis,” *J Am Soc Nephrol*, vol. 27, no. 6, pp. 1765–1776, Jun. 2016, doi: 10.1681/ASN.2015010093.
- [263] K. Chen and Z. Sun, “Activation of DNA demethylases attenuates aging-associated arterial stiffening and hypertension,” *Aging Cell*, vol. 17, no. 4, Aug. 2018, doi: 10.1111/ACEL.12762.
- [264] Y. Wang, M. Kuro-O, and Z. Sun, “Klotho gene delivery suppresses Nox2 expression and attenuates oxidative stress in rat aortic smooth muscle cells via the cAMP-PKA pathway,” *Aging Cell*, vol. 11, no. 3, pp. 410–417, Jun. 2012, doi: 10.1111/J.1474-9726.2012.00796.X.
- [265] T. Vaskonen, E. Mervaala, T. Seppänen-Laakso, and H. Karppanen, “Diet enrichment with calcium and magnesium enhances the cholesterol-lowering effect of plant sterols in obese Zucker rats,” *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, vol. 11, no. 3, pp. 158–167, Jun. 2001, Accessed: Dec. 12, 2022. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11590991/>
- [266] H. Han *et al.*, “Dose-response relationship between dietary magnesium intake, serum magnesium concentration and risk of hypertension: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies,” *Nutr J*, vol. 16, no. 1, May 2017, doi: 10.1186/S12937-017-0247-4.
- [267] D. T. Dibaba, P. Xun, Y. Song, A. Rosanoff, M. Shechter, and K. He, “The effect of magnesium supplementation on blood pressure in individuals with insulin resistance, prediabetes, or noncommunicable chronic diseases: a meta-analysis of randomized controlled trials,” *Am J Clin Nutr*, vol. 106, no. 3, pp. 921–929, Sep. 2017, doi: 10.3945/AJCN.117.155291.

- [268] Y. P. Mu *et al.*, “Magnesium attenuates endothelin-1-induced vasoreactivity and enhances vasodilatation in mouse pulmonary arteries: Modulation by chronic hypoxic pulmonary hypertension,” *Exp Physiol*, vol. 103, no. 4, pp. 604–616, Apr. 2018, doi: 10.1113/EP086655.
- [269] N. Berthon, P. Laurant, D. Fellmann, and A. Berthelot, “Effect of magnesium on mRNA expression and production of endothelin-1 in DOCA-salt hypertensive rats,” *J Cardiovasc Pharmacol*, vol. 42, no. 1, pp. 24–31, Jul. 2003, doi: 10.1097/00005344-200307000-00004.
- [270] I. M. Wahba and R. H. Mak, “Obesity and obesity-initiated metabolic syndrome: mechanistic links to chronic kidney disease,” *Clin J Am Soc Nephrol*, vol. 2, no. 3, pp. 550–562, May 2007, doi: 10.2215/CJN.04071206.
- [271] F. Gobal, A. Deshmukh, S. Shah, and J. L. Mehta, “Triad of metabolic syndrome, chronic kidney disease, and coronary heart disease with a focus on microalbuminuria death by overeating,” *J Am Coll Cardiol*, vol. 57, no. 23, pp. 2303–2308, Jun. 2011, doi: 10.1016/J.JACC.2011.02.027.
- [272] L. N. Maslov, N. V. Naryzhnaya, A. A. Boshchenko, S. V. Popov, V. V. Ivanov, and P. R. Oeltgen, “Is oxidative stress of adipocytes a cause or a consequence of the metabolic syndrome?,” *J Clin Transl Endocrinol*, vol. 15, pp. 1–5, Mar. 2018, doi: 10.1016/J.JCTE.2018.11.001.
- [273] A. Podkowińska and D. Formanowicz, “Chronic Kidney Disease as Oxidative Stress- and Inflammatory-Mediated Cardiovascular Disease,” *Antioxidants (Basel)*, vol. 9, no. 8, pp. 1–54, Aug. 2020, doi: 10.3390/ANTIOX9080752.
- [274] J. C. Whitin, S. Bhamre, D. M. Tham, and H. J. Cohen, “Extracellular glutathione peroxidase is secreted basolaterally by human renal proximal tubule cells,” *Am J Physiol Renal Physiol*, vol. 283, no. 1, 2002, doi: 10.1152/AJPRENAL.00014.2001.
- [275] C. Chang, B. L. Worley, R. Phaëton, and N. Hempel, “Extracellular Glutathione Peroxidase GPx3 and Its Role in Cancer,” *Cancers (Basel)*, vol. 12, no. 8, pp. 1–20, Aug. 2020, doi: 10.3390/CANCERS12082197.
- [276] T. Miyazaki *et al.*, “Circulating malondialdehyde-modified LDL and atherogenic lipoprotein profiles measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy in patients with coronary artery disease,” *Atherosclerosis*, vol. 179, no. 1, pp. 139–145, 2005, doi: 10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2004.09.013.
- [277] C. Sastre *et al.*, “Hyperlipidemia-associated renal damage decreases Klotho expression in kidneys from ApoE knockout mice,” *PLoS One*, vol. 8, no. 12, Dec. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0083713.
- [278] M. Kuro-o, “Klotho as a regulator of oxidative stress and senescence,” *Biol Chem*, vol. 389, no. 3, pp. 233–241, Mar. 2008, doi: 10.1515/BC.2008.028.
- [279] S. Yu, H. Yang, X. Guo, and Y. Sun, “Klotho attenuates angiotensin II-induced cardiotoxicity through suppression of necroptosis and oxidative stress,” *Mol Med Rep*, vol. 23, no. 1, pp. 1–9, Jan. 2021, doi: 10.3892/MMR.2020.11705.

- [280] M. C. Schneider, O. Lapaire, and I. Hösli, “[Pre-eclampsia and eclampsia],” *Anaesthetist*, vol. 57, no. 6, p. 619, Jun. 2008, doi: 10.1007/S00101-008-1367-1.
- [281] P. Laurant, M. Dalle, A. Berthelot, and Y. Rayssiguier, “Time-course of the change in blood pressure level in magnesium-deficient Wistar rats,” *Br J Nutr.*, 1999. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10655971/> (accessed Apr. 02, 2023).
- [282] S. Chakraborti and J. R. Michael, “Involvement of a serine esterase in oxidant-mediated activation of phospholipase A2 in pulmonary endothelium,” *FEBS Lett*, vol. 281, no. 1–2, pp. 185–187, Apr. 1991, doi: 10.1016/0014-5793(91)80389-K.
- [283] L. A. Olatunji and A. O. Soladoye, “Increased magnesium intake prevents hyperlipidemia and insulin resistance and reduces lipid peroxidation in fructose-fed rats,” *Pathophysiology*, vol. 14, no. 1, pp. 11–15, May 2007, doi: 10.1016/J.PATHOPHYS.2006.09.004.
- [284] S. M. Black and J. R. Fineman, “Oxidative and nitrosative stress in pediatric pulmonary hypertension: roles of endothelin-1 and nitric oxide,” *Vascul Pharmacol*, vol. 45, no. 5, pp. 308–316, Nov. 2006, doi: 10.1016/J.VPH.2006.08.005.
- [285] D. Chen *et al.*, “A multi-omics investigation of the molecular characteristics and classification of six metabolic syndrome relevant diseases,” *Theranostics*, vol. 10, no. 5, pp. 2029–2046, 2020, doi: 10.7150/THNO.41106.
- [286] S. A. Chacko *et al.*, “Magnesium supplementation, metabolic and inflammatory markers, and global genomic and proteomic profiling: a randomized, double-blind, controlled, crossover trial in overweight individuals,” *Am J Clin Nutr*, vol. 93, no. 2, pp. 463–473, Feb. 2011, doi: 10.3945/AJCN.110.002949.
- [287] H. Wu, Q. Du, Q. Dai, J. Ge, and X. Cheng, “Cysteine Protease Cathepsins in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases,” *J Atheroscler Thromb*, vol. 25, no. 2, pp. 111–123, 2018, doi: 10.5551/JAT.RV17016.
- [288] V. Lygirou *et al.*, “Plasma proteomic analysis reveals altered protein abundances in cardiovascular disease,” *J Transl Med*, vol. 16, no. 1, Apr. 2018, doi: 10.1186/S12967-018-1476-9.
- [289] R. K. Upadhyay, “Emerging risk biomarkers in cardiovascular diseases and disorders,” *J Lipids*, vol. 2015, pp. 1–50, 2015, doi: 10.1155/2015/971453.
- [290] A. Bălănescu, I. F. Codreanu, V. D. Comanici, I. V. Stan, E. Bălănescu, and P. Bălănescu, “Endocan and Lumican in Relation to Cardiometabolic Risk in a Pediatric Overweight and Obese Cohort: A Cross-Sectional Study,” *Biomed Res Int*, vol. 2020, 2020, doi: 10.1155/2020/2102401.
- [291] G. Wolff *et al.*, “Diet-dependent function of the extracellular matrix proteoglycan Lumican in obesity and glucose homeostasis,” *Mol Metab*, vol. 19, pp. 97–106, Jan. 2019, doi: 10.1016/J.MOLMET.2018.10.007.
- [292] J. Singh, A. Jain, R. Bhamra, V. Rathi, and A. K. Dhingra, “The Mechanistic Role of Different Mediators in the Pathophysiology of Nephropathy: A Review,” *Curr Drug Targets*, vol. 24, Oct. 2022, doi: 10.2174/1389450124666221026152647.

- [293] A. A. Crawford *et al.*, “Variation in the SERPINA6/SERPINA1 locus alters morning plasma cortisol, hepatic corticosteroid binding globulin expression, gene expression in peripheral tissues, and risk of cardiovascular disease,” *J Hum Genet*, vol. 66, no. 6, pp. 625–636, Jun. 2021, doi: 10.1038/S10038-020-00895-6.
- [294] T. C. K. I, C. GP, and P. DA, “Prolonged suppression of corticosteroid-binding globulin by recombinant human interleukin-6 in man,” *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 83, no. 9, p. 3379, 1998, doi: 10.1210/JCEM.83.9.5100-5.
- [295] O. A. Hakami, S. Ahmed, and N. Karavitaki, “Epidemiology and mortality of Cushing’s syndrome,” *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, vol. 35, no. 1, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.BEEM.2021.101521.
- [296] J. Behbodikhah *et al.*, “Apolipoprotein B and Cardiovascular Disease: Biomarker and Potential Therapeutic Target,” *Metabolites*, vol. 11, no. 10, Oct. 2021, doi: 10.3390/METABO11100690.
- [297] M. Paz Ocaranza *et al.*, “Counter-regulatory renin-angiotensin system in cardiovascular disease,” *Nat Rev Cardiol*, vol. 17, no. 2, pp. 116–129, Feb. 2020, doi: 10.1038/S41569-019-0244-8.
- [298] H. Lu, L. A. Cassis, C. W. V. Kooi, and A. Daugherty, “Structure and functions of angiotensinogen,” *Hypertens Res*, vol. 39, no. 7, pp. 492–500, Jul. 2016, doi: 10.1038/HR.2016.17.
- [299] H. E. Roxborough, C. Mercer, D. McMaster, A. P. Maxwell, and I. S. Young, “Plasma glutathione peroxidase activity is reduced in haemodialysis patients,” *Nephron*, vol. 81, no. 3, pp. 278–283, 1999, doi: 10.1159/000045293.
- [300] P. Pang *et al.*, “Pre-clinical model of severe glutathione peroxidase-3 deficiency and chronic kidney disease results in coronary artery thrombosis and depressed left ventricular function,” *Nephrol Dial Transplant*, vol. 33, no. 6, pp. 923–934, Jun. 2018, doi: 10.1093/NDT/GFX304.
- [301] N. E. Rhaleb, X. P. Yang, and O. A. Carretero, “The kallikrein-kinin system as a regulator of cardiovascular and renal function,” *Compr Physiol*, vol. 1, no. 2, pp. 971–993, Apr. 2011, doi: 10.1002/CPHY.C100053.
- [302] X. Cheng, D. Liu, H. Song, X. Tian, C. Yan, and Y. Han, “Overexpression of Kininogen-1 aggravates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in DOX-induced cardiotoxicity,” *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 550, pp. 142–150, Apr. 2021, doi: 10.1016/J.BBRC.2021.02.104.
- [303] N. Taglieri, W. Koenig, and J. C. Kaski, “Cystatin C and cardiovascular risk,” *Clin Chem*, vol. 55, no. 11, pp. 1932–1943, Nov. 2009, doi: 10.1373/CLINCHEM.2009.128397.
- [304] S. Balta, S. Demirkol, S. A. Ay, M. Cakar, H. Sarlak, and T. Celik, “Serum cystatin-C levels correlate with endothelial dysfunction in patients with the metabolic syndrome,” *J Intern Med*, vol. 274, no. 2, pp. 200–201, Aug. 2013, doi: 10.1111/JOIM.12078.

- [305] K. Mikrut, J. Paluszak, J. Koźlik, P. Sosnowski, H. Krauss, and E. Grześkowiak, “The effect of bradykinin on the oxidative state of rats with acute hyperglycaemia,” *Diabetes Res Clin Pract*, vol. 51, no. 2, pp. 79–85, 2001, doi: 10.1016/S0168-8227(00)00222-9.
- [306] M. Kakoki, R. W. McGarrah, H. S. Kim, and O. Smithies, “Bradykinin B1 and B2 receptors both have protective roles in renal ischemia/reperfusion injury,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no. 18, pp. 7576–7581, May 2007, doi: 10.1073/PNAS.0701617104.
- [307] U. Chalise *et al.*, “Macrophages secrete murinoglobulin-1 and galectin-3 to regulate neutrophil degranulation after myocardial infarction,” *Mol Omics*, vol. 18, no. 3, pp. 186–195, Mar. 2022, doi: 10.1039/D1MO00519G.
- [308] R. Abe, K. Yamamoto, and H. Sinohara, “Proteinase inhibitory spectrum of mouse murinoglobulin and alpha-macroglobulin,” *J Biochem*, vol. 106, no. 4, pp. 564–568, 1989, doi: 10.1093/OXFORDJOURNALS.JBCHEM.A122896.
- [309] K. Krause, F. Azouz, E. Nakano, V. R. Nerurkar, and M. Kumar, “Deletion of Pregnancy Zone Protein and Murinoglobulin-1 Restricts the Pathogenesis of West Nile Virus Infection in Mice,” *Front Microbiol*, vol. 10, no. FEB, 2019, doi: 10.3389/FMICB.2019.00259.
- [310] M. Barbagallo and L. J. Dominguez, “Magnesium metabolism in type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome and insulin resistance,” *Arch Biochem Biophys*, vol. 458, no. 1, pp. 40–47, Feb. 2007, doi: 10.1016/J.ABB.2006.05.007.
- [311] R. Soares and C. Costa, “Oxidative stress, inflammation and angiogenesis in the metabolic syndrome,” *Oxidative Stress, Inflammation and Angiogenesis in the Metabolic Syndrome*, pp. 1–209, 2009, doi: 10.1007/978-1-4020-9701-0/COVER.
- [312] H. Geiger and C. Wanner, “Magnesium in disease,” *Clin Kidney J*, vol. 5, no. Suppl 1, Feb. 2012, doi: 10.1093/NDTPLUS/SFR165.



IMIBIC

INSTITUTO MAIMÓNIDES DE
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
DE CÓRDOBA



UNIVERSIDAD
DE
CÓRDOBA



Hospital
Universitario
Reina Sofía