

Departamento de Medicina y Cirugía Animal
Universidad de Córdoba

**CALCIFICACIÓN VASCULAR ASOCIADA A INFLAMACIÓN:
INFLUENCIA DE LA VITAMINA D.**

Tesis Doctoral propuesta por Fátima Guerrero Pavón, Licenciada en
Veterinaria, para optar al grado de Doctor.

Directores

Dr. Escolástico Aguilera Tejero

Catedrático

Departamento de Medicina y Cirugía Animal
Universidad de Córdoba.

Dr. Ignacio López Villalba

Profesor titular

Departamento de Medicina y Cirugía Animal
Universidad de Córdoba.

TITULO: *CALCIFICACIÓN VASCULAR ASOCIADA A INFLAMACIÓN:
INFLUENCIA DE LA VITAMINA D.*

AUTOR: *FÁTIMA GUERRERO PAVÓN*

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

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

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

INFORMA:

Que D^a. Fátima Guerrero Pavón ha realizado bajo mi dirección, de forma conjunta entre el Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Córdoba y el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), el trabajo titulado: **“Calcificación vascular asociada a inflamación: Influencia de la vitamina D.”**, y que a mi criterio dicho trabajo cumple con la estructura y los indicios de calidad requeridos por la normativa vigente y muestra una correcta correspondencia entre los objetivos planteados y los resultados obtenidos. Resultados que son de gran relevancia desde el punto de vista científico con varias aportaciones tanto a revistas como a congresos de ámbito internacional.

Por todo ello, autorizo la presentación de la Tesis Doctoral

Córdoba, a 1 de octubre de dos mil doce.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Escolástico', is centered on the page. The signature is written in a cursive style and is surrounded by a faint, circular, dotted pattern.

Fdo: Escolástico Aguilera Tejero.

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

INFORMA:

Que D^a. Fátima Guerrero Pavón ha realizado bajo mi dirección, de forma conjunta entre el Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Córdoba y el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), el trabajo titulado: **“Calcificación Vasular asociada a Inflamación: Influencia de la vitamina D”**, y que a mi criterio dicho trabajo cumple con la estructura y los indicios de calidad requeridos por la normativa vigente y muestra una correcta correspondencia entre los objetivos planteados y los resultados obtenidos. Resultados que son de gran relevancia desde el punto de vista científico con varias aportaciones tanto a revistas como a congresos de ámbito internacional.

Por todo ello, autorizo la presentación de la Tesis Doctoral

Córdoba, a 1 de octubre de dos mil doce.



Fdo: Ignacio López Villalba.

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS.

Como casi todos los proyectos largos, esta Tesis Doctoral no se habría llevado a término sin la colaboración de un número de personas que casi tiende a infinito. Sin la ayuda de todos ellos este trabajo presentaría deficiencias mucho mayores de las que hoy aún contiene. Por este motivo quiero agradecer profundamente la participación de toda la gente que ha influido directa o indirectamente durante los últimos años en el trabajo resumido en esta memoria.

He de agradecer ante todo, a mis directores de tesis, al Dr. Escolástico Aguilera Tejero y al Dr. Ignacio López Villalba, por haberme brindado la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, así como al Dr. Mariano Rodríguez Portillo. Agradezco de verdad el apoyo, la confianza, la paciencia y el estímulo que desde el primer momento han proporcionado para la realización de este proyecto de Tesis, así como la crítica y valoración del incesante y duro trabajo diario.

Y ofrecer mención especial a mi familia y amigos más cercanos, por saber respetar mi trabajo, comprender mi estado de ánimo y ayudarme en los momentos difíciles.

ABREVIATURAS.	15
RESUMEN	21
SUMMARY	15
INTRODUCCIÓN	29
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	35
1. ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.....	35
1.1. DEFINICIÓN.....	35
1.2. ALTERACIONES DEL METABOLISMO MINERAL EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.....	37
1.2.1. Homeostasis del fósforo en la enfermedad renal crónica.	37
1.2.2. Homeostasis del calcio en la enfermedad renal crónica.	38
1.2.3. Hiperparatiroidismo renal secundario.....	39
2. ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA Y PATOLOGÍA CARDIOVASCULAR.....	41
2.1. ESTRUCTURA DE LA PARED VASCULAR.....	41
2.2. LA CÉLULA DE MÚSCULO LISO VASCULAR.	43
2.3. TIPOS DE CALCIFICACIÓN VASCULAR.	44
2.3.1. Calcificación de la túnica íntima.	45
2.3.2. Calcificación de la túnica media o de Mönckeberg.....	46
2.4. MECANISMOS DE CALCIFICACIÓN VASCULAR.	47
2.4.1.- Calcio y fósforo.	47
2.4.2.- Vesículas de matriz y apoptosis.	48
2.4.3 Degradación de la elastina.	50
2.4.4.- Activadores de la calcificación.....	51
2.4.4.1.- Runx2.	52
2.4.4.2.- Proteína morfogénica ósea-2 (BMP-2).....	54
2.4.5.- Inhibidores de la calcificación.....	56
2.4.5.1. Proteína de matriz Gla (MGP).....	56

2.4.5.2. Osteopontina (OPN).....	58
2.4.5.3. Pirofosfato.....	59
2.4.5.4. Fetuina-A.....	61
3. INFLAMACIÓN EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.....	62
3.1. INFLAMACIÓN COMO FACTOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR.....	64
3.2. CITOQUINAS	65
3.2.1 Interleuquina-6.	66
3.2.2.- Factor de necrosis tumoral alfa.	68
3.2.3. Interleuquina-1.	71
3.3. QUIMIOQUINAS.....	73
3.3.1. Proteína quimiotáctica de monocitos-1.	74
4. VITAMINA D.....	76
4.1. ESTRUCTURA, BIOSÍNTESIS Y MECANISMO DE ACCIÓN DE LA VITAMINA D.	76
4.2. VITAMINA D EN ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.....	81
4.3. ANÁLOGOS DE LA VITAMINA D.	83
4.4. LA VITAMINA D Y EL SISTEMA INMUNE.....	85
4.4.1. Metabolismo de la vitamina D en el sistema inmune.....	86
4.4.2. Efecto inmunomodulador de la vitamina D.	88
METODOLOGÍA	95
1. ESTUDIO IN VIVO.....	95
1.1. ANIMALES	95
1.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	96
1.3. OBTENCIÓN Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS.....	98
1.4. DETERMINACIONES	99
1.4.1. Parámetros relacionados con el metabolismo mineral.	99
1.4.2. Parámetros relacionados con la inflamación.....	101

1.4.3. Cuantificación del contenido mineral.....	104
1.4.4. Tinción Von Kossa.	105
1.4.5. Inmunohistoquímica.	106
2. ESTUDIO EX VIVO.....	108
2.1. EXPLANTES DE AORTA.	108
2.2. CULTIVO DE EXPLANTES DE AORTA.....	109
2.3. CUANTIFICACIÓN DE CALCIO.	110
2.4. TINCIÓN VON KOSSA.	111
3. ESTUDIO IN VITRO.....	112
3.1. CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR (CMLV).....	112
3.1.1. Recuento y viabilidad celular.	113
3.1.2. Cultivo de CMLV.	114
3.1.3. Cuantificación de calcio.....	114
3.1.4. Tinción Von Kossa.	115
3.1.5. Expresión génica.....	116
3.2. CÉLULAS MONONUCLEARES.....	121
3.2.1. Aislamiento de células mononucleares.....	121
3.2.2. Cultivo de células mononucleares.	122
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	123
5. REDACCIÓN Y PRESENTACIÓN GRÁFICA.....	123
RESULTADOS	117
1. ESTUDIO IN VIVO.	127
1.1. BIOQUÍMICA	127
1.2. CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS	128
1.3. CONTENIDO MINERAL EN AORTA.....	132
1.4. HISTOLOGÍA AÓRTICA.	133
1.5. INMUNOHISTOQUÍMICA.....	134
2. ESTUDIO EX VIVO.....	136

2.1. CONTENIDO MINERAL DEL CALCIO.....	136
2.2. TINCIÓN VON KOSSA.....	138
3. ESTUDIO IN VITRO	139
3.1. CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR.....	139
3.1.1. Contenido mineral de calcio.....	139
3.1.2. Tinción Von Kossa.....	141
3.1.3. Expresión génica.	142
3.2. MODULACION DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA POR ANALOGOS DE LA VITAMINA D EN CÉLULAS MONONUCLEARES.	145
DISCUSIÓN.....	146
CONCLUSIONES.....	175
BIBLIOGRAFÍA.....	177

LISTA DE ABREVIATURAS.

A continuación se presenta una relación de las abreviaturas más utilizadas a lo largo del texto:

BMP: Proteína morfogenética de hueso.

CCR2: Receptor de quimioquinas 2.

CML: Células de Músculo Liso.

CMLV: Células de Músculo Liso Vascular.

C-terminal: Extremo carboxi-terminal.

CRP: Proteína C-reactiva.

CTR: Calcitriol.

CUA: Arteriopatía Urémica Calcificante.

CV: Calcificaciones Vasculares.

CVC: Células Vasculares Calcificantes.

DBD: Dominio de unión al ADN

DBP: Proteína de unión a la vitamina D.

FGF23: Factor de crecimiento de fibroblastos 23.

EDTA: Etilendiaminotetraacético.

ELISA: Inmunoensayo enzimático.

ERC: Enfermedad renal crónica.

FBS: Suero fetal bovino.

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos.

HPT 2º: Hiperparatiroidismo secundario.

ICAM-I: Molécula de adhesión intercelular I.

IFN γ : Interferon gamma.

IL: Interleuquina.

IRMA: Ensayo inmunorradiométrico.

kDa: KiloDaltons.

- LBD:** Dominio de unión al ligando.
- LDL:** Lipoproteína de baja densidad.
- LPS:** Lipopolisacárido de *Escherichia coli*.
- MAPK:** Proteínas quinasas activadas por mitógenos.
- MCP1:** Proteína quimiotáctica de monocitos 1.
- MGP:** Proteína de matriz Gla.
- MMP:** Metaloproteinasas de matriz.
- NaPi-II:** Transportador de fosfato dependiente de sodio tipo II.
- NF- β B:** Factor de transcripción Kappa B.
- N-terminal:** Extremo amino-terminal.
- Nx:** Nefrectomía.
- OPN:** Osteopontina.
- ODR:** Osteodistrofia renal.
- PCT:** Paricalcitol.
- PBS:** Tampón fosfato salino.
- Pit:** Cotransportador de Fósforo Dependiente de Sodio Tipo III.
- PPi:** Pirofosfato.
- PMN:** Polimorfonucleares.
- PTH:** Hormona paratiroidea, parathormona.
- RT:** Retrotranscriptasa.
- RXR:** Receptor del ácido retinoico.
- SDS:** Sulfato dodecil sódico.
- SM-MHC:** Miosina de cadena pesada de músculo liso.
- SM α -actina:** α - actina de músculo liso.
- SRF:** Factor de respuesta a suero.
- TACE:** Enzima convertidora de TNF α .
- TGF:** Factor de crecimiento transformante.
- TLR:** Toll like receptor.

Tm: Temperatura de fusión.

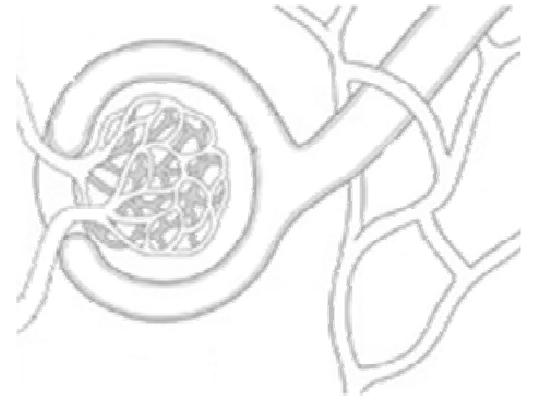
TNAP: Fosfatasa alcalina no específica de tejido.

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa.

VCAM-1: Molécula de adhesión vascular 1.

VDR: Receptor de Vitamina D.

VDRE: Elemento de respuesta a la vitamina D.



RESUMEN

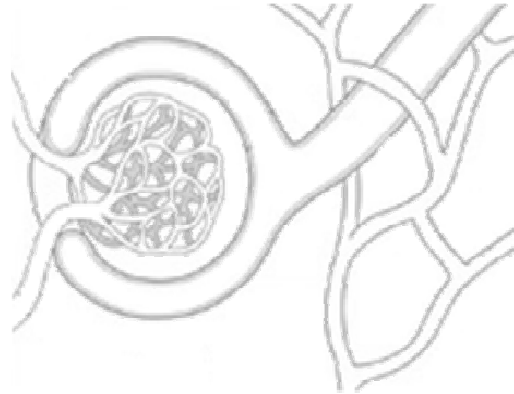
Arteriosclerosis y aterosclerosis son procesos comunes en los pacientes con enfermedad renal crónica (ERC). De hecho, la calcificación vascular (CV) representa un importante factor de riesgo que contribuye a la alta tasa de mortalidad cardiovascular asociada a la ERC. En pacientes urémicos, la CV está causada, en parte, por alteraciones en el metabolismo mineral estrechamente relacionadas con el control del hiperparatiroidismo secundario (HPT^{2º}). Los pacientes con ERC muestran un estado inflamatorio crónico, que también se asocia con morbilidad y mortalidad cardiovascular. La inflamación favorece el daño vascular, actuando como un estímulo que puede conducir al desarrollo de CV. Los análogos de vitamina D se utilizan en la ERC para el tratamiento del HPT^{2º}, pero además de sus efectos sobre el metabolismo mineral, se sabe que la vitamina D modula la respuesta inmune.

En este estudio se plantea la hipótesis de que el tratamiento con derivados de la vitamina D modifica la respuesta vascular a los mediadores de la inflamación contribuyendo, de esta forma, a regular la CV. Para probar esta hipótesis se evaluaron los efectos de calcitriol (CTR) y paricalcitol (PCT) sobre la inflamación y la calcificación vascular en cultivos de explantes aórticos y de células de músculo liso vascular expuestos a TNF α , y en ratas urémicas que recibieron lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS).

In vitro, la adición de TNF α al medio aumentó el contenido mineral de los anillos aórticos de rata y de las células de músculo liso vascular. El tratamiento con ambos análogos de la vitamina D disminuyó la expresión de proteínas osteogénicas, como la proteína morfogénica ósea 2 (BMP2), aunque sólo PCT previno la calcificación. In vivo, el tratamiento con LPS aumentó los niveles plasmáticos de TNF α , MCP1 e IL-1 α y la calcificación. La administración conjunta de LPS, con CTR o PCT condujo a una disminución significativa en los niveles plasmáticos de citoquinas y la disminución fue más acentuada con PCT que con CTR. Las ratas tratadas con CTR mostraron una elevación en el

contenido vascular de calcio, sin embargo, las ratas tratadas con PCT no aumentaron el calcio aórtico.

Estos resultados permiten concluir que: 1) La inflamación inducida por LPS favorece el desarrollo de calcificaciones vasculares en ratas urémicas. 2) El tratamiento con análogos de la vitamina D reduce la respuesta inflamatoria y 3) PCT, pero no CTR, tiene un efecto protector claro y significativo sobre la calcificación vascular asociada a inflamación.



SUMMARY

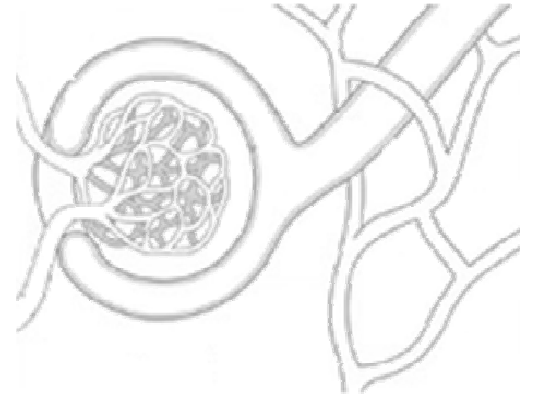
Accelerated arteriosclerosis and atherosclerosis are common features in patients with chronic kidney disease (CKD). Vascular calcification (VC) represents an important contributor to the high rate of cardiovascular mortality associated to CKD. In uremic patients, VC is caused in part by deranged mineral metabolism and is closely related to the control of secondary hyperparathyroidism (HPT²). Patients with CKD also show a chronic inflammatory state, which is associated to VC, cardiovascular morbidity and mortality. In addition to promoting concurrent changes in mineral metabolism, inflammation favors vascular damage that ultimately might lead to the development of VC. Vitamin D sterols are used in CKD for the treatment of HPT². In addition to its effects on mineral metabolism, vitamin D is known to modulate immune response.

We hypothesize that treatment with vitamin D derivatives will modify the vascular response to inflammatory mediators, a mechanism by which vitamin D may modulate VC. To test this hypothesis, the effects of calcitriol (CTR) and paricalcitol (PCT) on inflammation and VC were evaluated in cultures of aortic explants and vascular smooth muscle cells exposed to TNF α and in uremic rats receiving *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS).

In vitro, the addition of TNF α to the medium increased the mineral content of rat aortic rings (RARs) and human vascular smooth muscle cells (HVSMCs). Treatment with both vitamin D analogues decreased bone morphogenetic protein 2 (BMP2). Calcification was prevented only by PCT. In vivo, treatment with LPS increased plasma levels of TNF α , monocyte chemoattractant protein-1 (MCP1) and interleukin-1 α (IL-1) and induced calcification. The concomitant administration of LPS with either CTR or PCT led to a significant decrease in cytokine plasma levels and the decrease was more accentuated after treatment with PCT than with CTR. Rats treated with CTR showed an

elevation in aortic calcium; however, rats treated with PCT did not increase aortic calcium.

These results lead us to conclude that: 1) LPS-induced inflammation promotes the development of vascular calcification in uremic rats. 2) Treatment with vitamin D analogues reduces the inflammatory response and 3) PCT, but not CTR, has a clear and significant protective effect on vascular calcification associated to inflammation.



INTRODUCCIÓN

La enfermedad cardiovascular contribuye considerablemente a la mortalidad en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC). La mayor parte de las patologías vasculares en pacientes con ERC son secundarias al desarrollo de calcificaciones vasculares (CV), muy relacionadas con el hiperparatiroidismo secundario (HPT2°).

Las CV representan un proceso patológico multifactorial caracterizado por la deposición de fosfato cálcico, en forma de hidroxapatita, en tejidos cardiovasculares, como vasos sanguíneos, miocardio y válvulas cardíacas. La calcificación de la capa media de las arterias, que aparece comúnmente en la ERC, ocurre en la matriz extracelular de las células de músculo liso vascular (CMLV), y es el resultado de los desequilibrios del metabolismo mineral que sufren los enfermos renales. El hiperparatiroidismo secundario, la hiperfosfatemia, la hipercalcemia, y otros factores inherentes a la ERC, como el estado urémico, y la inflamación juegan también un papel relevante en la fisiopatología de estas alteraciones vasculares de los enfermos renales

Los pacientes con ERC muestran un estado inflamatorio crónico que se asocia con CV, morbilidad y mortalidad cardiovascular. Además de promover cambios simultáneos en el metabolismo mineral, la inflamación favorece el daño vascular que a la larga podría conducir al desarrollo de CV. La mayoría de los pacientes que sufren CV suelen ser de edad avanzada y padecen múltiples complicaciones metabólicas, renales e inflamatorias. Aunque en los últimos años se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de la fisiopatología de la arteriosclerosis y en su prevención, aún se conoce muy poco sobre la influencia de los procesos inflamatorios en CV.

A lo largo de la historia, la CV se ha considerado como una enfermedad pasiva o degenerativa, en la cual los minerales precipitaban espontáneamente en el tejido vascular. Sin embargo, un gran número de estudios en los últimos años han contribuido al entendimiento de los mecanismos subyacentes a las CV y

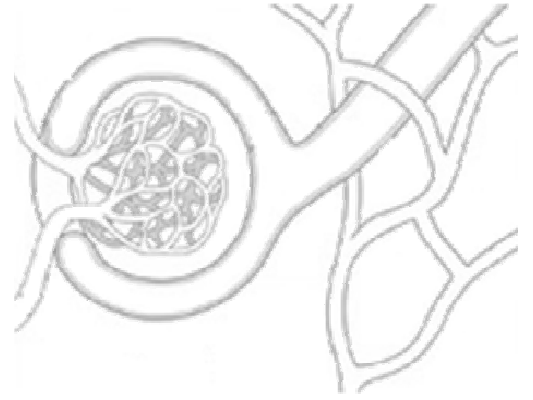
han demostrado que forman parte de un proceso exquisitamente regulado que conlleva una transformación fenotípica de las células de músculo liso vascular (CMLV) en células osteogénicas en respuesta a diversos estímulos calcificantes. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) es una citoquina importante en la cascada de la inflamación que se asocia con transdiferenciación osteogénica. Las acciones de TNF α en células musculares lisas vasculares parecen tener lugar a través de la ruta NF-kB, mediante la regulación de la proteína morfogénica ósea 2 (BMP2).

Los análogos de la vitamina D se utilizan en ERC para el tratamiento del HPT². Sin embargo, la administración de vitamina D a menudo resulta en hipercalcemia e hiperfosfatemia que pueden conducir al desarrollo de CV. Desde su descubrimiento en 1919, se sabe que la vitamina D desempeña un papel central en el control de la homeostasis del calcio y el metabolismo óseo. A partir de la identificación del receptor de la vitamina D en células inmunitarias, se han descrito importantes acciones moduladoras de la vitamina D sobre el sistema inmune, la proliferación y diferenciación celular.

En base a estos antecedentes, la **Hipótesis** que se postula en este trabajo de Tesis Doctoral es que el tratamiento con los derivados de la vitamina D podría modificar la respuesta vascular a los mediadores de la inflamación y de esta manera modular el desarrollo y progresión de las CV. Para analizar la bondad de la hipótesis, los **Objetivos** concretos planteados fueron los siguientes:

1. Diseñar un modelo de inflamación crónica en roedores mediante la administración de LPS en ratas urémicas.
2. Evaluar el efecto de los procesos inflamatorios sobre la pared vascular y en el desarrollo de calcificaciones vasculares.

3. Evaluar los mecanismos moleculares implicados en la acción de la inflamación sobre el desarrollo de CV.
4. Determinar el efecto de dos análogos de la vitamina D, calcitriol y paricalcitol, sobre el estado inflamatorio de ratas urémicas.
5. Realizar un estudio comparativo de ambos análogos de la vitamina D en su acción protectora sobre la CV asociada a inflamación.



REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.

1.1. DEFINICIÓN.

La enfermedad renal crónica (ERC) constituye en la actualidad un importante problema de salud pública. La ERC afecta a un porcentaje significativo de la población debido, fundamentalmente, a que sus causas principales residen en trastornos de alta prevalencia, como: el envejecimiento, la hipertensión arterial, la diabetes y la enfermedad vascular. Estos pacientes tienen un riesgo cardiovascular elevado y sufren una alta morbimortalidad por eventos cardiovasculares que, probablemente, tienen mayor impacto para la salud que la evolución de su enfermedad renal.

En el año 2002, la *National Kidney Foundation* estadounidense propuso, a través de las guías de práctica clínica K/DOQI, una definición y una clasificación de la ERC con el objetivo de aunar criterios y facilitar de forma sencilla y práctica el diagnóstico precoz de la enfermedad independientemente de la causa original.

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

1. Daño renal durante al menos tres meses, definido por anormalidades estructurales o funcionales del riñón con o sin descenso del filtrado glomerular, manifestado por: anormalidades patológicas o marcadores de daño renal, que incluyen alteraciones en la composición de sangre u orina y/o alteraciones en los estudios de imagen.
2. Disminución de la función renal, expresada con filtrado glomerular (FG) o por un aclaramiento de creatinina estimados $< 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$, durante, al menos, tres meses, con o sin daño renal aparente.

En los últimos años se ha puesto de manifiesto que las alteraciones del metabolismo mineral asociadas a la enfermedad renal crónica (ERC) tienen efecto adverso sobre la morbilidad y mortalidad cardiovascular. Por ello, en el enfoque actual del enfermo urémico debe abordarse en conjunto las alteraciones del hueso, del metabolismo mineral y de la enfermedad cardiovascular asociada. Existe una conexión estrecha entre todas estas alteraciones. La Fundación KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) ha propuesto nuevas definiciones:

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

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

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

1.2. ALTERACIONES DEL METABOLISMO MINERAL EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.

Los riñones juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del calcio y del fósforo, en colaboración con otros órganos como son las glándulas paratiroides, el intestino y el hueso. En la progresión de la ERC ocurren desequilibrios en el metabolismo mineral ²⁰², que son factores de riesgo importantes para el desarrollo de calcificaciones extraesqueléticas, dando como resultado complicaciones cardiovasculares y un aumento de la mortalidad.

1.2.1. Homeostasis del fósforo en la enfermedad renal crónica. El fósforo (P), mayoritariamente en la forma de fósforo inorgánico, es un componente importante de la homeostasis celular y sistémica. Es necesario para la generación de ATP, señalización intracelular y mantenimiento del pH. Es el componente principal del hueso, fosfolípidos y ácidos nucleicos. En humanos, la mayoría del P (85%) se encuentra en el hueso, el 14% es intracelular y el 1% está en el fluido extracelular.¹¹⁵ La mayoría del P ingerido es absorbido por el tracto gastrointestinal, por transporte pasivo a través de los enterocitos o mediante un cotransportador de P dependiente de Na (NaPi) IIB.⁶⁴ Bajo condiciones normales, el 80-90% del P filtrado es reabsorbido en el túbulo renal proximal, principalmente a través de NaPi-IIa.²²¹ Aunque el riñón es el principal regulador de la homeostasis del P bajo condiciones normales, el hueso también sirve como un reservorio de P que puede contribuir a la regulación de P sérico mediante procesos de formación y resorción ósea.¹³⁶

La regulación de los niveles de P depende fundamentalmente de la hormona paratiroidea (PTH), la fosfatona FGF23, cuya función está íntimamente ligada a la proteína transmembrana Klotho, y el calcitriol (CTR). Estas hormonas actúan principalmente modulando la reabsorción renal y/o la

absorción intestinal de fósforo.¹³⁶ PTH y FGF23, promueven la eliminación de P renal estimulando la internalización e inactivación del NaPi-IIa, y, de esta manera, disminuye la reabsorción renal de P. La PTH también estimula la liberación de calcio y fósforo de los huesos a través del proceso de resorción. La proteína Klotho es un cofactor para FGF23, pero también promueve la fosfaturia independientemente de la inactivación de NaPi-IIa.¹³⁷ El CTR promueve la absorción intestinal de P por incremento de NaPi-IIIb. Estos sistemas actúan para mantener los niveles de P séricos en un rango bastante estrecho, normalmente entre 2,8 y 4,5 mg/dl.¹⁵⁸

En la enfermedad renal crónica, la insuficiencia renal conduce a la alteración de la excreción de P y una disminución en los niveles de klotho, pero los niveles de P séricos se mantienen inicialmente en el rango normal por una upregulación de FGF23 y PTH.^{143,163,172} Desafortunadamente, este mecanismo compensador se ve desbordado a medida que la función renal va declinando. Así, a medida que avanza la ERC, el ratio de filtración glomerular disminuye y con ello se reduce la excreción de P. Además, el aumento en el remodelado óseo provocado por un exceso de PTH y la continua ingestión de P resulta en **una marcada hiperfosfatemia.**

1.2.2. Homeostasis del calcio en la enfermedad renal crónica. El calcio (Ca), en su forma ionizada, es crucial para numerosos procesos fisiológicos, incluyendo señalización neuronal, contracción muscular, coagulación sanguínea, etc. además de ser un componente principal del hueso. En humanos, el 99% de Ca se encuentra en el hueso y el 1% restante en sangre y en células. En suero el 50 % del Ca se encuentra unido a proteínas, estando por tanto la otra mitad del calcio en forma ionizada, que es la forma activa.

El Ca es absorbido en el intestino delgado, tanto por procesos de difusión paracelular como por mecanismos de transporte activo y el 98% del Ca filtrado

es reabsorbido por el riñón.²⁵⁸ Aproximadamente 500 mmol Ca por día intervienen en procesos de formación y resorción ósea.¹⁰³

Los factores que controlan los niveles de Ca séricos son CTR, hormona paratiroidea (PTH), Klotho y calcitonina.²⁵⁸ El CTR incrementa los niveles de Ca favoreciendo la absorción intestinal de Ca, reduciendo la excreción urinaria de Ca e incrementando la resorción ósea. La PTH, incrementa los niveles de Ca séricos de forma indirecta al estimular la actividad de 1alfa hidroxilasa en el riñón, incrementando así la producción de CTR y de forma directa inhibiendo la excreción urinaria de Ca y promoviendo la resorción ósea. Finalmente, Klotho también mantiene los niveles séricos de Ca estimulando la reabsorción de Ca en las células renales.⁴⁸ En contraste, la calcitonina es una hormona hipocalcemiante que estimula la excreción urinaria de Ca e inhibe la reabsorción ósea. Estos complejos mecanismos sirven para mantener los niveles de calcio extracelular en un rango muy estrecho, de 9 a 10,5 mg/dl.¹⁵⁷

En la insuficiencia renal crónica disminuye la actividad de la 1 α -hidroxilasa en el riñón lo que conlleva una disminución de CTR.¹⁶² Por otra parte el aumento de fósforo plasmático determina un incremento de los niveles de FGF23 que es un inhibidor directo de la actividad 1 α -hidroxilasa, por lo tanto también contribuye al descenso en la producción de CTR. Los bajos niveles de CTR conducen a una situación de **hipocalcemia**, que junto con la hiperfosfatemia, estimulan la secreción de PTH lo que origina el desarrollo del hiperparatiroidismo renal secundario.

1.2.3. Hiperparatiroidismo renal secundario. La PTH regula los niveles de calcio y fósforo en sangre y juega un papel importante en el remodelado óseo. La PTH actúa estimulando la liberación de calcio y fósforo del hueso a través del proceso de resorción e incrementando la reabsorción de calcio e inhibiendo la de fósforo en los túbulos renales. La PTH también actúa favoreciendo la

hidroxilación de la $25(\text{OH})\text{D}_3$ para conseguir la forma activa de la vitamina D, que a su vez actúa incrementando la absorción de calcio y fósforo en el intestino y en los túbulos renales. El incremento de calcio y CTR en suero, causa retroalimentación negativa en el proceso de liberación de PTH en las glándulas paratiroides.

En la ERC este balance se encuentra alterado, los niveles de CTR y calcio en suero disminuyen y los de fósforo aumentan. Esto favorece un incremento de la secreción de PTH conduciendo al hiperparatiroidismo secundario que se caracteriza por un desorden funcional de las glándulas paratiroides, con la consiguiente hipersecreción de PTH e hiperplasia de las glándulas.

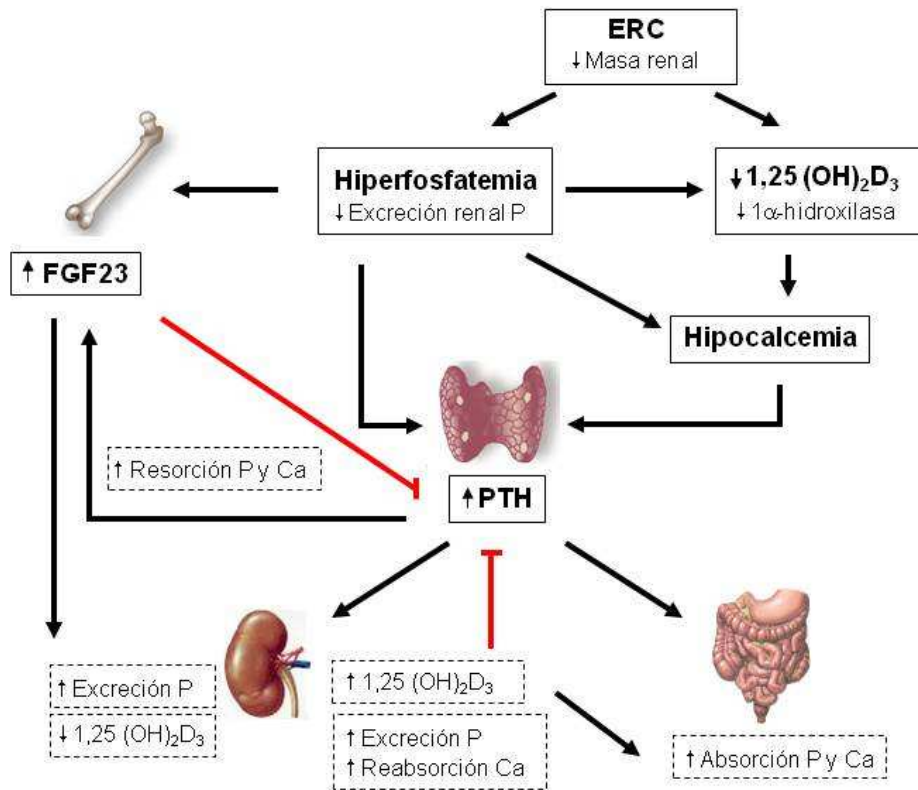


Figura 1. Fisiopatología del hiperparatiroidismo secundario (HPT2°).

2. ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA Y PATOLOGÍA CARDIOVASCULAR.

Las calcificaciones vasculares (CV) se han considerado durante mucho tiempo un proceso pasivo y degenerativo que frecuentemente ocurría con la edad avanzada, aterosclerosis, varios desordenes metabólicos, como diabetes mellitus y estados finales de enfermedad renal, y enfermedades genéticas. No es hasta esta última década cuando las calcificaciones vasculares emergen como un proceso activo regulado a nivel celular de forma similar a la calcificación del hueso, susceptible de ser modificado y que puede tener importantes repercusiones clínicas. De hecho, la presencia de calcificaciones en arterias coronarias se asocia con un riesgo relativo de eventos coronarios significativamente incrementado tanto en la población general como en los pacientes urémicos. En esta población urémica las calcificaciones vasculares se caracterizan por ser más prevalentes y extensas, progresar más rápidamente y acontecer en edades muy tempranas que en la población general.

2.1. ESTRUCTURA DE LA PARED VASCULAR.

La estructura de la pared de una arteria consiste en la disposición concéntrica de tres capas diferentes: la túnica íntima, la túnica media y la túnica adventicia (Figura 2).

La túnica íntima es la capa más interna y está compuesta por una primera capa de células epiteliales planas altamente especializadas que constituye el endotelio vascular en contacto con la sangre. Éste descansa sobre una lámina basal, por debajo de la cual hay una fina capa de tejido conectivo laxo denominada capa subendotelial que puede no estar presente en los vasos de menor calibre. Entre la túnica íntima y la media se diferencia una capa

limitante formada por fibras de elastina denominada lámina elástica interna. Esta capa confiere al vaso elasticidad y capacidad para extenderse y encogerse.

La túnica media es la capa intermedia y está formada por capas concéntricas de células musculares lisas entre las cuales se interponen capas organizadas de fibras elásticas, fibras colágenas y proteoglicanos. Entre la túnica media y la adventicia se diferencia una capa limitante formada por elastina denominada lámina elástica externa.

La túnica adventicia es la capa externa y está compuesta por tejido conectivo laxo constituido por fibroblastos, fibras elásticas y fibras colágenas que se disponen paralelas al eje longitudinal del vaso sanguíneo. Por esta capa transcurren vasos de pequeño calibre, los vasa vasorum, que irrigan las células de los vasos.²⁴⁹

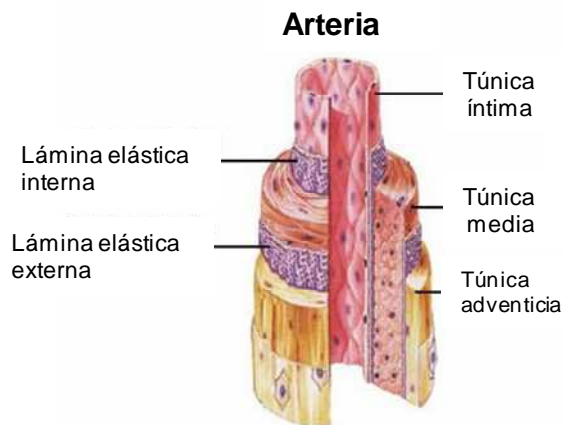


Figura 2. Estructura de la pared arterial. Compuesta por tres capas concéntricas: íntima, media y adventicia.

2.2. LA CÉLULA DE MÚSCULO LISO VASCULAR.

La célula de músculo liso vascular (CMLV) proviene del linaje mesodérmico y expresa un repertorio de proteínas contráctiles, canales iónicos, y moléculas de señalización claramente enfocados a la función de la contractilidad.²⁴⁰ Además de su función contráctil, también interviene en procesos de reparación y juega un papel muy importante en el desarrollo de la enfermedad vascular. Dado el alto potencial y plasticidad de esta célula puede presentar un amplio espectro de fenotipos distintos, en respuesta a diferentes estímulos fisiológicos y patológicos.

La modulación del fenotipo de las CMLV sucede como respuesta a los daños vasculares de diversas etiologías. En estas circunstancias, la CMLV incrementa dramáticamente las tasas de proliferación, migración, y aumenta la capacidad sintética (no contráctil). Esta capacidad juega un papel crítico en la reparación vascular y en la angiogénesis. Por lo tanto, la plasticidad fenotípica que exhiben las CMLV totalmente maduras es una ventaja de supervivencia que poseen los organismos superiores. No obstante, una desventaja del alto grado de plasticidad de las CMLV es que las predispone a cambiar su fenotipo cuando se ven sometidas a un entorno anormal, y en algunos casos a la adquisición de características que contribuyen al desarrollo y/o progresión de la enfermedad vascular. Existen pruebas concluyentes de que los cambios fenotípicos de las CMLV desempeñan un papel muy importante en un gran número de enfermedades, como hipertensión, estenosis consecuente a la angioplastia y arteriopatía post-transplante.^{240,336}

Las CMLV pueden diferenciarse a una amplia gama de fenotipos, entre ellos, los más importantes son el contráctil, el sintético y el osteogénico.^{259,289} Existen diferencias notables en la morfología del fenotipo contráctil y el sintético (Figura 3), consecuentemente, la morfología es un parámetro importante para

la definición de los fenotipos de las CML, aunque para este propósito es más fiable el uso de marcadores de diferenciación.

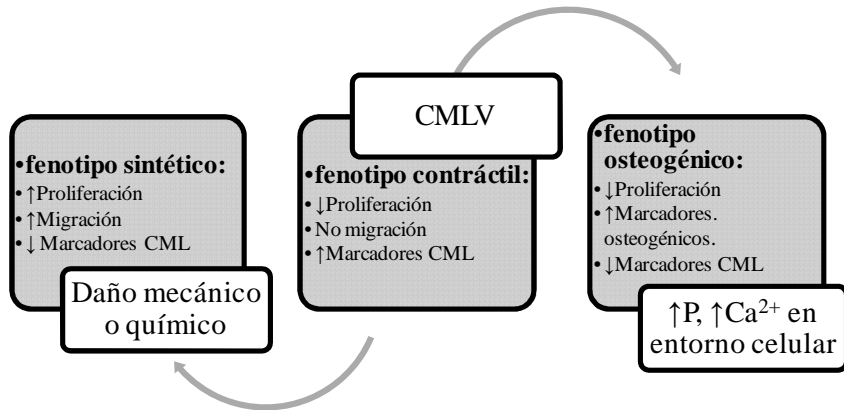


Figura 3. Plasticidad fenotípica de la CMLV. Principales diferencias entre los fenotipos contráctil, sintético y osteogénico.

2.3. TIPOS DE CALCIFICACIÓN VASCULAR.

Clásicamente, se han distinguido dos tipos de calcificación arterial dependiendo de dónde se deposite el calcio. Así, se habla de calcificación de la túnica íntima, asociada a la placa de ateroma^{43,139} y calcificación de la túnica media, conocida como esclerosis de Mönckeberg, ligada a la rigidez vascular por mineralización de las fibras elásticas y la arteriosclerosis observada con la edad, diabetes y ERC.^{87,110}

La calcificación de la túnica íntima puede ocurrir independientemente de la calcificación de la túnica media y viceversa. En pacientes con ERC se observa una mezcla de ambos tipos de calcificación.^{141,276} De hecho, resultados recientes parecen sugerir que esta clasificación no sería tan clara y que ambos tipos de calcificación serían manifestaciones del proceso aterosclerótico.^{61,204}

2.3.1. Calcificación de la túnica íntima.

Este tipo de calcificación está asociada a zonas de placas ateroscleróticas, donde tiene lugar una combinación de necrosis celular, inflamación y deposición de colesterol, fosfolípidos y lipoproteínas.^{33,72} Las placas ateroscleróticas están constituidas principalmente por una masa central grasa (ateroma) y una capa fibrosa.¹⁷¹

La aterosclerosis es un proceso dinámico de la íntima arterial, durante el cual se establecen interacciones bidireccionales tanto con el endotelio y la sangre como con las células musculares lisas de la capa media. Las turbulencias del flujo sanguíneo en determinadas zonas de la circulación junto a fenómenos mecánicos debidos a la presión arterial condicionan la aparición de fenómenos adaptativos en la íntima, lo que explica que su grosor no sea uniforme y justifica la presencia de disfunciones locales en el revestimiento endotelial, que son la base del inicio del proceso de ateromatosis.⁸⁹

La formación del ateroma comienza con una lesión o disfunción endotelial, que se produce por diversos factores, como hiperlipidemia, tabaquismo, hipertensión arterial, o envejecimiento, entre otros. Tras la lesión inicial sobreviene un proceso inflamatorio y de necrosis celular en el cual se produce la atracción, adhesión y migración de monocitos y linfocitos T a través del endotelio ¹⁹¹ y reclutamiento de macrófagos que acumulan grandes cantidades de ésteres de colesterol, dando lugar a una estría grasa. Al mismo tiempo, las CMLV de la media migran hacia la íntima, engrosando considerablemente la pared arterial. Posteriormente se forma una capa fibrosa,¹⁷⁶ que puede romperse o ulcerarse, exponiendo a la circulación los componentes de la masa central grasa y provocando la formación de un trombo que puede causar un accidente cardiovascular agudo.¹⁸

Seguidamente, la condrogénesis precede a la inducción osteoblástica y la formación de hueso. Ya en estadios tempranos las células musculares que migran hacia la intima empiezan a expresar proteínas características del hueso.²⁸⁷

2.3.2. Calcificación de la túnica media o de Mönckeberg.

Este proceso se ha descrito principalmente en vasos distales de pacientes con diabetes o insuficiencia renal crónica (IRC), aunque en los enfermos renales es muy común en múltiples arterias.⁵³ La calcificación en la túnica media fue descrita por primera vez en 1903 por J.G. Mönckeberg, quien la definió como un extenso acúmulo mineral en la túnica media que en ocasiones se extiende hasta la lámina elástica interna.²¹¹

En las primeras etapas, este tipo de calcificación presenta una morfología típica de depósitos lineales de fosfato cálcico en la túnica media, próximos a la lámina elástica. En lesiones avanzadas, los depósitos se disponen a lo largo de la media en forma de anillos, llegando a formar matriz ósea cuando la calcificación es muy extensa.²⁷⁸

Este tipo de calcificación es responsable del aumento de rigidez y con ello el descenso de la capacidad amortiguadora de los vasos, lo que provoca un aumento de la presión del pulso ⁷⁰ y favorece la hipertrofia del ventrículo izquierdo comprometiendo así la perfusión coronaria.^{123,197} Todos ellos son factores altamente asociados con alta mortalidad.

Dentro de este tipo de CV se incluye también la arteriopatía urémica calcificante (CUA), un síndrome caracterizado por lesiones cutáneas dolorosas, nódulos subcutáneos, isquemia tisular y necrosis de la piel y del tejido subcutáneo de las manos y los pies. Dichas lesiones se producen por la calcificación de las arteriolas dermoepidérmicas de los miembros distales. Esta

alteración vascular periférica es una rara complicación de la ERC y se presenta aproximadamente en el 1% de los pacientes en diálisis. El diagnóstico de este padecimiento empeora considerablemente el pronóstico de los pacientes.^{6,117}

2.4. MECANISMOS DE CALCIFICACIÓN VASCULAR.

La calcificación vascular es un proceso activo mediado por células y exquisitamente regulado en el que intervienen diferentes mecanismos no excluyentes entre sí.²⁸⁶

2.4.1.- Calcio y fósforo.

Algunos autores se refieren al calcio y al fósforo como los mecanismos pasivos de la calcificación. El aumento de los niveles de Ca, P y del producto fosfocálcico (Ca x P), prevalente en pacientes con ERC y correlacionado significativamente con aumento de mortalidad por enfermedad cardiovascular en estos pacientes,²⁶ promueve la formación de núcleos de cristales de bioapatita y su crecimiento.²⁷ En los últimos 20 años diversos estudios han demostrado que las poblaciones de CMLV no mineralizan espontáneamente en cultivos *in vitro*, pero la mineralización puede inducirse aumentando los niveles de fosfato en el medio. Cuando los niveles de fosfato del medio de cultivo se elevan hasta niveles similares a los encontrados en individuos urémicos (> 2mM), la matriz extracelular que rodea las CMLV desarrolla una mineralización con características similares a las observadas en hueso y en calcificaciones vasculares *in vivo*, incluyendo la presencia de fibras de colágeno calcificantes, vesículas de matriz e hidroxiapatita.^{2,32,111,306} Pero no se trata simplemente de un proceso pasivo de precipitación, sino que implica un

cambio fenotípico de las CMLV con aumento de marcadores osteocondrogénicos.^{214,215,289}

El cotransportador de fosfato dependiente de sodio, Pit-1 permite la acumulación de fósforo dentro de la célula, que sirve como señal para la expresión de genes osteogénicos, en la patogénesis de la CV.^{152,174} Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la entrada de P a la células no se ve alterada cuando se bloquea la expresión de Pit-1 y Pit-2,^{322,323} lo que apunta hacia un transporte de P hacia el interior de la célula independiente de sodio.

2.4.2.- Vesículas de matriz y apoptosis.

El término de vesículas de matriz hace referencia a pequeños cuerpos esféricos producidos por brotación polarizada de la superficie de condrocitos, osteoblastos y odontoblastos, que actúan como sitios de iniciación de la mineralización.^{13,24,30} La calcificación vascular está relacionada con la aparición de vesículas de matriz con contenido citoplasmático y membrana celular intacta; estas vesículas se forman a partir de células donde se origina mineralización o son el resultado del proceso de apoptosis celular (cuerpos apoptóticos). La pared vascular del paciente urémico está lesionada por procesos de inflamación y estrés oxidativo, por lo tanto es razonable pensar que exista apoptosis celular. Las vesículas de matriz son capaces de concentrar calcio en su interior y son el origen de los cristales de bioapatita.

Las vesículas de matriz y los cuerpos apoptóticos desempeñan un papel importante en la calcificación. Las observaciones realizadas durante la calcificación de tejidos, tanto en huesos como en aortas, han revelado la presencia de pequeñas vesículas de matriz derivadas de células (osteoblastos o CMLV), que aparentemente actúan como sitios de iniciación para la

cristalización de la bioapatita.^{260,277} Las CMLV liberan vesículas de matriz cuando son dañadas, entre las causas más frecuentes que provocan este daño está la sobrecarga de calcio. También se ha observado este fenómeno *in vivo* bajo condiciones de hipertensión, aneurismas, aterosclerosis y toxicidad por vitamina D. Se cree que la finalidad de la liberación de estas vesículas es proteger a la CMLV de la citotoxicidad propiciada por la sobrecarga intracelular de calcio.²⁶⁰

Tabla 1. Principales componentes de las vesículas de matriz. Adaptado de Golub, 2009.¹¹⁶

Enzimas.	Proteínas.	Lípidos.
TNAP.	Anexinas.	Acidos grasos libres.
Phospho-1.	Pit 1,2.	Fosfatidilcolina.
Na/K ATPasa.	Integrinas.	Fosfatidiletanolamina.
NPP1/PC-1.		Fosfatidilserina.
MMP-2,3,13.		Fosfatidilinositol.

Estudios *in vitro* han demostrado que los niveles altos de calcio y de fosfato en el medio de cultivo inducen la liberación de vesículas de matriz por parte de las células vivas. También propician la muerte de CMLV y, con ello, la liberación de cuerpos apoptóticos. Además, las vesículas liberadas por CMLV previamente expuestas a altas concentraciones de calcio y fosfato, contienen apatita fosfocálcica preformada y calcifican extensamente.²⁶⁰ La fagocitosis de las vesículas de matriz o de los cuerpos apoptóticos podría controlar esta situación, eliminando el “nido” de formación de cristales de bioapatita.²⁶⁰ En los vasos sanguíneos sanos no se conoce con exactitud la función de estas vesículas, pero probablemente no funcionen como sitios de iniciación de la

calcificación, porque al ser liberadas eventualmente, son fagocitadas eficientemente. Sin embargo, si el daño sobre las CMLV es extenso, la fagocitosis se ve limitada y la calcificación es más probable (Figura 4). Es muy importante resaltar que, en condiciones normales, las vesículas liberadas por las CMLV contienen inhibidores de la calcificación como MGP y fetuína-A, mientras que en condiciones patológicas, con estímulos calcificantes, las vesículas no contienen inhibidores y poseen propiedades mineralizantes.²⁷⁷

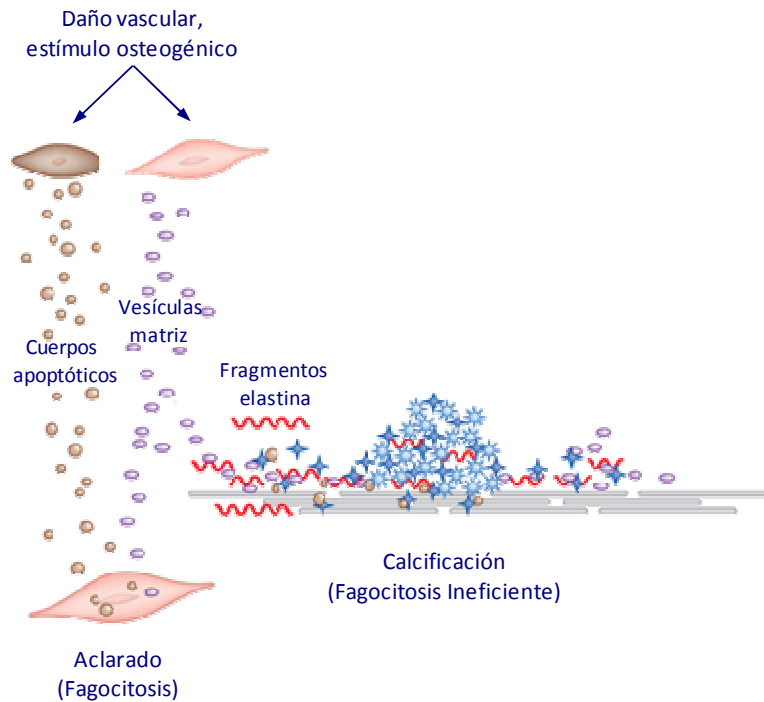


Figura 4. Mecanismo de calcificación producido por cuerpos apoptóticos, vesículas de matriz en CMLV. Adaptado de Mizobuchi et al, 2009.²¹²

2.4.3 Degradación de la elastina.

El proceso de calcificación vascular también se asocia con la degradación de la elastina. La presencia de fibras de elastina con depósitos minerales a lo largo

de la lámina elástica contribuyen al desarrollo de CV.¹⁴⁷ La elastina es la proteína más abundante en las paredes de las arterias que son sometidas a la presión de pulso que se genera por la contracción cardíaca.¹⁴⁶

La elastina constituye el 90% de las fibras elásticas y el 10% de glicoproteínas microfibrilares presentes en la matriz extracelular. Las metaloproteinasas de matriz (MMP), enzimas proteolíticas con capacidad para degradar los componentes de la matriz extracelular de la pared arterial, tienen un papel importante en la degradación de elastina.^{20,206,280} MMP2 y MMP9 degradan la elastina insoluble para generar péptidos de elastina solubles¹⁶⁷ que se unen al receptor de laminina/elastina (ELR) presente en la superficie de las CMLV.

La degradación de la elastina también induce la sobreexpresión del factor de crecimiento transformante (TGF), que no solo juega un papel importante en la diferenciación osteoblástica,¹⁹⁴ sino también acelera la calcificación de las CMLV. La vía de señalización tanto de TGF como de ELR implica la activación de MAPK que a su vez induce la activación de factores procalcificantes como Runx2.⁹⁷

2.4.4.- Activadores de la calcificación.

En el proceso de mineralización intervienen por un lado un grupo de factores que actúan como promotores de la calcificación, y por otro lado existen proteínas o factores de transcripción que actúan como inhibidores de este proceso. Cuando el equilibrio entre promotores e inhibidores favorece a los primeros, tiene lugar la mineralización de los tejidos.

Además de la hiperfosfatemia y de la hipercalcemia existen estudios que sugieren la presencia de sustancias en el suero de los pacientes con ERC capaces de estimular la calcificación, como el factor de necrosis tumoral, citoquinas proinflamatorias, fibronectina, colágeno tipo I y 25-

hidroxicolesterol. Estas sustancias presentes en el suero urémico son capaces de promover la expresión de moléculas fundamentales para la calcificación vascular. A continuación se describirán los factores procalcificantes más importantes que intervienen en el desarrollo de la CV.

2.4.4.1.- Runx2.

El factor de transcripción Runx2 , también denominado Cbfa1 (Factor de unión al núcleo alfa 1), es esencial para la osteogénesis y para la condrogénesis.³⁰³ Este factor de transcripción se une a secuencias específicas de ADN para regular, ya sea positiva o negativamente, la expresión de genes relacionados con la diferenciación celular osteogénica y con numerosas patologías, como la mineralización ectópica o la progresión y metástasis de algunos tumores.^{28,144} Asimismo, Runx2 es necesario para que las células progenitoras mesenquimales se diferencien a células osteoprogenitoras, y además regula la formación de la matriz extracelular en la diferenciación osteoblástica.³⁰³ También es el principal regulador de la expresión de osteocalcina, una proteína cuya expresión se restringe a los osteoblastos totalmente diferenciados.⁸¹

El primer experimento que indicó que Runx2 podría actuar como un factor de diferenciación del linaje osteoblástico se hizo en 1997, y permitió observar que la expresión forzada de Runx2 en células no osteoblásticas, como fibroblastos primarios, activó la transcripción de osteocalcina y sialoproteína ósea.⁸²

La importancia de este factor de transcripción se ha hecho palpable en estudios realizados con roedores deficientes en el mismo. Estos animales exhiben una pérdida total de osificación, tanto endocondral como intramembranosa, debida a la ausencia de osteoblastos y, como consecuencia, el esqueleto no mineraliza.^{164,239} También se han reportado mutaciones en el locus de Runx2 en

humanos, produciendo la displasia cleidocraneal, que se caracteriza por ausencia de clavículas, fontanelas abiertas, dientes supernumerarios y baja estatura.²²⁰

Aunque en un principio solamente se había descrito este factor de transcripción en células osteogénicas, en los últimos años y en un creciente número de estudios se ha relacionado la expresión de Runx2 con la diferenciación osteogénica de las CMLV. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales Runx2 regula las CV, todavía no son del todo conocidos. Un trabajo reciente realizado por Tanaka y colaboradores demostró que Runx2 reprime la expresión génica de marcadores de CML y promueve la expresión génica de marcadores osteogénicos en CMLV provenientes de aorta humana.³⁰³ Runx2 interactúa físicamente con el factor de transcripción SRF (factor de respuesta a suero), que regula los promotores de genes de CML, y afecta al complejo ternario SRF/miocardina, disociando la miocardina de la cromatina, lo que evita totalmente la actividad transcripcional de ésta, por lo que se concluye que Runx2 es un factor crucial para la transición osteogénica de las CMLV.

Otro trabajo publicado por Tyson y colaboradores demostró la expresión conjunta, en arterias calcificadas, de Runx2 y proteínas cuya expresión está regulada por este factor, como fosfatasa alcalina, osteopontina y osteocalcina.³¹⁴ Este fenómeno no se encontró en arterias no calcificadas provenientes de pacientes con aterosclerosis que no presentaban ERC. Las proteínas fosfatasa alcalina, osteopontina y osteocalcina no son marcadores exclusivos de diferenciación osteogénica, pero son reguladores de la calcificación y resulta interesante que Runx2 regule la expresión de proteínas que promueven la calcificación y que a la vez regule negativamente proteínas que la inhiben. Posiblemente estas acciones de Runx2 tengan el fin de controlar la extensión de la calcificación.

Asimismo, un estudio reciente de Graciolli y colaboradores demostró, con experimentos in vivo, que la expresión de Runx2 está incrementada en ratas con hiperfosfatemia y niveles normales de PTH aunque sin desarrollar CV, en comparación con ratas controles.¹¹⁸ Este hallazgo sugiere que la hiperfosfatemia por sí misma, y sin necesidad de que aparezca CV, induce la expresión de este factor de transcripción, tal y como se ha observado en estudios in vitro.²¹⁷

2.4.4.2.- Proteína morfogénica ósea-2 (BMP-2).

Las proteínas morfogénicas óseas (BMPs) son un grupo de proteínas que reciben este nombre por sus propiedades osteoinductivas. Las BMPs forman parte de la superfamilia TGF- β y actúan a través de la unión de un complejo heterodímero de receptores de transmembrana (receptor BMPI y II). Esto provoca la fosforilación y la translocación nuclear de los factores de transcripción de los genes diana.

La unión de las BMPs con sus receptores específicos provoca la movilización de proteínas de la familia de Smad, concretamente Smad 1, 5 y 8. Las rutas de señalización en las que participan BMPs, BMPRs y Smads son importantes en el desarrollo del corazón, el sistema nervioso central, y el cartílago, además de participar en el desarrollo post-natal del hueso.⁵³

BMP-2 es un potente morfogénico óseo conocido por la importancia que tiene en el mantenimiento y reparación de tejidos óseos, tanto en la embriogénesis como en la vida adulta. Es un potente inductor de la diferenciación celular osteocondrogénica y fue identificada originalmente como una proteína que induce formación ectópica de hueso.¹³⁵ BMP-2 se ha localizado en áreas de mineralización en las arterias y en diversos tipos celulares, como osteoblastos, condrocitos, células T, células endoteliales y CMLV.^{33,52,273}

En la diferenciación osteoblástica de células mesenquimales, BMP-2 actúa induciendo la expresión de factores de transcripción críticos para la mineralización como Runx2, previamente descrito, y Msx-2,^{51,168} requerido para la formación ósea intramembranosa. El efecto promineralizante de Msx-2 se produce mediante la regulación positiva de osterix, un factor transcripcional global de la mineralización y de la diferenciación osteoblástica, cuya actividad es esencial para la inducción de la fosfatasa alcalina y la mineralización por la vía de Runx2.²²⁵ Al mismo tiempo, según algunos estudios, Msx-2 también regula positivamente la expresión de BMP-2.¹³⁵ El bloqueo de la acción de BMP-2 mediante el uso de noggin, un antagonista de ésta proteína, inhibe la diferenciación osteoblástica de las CMLV y la mineralización *in vivo* e *in vitro*.¹

El papel de BMP-2 en las CV podría estar modulado por los efectos anticalcificantes de la proteína de matriz MGP, un importante inhibidor de la calcificación, así se ha observado que CMLV derivadas de aortas de roedores deficientes en MGP, al ser tratadas con BMP-2, sufrieron una diferenciación osteogénica y condrogénica, que no se observó, en CMLV provenientes de ratas normales.¹⁷³

Esta proteína también se produce en otro tipo de células no osteogénicas, como las células T y endoteliales, que al liberar BMP-2 promueven la diferenciación osteogénica y la mineralización de las células adyacentes (células mesenquimales o CMLV) por un mecanismo paracrino.^{262,281} La expresión de BMP-2 en la vasculatura está regulada por muchos factores incluyendo inflamación, estrés oxidativo e hiperglucemia.^{55,99,241} La inflamación juega un papel importante en el desarrollo de CV a través del aumento de expresión en los vasos de BMP-2. Las células endoteliales vasculares son las dianas principales de las citoquinas proinflamatorias, como TNF α , que induce calcificación en células vasculares calcificantes (CVC).³⁰⁴

En este contexto, trabajos publicados por Csiszar y colaboradores^{65,66} demostraron que el TNF α incrementó la expresión de BMP-2 en células endoteliales. De esta manera, bajo el efecto de las citoquinas inflamatorias, las células endoteliales producirán BMP-2 que actuaría sobre las CMLV adyacentes induciendo diferenciación osteocondrogénica y resultando en calcificación arterial. En consonancia con estos datos de estudios *in vitro*, se sabe que la elevación de los niveles séricos de TNF α y otras citoquinas en pacientes con ERC está asociada con complicaciones comunes, como estrés oxidativo, disfunción endotelial, y dislipidemia. Además, en este tipo de pacientes, se han encontrado niveles séricos elevados de BMP-2.²⁹⁰

2.4.5.- Inhibidores de la calcificación.

Hace mucho tiempo que se sabe que los niveles de calcio y fosfato en la sangre y los fluidos corporales están cerca de la saturación, indicando que deben existir mecanismos para prevenir la calcificación ectópica.

Los hallazgos genéticos en humanos y roedores han revelado que la mayoría de los tejidos, incluyendo a los vasos sanguíneos, expresan en condiciones normales inhibidores de la calcificación, y que la pérdida de estas moléculas permite la calcificación en tejidos no óseos. A continuación se describen algunos de los factores y proteínas más importantes con efectos anticalcificantes demostrados

2.4.5.1. Proteína de matriz Gla (MGP).

La proteína de matriz Gla (MGP) es una proteína de bajo peso molecular (12,5 kDa) que contiene cinco residuos del aminoácido dependiente de vitamina K ácido γ -carboxiglutámico (Gla). Se encuentra en huesos, cartílago, riñón, válvulas cardíacas, en la adventicia y la media de las arterias (más en la

adventicia que en la media), en suero y en las vesículas de matriz, donde actúa limitando la nucleación mineral.^{32,274} Esta proteína se expresa en los huesos a unos niveles relativamente constantes durante el desarrollo y en la vida adulta.² La función de MGP en la CV aún no está del todo clarificada. En CMLV *in vitro*, la expresión de MGP se incrementa cuando los niveles de calcio extracelular aumentan, lo que sugiere que MGP participa en un mecanismo homeostático regulatorio destinado a controlar y limitar la mineralización.²

Los roedores con delección del gen de la MGP (MGP^{-/-}) presentan una calcificación del cartílago inapropiada y mueren semanas después de haber nacido como consecuencia de la ruptura espontánea de la aorta calcificada. En los vasos calcificados de estos roedores se observa metaplasia cartilaginosa (las CMLV de la media son reemplazadas por condrocitos), la cual puede estar relacionada a la capacidad de unión de la MGP a BMP-2. La pérdida de MGP permite que BMP-2 incremente su actividad, lo cual podría inducir una conversión condrocítica de la CMLV.^{110,274} Una conclusión simple acerca de este modelo es que MGP inhibe directamente la formación de depósitos minerales en los vasos sanguíneos. Sin embargo, los roedores MGP^{-/-} manifiestan osteopenia, fracturas, baja estatura y una calcificación inapropiada de las epífisis de crecimiento en los huesos largos, características que no son fácilmente explicables con esta interpretación del modelo. Otra forma de explicarlo podría ser que MGP regule indirectamente la mineralización mediante efectos en la diferenciación celular, ya que esta proteína tiene la capacidad de inhibir la diferenciación osteogénica de las células mesenquimales, mediante el secuestro de BMP-2, con el cual MGP forma un complejo, previniendo la interacción de BMP-2 con sus receptores.²

La funcionalidad de MGP es dependiente de la γ -carboxilación producida por la vitamina K. Asimismo, el grado de γ -carboxilación de MGP influye en la mineralización extraósea. Una γ -carboxilación insuficiente, más que la

cantidad de MGP en sí, incrementa el riesgo de calcificación.² Así, la warfarina, comúnmente utilizada en pacientes con IRC, inhibe la γ -carboxilación de la MGP que es dependiente de vitamina K y su uso es un factor de riesgo potencial para el desarrollo de arteriopatía urémica calcificante.²⁷⁴

La γ -carboxilación es un cambio necesario para formar el complejo BMP-2/MGP. Price y colaboradores demostraron que la fetuína-A transporta a la MGP γ -carboxilada (pero no la no- γ -carboxilada), sugiriendo que la γ -carboxilación es esencial para unirse a esta proteína.²⁵³ La mayoría de MGP producida en los sitios de lesiones vasculares se encuentra en su forma no- γ -carboxilada y, por lo tanto, inactiva para formar el complejo BMP-2/MGP. Esto conlleva que MGP sea incapaz de neutralizar la actividad procalcificante de BMP. Estos datos parecen reflejar que solo la forma carboxilada de MGP es activa.

Cabe resaltar que los polimorfismos del gen de MGP pueden utilizarse como un factor pronóstico de la progresión de la enfermedad cardiovascular en pacientes con ERC.²⁷⁴

2.4.5.2. Osteopontina (OPN).

La osteopontina (OPN) es una fosfoproteína ácida presente normalmente en tejidos mineralizados, como los huesos y los dientes. Está altamente fosforilada y constituida por unos 300 aminoácidos, de los cuales un 30-36% aproximadamente presentan grupos carboxilo libres (ácidos aspártico o glutámico). Su peso molecular varía entre 45 y 70 kDa en función de las modificaciones postranslacionales. La OPN está implicada en la regulación de la mineralización, actuando como un inhibidor del crecimiento de los cristales de apatita. También promueve la función osteoclástica mediante la integrina

$\alpha_v\beta_3$.^{110,235,278} Las integrinas son cruciales para la migración de los osteoclastos a los lugares de resorción y el posterior acoplamiento al hueso.¹¹⁹ La osteopontina interacciona fuertemente con el calcio de la hidroxiapatita, marcándolo para que posteriormente los osteoclastos lo reconozcan mediante la integrina específica, permitiendo así que estas células puedan ejercer su función resorptiva sobre el hueso durante el proceso de calcificación.²⁵⁷

La OPN no se halla en aortas normales pero se ha identificado en abundancia en focos de calcificación de placas ateroscleróticas y en válvulas aórticas calcificadas.¹¹⁰ Asimismo, los estudios realizados en roedores deficientes en OPN demostraron que tenían de 5 a 10 veces más preosteoclastos en el bazo y en la médula ósea que los ratones normales. Por tanto, es lógico pensar que la osteopontina desempeñe un papel clave en la función de los osteoclastos.²⁶³

Por otra parte, los niveles de OPN están considerablemente elevados en las arterias calcificadas de los roedores $MGP^{-/-}$. Estos descubrimientos sugieren que la OPN puede ser un regulador de la deposición mineral en CMLV.¹¹⁰ Estudios *in vitro* con CMLV demuestran que la OPN fosforilada inhibe directamente la deposición mineral, bloqueando el crecimiento de los cristales de apatita. Sin embargo, hay que destacar que, en tejido óseo, la función de la OPN (no fosforilada) parece ser contraria a la descrita en los vasos, ya que promueve la calcificación de los huesos. Estos datos indican que la fosforilación de OPN es necesaria para su efecto inhibitorio sobre la mineralización.^{152,288}

2.4.5.3. Pirofosfato.

El pirofosfato inorgánico (PPi) es un polifosfato natural producto de degradación de muchas reacciones fisiológicas. Está presente en la sangre y en la orina y puede prevenir tanto la formación como la disolución de sales

cálcicas, adsorbiéndose sobre la superficie de los cristales recién formados.^{95,96} Por ello, Russel y Fleisch postularon que el pirofosfato podía ser una sustancia que, bajo condiciones fisiológicas, previniera la calcificación ectópica y regulara la mineralización del hueso.²⁶⁵

Así, algunos autores han demostrado que el pirofosfato inhibe la calcificación aórtica en ratas a las cuales se les suministraron grandes dosis de calcitriol.^{94,269} En este mismo sentido, otros estudios evidenciaron que la destrucción del pirofosfato por parte de la pirofosfatasa, una enzima que se encuentra en altas concentraciones en lugares calcificados,⁸³ facilita el proceso de calcificación.⁹⁴ Por tanto, en humanos, se ha establecido una relación directa entre niveles bajos de pirofosfato en plasma y una calcificación arterial extensa.²⁶⁶

En un estudio realizado por Lomashvili y colaboradores,¹⁸⁷ se incubaron explantes de aorta de rata normales y dañados (daño mecánico en la adventicia y/o endotelio) con concentraciones altas de calcio y fósforo, donde observaron que las aortas normales incubadas con alto fósforo no calcificaron, sin embargo, si al medio de cultivo se añadía fosfatasa alcalina o pirofosfatasa inorgánica (enzima que degrada el pirofosfato), los explantes calcificaban. Por otra parte, estos autores encontraron que los explantes dañados calcificaron cuando se incubaron con alto fósforo, y esta calcificación se inhibía si se añadía pirofosfato al medio de cultivo. Estos resultados apuntan a que el pirofosfato está presente en la pared vascular normal y que tiene un papel en la regulación de la transición osteogénica en CMLV.

En la misma línea, estos autores publicaron recientemente otro trabajo en el que observaron que la fosfatasa alcalina no específica de tejidos (TNAP), enzima que participa en la hidrólisis de PPi reduciendo los niveles extracelulares de éste,¹³¹ se regula positivamente por la uremia, lo que potenciará la aparición de CV en los pacientes urémicos.¹⁸⁵ Estos datos

refuerzan la idea de que el pirofosfato tiene una importante función como inhibidor de la calcificación.

2.4.5.4. Fetuina-A.

La fetuina-A es una glicoproteína con un peso molecular de aproximadamente 60 kDa que se produce en el hígado y cuya concentración sérica normal está comprendida entre 0,5 – 1 g/l en humanos.

Algunos autores han indicado que esta proteína limita la formación y la expansión de los cristales de hidroxiapatita y que esta acción inhibidora se debe, al menos en parte, a la formación transitoria de un complejo esférico coloidal soluble de fetuina-A, calcio y fosfato.¹³⁰ De esta manera, estos complejos solubles sirven para transportar y eliminar los depósitos insolubles de fosfato cálcico que se han formado en tejidos blandos (calcificaciones ectópicas).²⁵² En este sentido, estudios *in vivo* han demostrado que roedores deficientes en fetuina-A desarrollan considerables calcificaciones en corazón, pulmón, piel y riñón, aunque no desarrollan calcificación arterial.^{268,272}

Otros estudios realizados con pacientes en diálisis han establecido una relación entre las CV y bajas concentraciones séricas de fetuina-A.^{159,213,237}

Cabe mencionar que las citoquinas proinflamatorias TNF α e IL-6 tienen la capacidad de inhibir la expresión hepática de fetuina-A. Esta proteína tiene un papel inhibidor de las CV, pero también desempeña funciones importantes en la inflamación, como la limitación de la producción de citoquinas en los macrófagos y protección contra TNF α .

3. INFLAMACIÓN EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.

De forma general, la inflamación se define como una respuesta inespecífica del organismo frente a cualquier tipo de agresión sufrida capaz de causar daño celular o tisular y surge con el fin defensivo de aislar y destruir al agente dañino, así como reparar el tejido u órgano dañado.

La enfermedad vascular de los enfermos urémicos está condicionada por diferentes factores de riesgo. Entre los factores que típicamente se han asociado a riesgo cardiovascular en los pacientes urémicos están diabetes, hipertensión y obesidad. Junto a estos factores de riesgo cardiovascular tradicionales, se perfilan otros que son responsables de la particular gravedad y especificidad de las alteraciones circulatorias que acompañan a la ERC. En este contexto, destacamos el proceso inflamatorio crónico que sufren los pacientes urémicos y que contribuye sustancialmente a la morbilidad y mortalidad por enfermedad cardiovascular y disfunción endotelial en estos individuos.^{57,236,242,293,295,338}

El deterioro de la respuesta inmune en la uremia y la disminución de la función de los neutrófilos y los linfocitos T en pacientes con enfermedad renal terminal se traducen en un mayor riesgo de infección.¹² Mientras que la respuesta inmune se deteriora, el sistema inmune se encuentra bajo estimulación constante. El proceso inflamatorio que sufren estos pacientes está provocado por diferentes mecanismos, entre ellos el proceso de la diálisis per se. La exposición a toxinas urémicas, la posible contaminación bacteriana del líquido de diálisis así como la presencia de catéteres venosos centrales y el tipo de membrana de diálisis utilizada son factores que modulan este estado inflamatorio.⁷⁶ Varios autores ^{44,300} han demostrado que la hemodiálisis y la diálisis peritoneal generan un incremento en la expresión de IL-6 en células mononucleares y elevan los niveles plasmáticos de IL-6. Además, las toxinas

urémicas ejercen efectos proinflamatorios sobre monocitos/macrófagos, que podrían contribuir tanto a la enfermedad cardiovascular como a la propensión de complicaciones infecciosas en pacientes con ERC.¹¹⁴ A todo esto se unen las alteraciones en el metabolismo mineral, que aumentan el riesgo de CV que puede ser un estímulo adicional en la respuesta inflamatoria local.⁸⁰ La combinación de una respuesta inmunitaria deficiente junto con la persistencia de la estimulación del sistema inmune resulta en una alteración de citoquinas proinflamatorias circulantes que caracteriza al estado urémico y que se puede traducir en un aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular.

Debido a que en la ERC disminuye el aclaramiento renal, y la diálisis sólo elimina parcialmente algunas de las toxinas urémicas, éstas tienden a acumularse en el medio interno. Además, la circulación extracorporeal de la sangre, expuesta al contacto con la membrana de diálisis durante las sesiones de hemodiálisis, puede estimular la producción de citoquinas proinflamatorias y conducir a un ambiente proinflamatorio.⁷³ Entre un 30 y 50% de los enfermos renales tienen elevaciones de marcadores inflamatorios séricos, como proteína C reactiva (CRP), fibrinógeno, interleuquina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), factor VIIc, factor VIIIc, complejo plasmina-antiplasmina, dímero-D, y las moléculas de adhesión selectina-E, VCAM-1 e ICAM-1. El incremento de todos estos factores se ha vinculado a un aumento de la mortalidad cardiovascular en pacientes urémicos.^{9,270,309,313,329}

Es difícil definir cómo empieza la respuesta inflamatoria en etapas tempranas de la ERC. El fallo renal causa cambios en los componentes del plasma y en la estructura y función endotelial que pueden favorecer el daño vascular. Estos cambios pueden jugar un papel en la estimulación de la respuesta inflamatoria. La dislipidemia asociada a la ERC contribuye a la respuesta inflamatoria. La síntesis hepática de la apolipoproteína A-I decrece y los niveles de lipoproteínas de alta densidad bajan. Estas lipoproteínas son antioxidantes

importantes y también protegen al endotelio de los efectos proinflamatorios de las citoquinas. Los niveles séricos de triglicéridos se ven incrementados, como resultado de la acumulación de lipoproteínas de densidad intermedia conformadas por lipoproteínas de baja densidad (LDL) y remanentes de quilomicrones. Estos desequilibrios lipídicos, alteran la función endotelial y amplifican los efectos perniciosos de los mecanismos proinflamatorios.²⁷⁰

A pesar de que la liberación de citoquinas proinflamatorias pueda tener efectos beneficiosos de forma aguda, la liberación sostenida tiene efectos perjudiciales. Las citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-1 y TNF α están elevadas en pacientes con ERC en estadio 3 y 4 y se asocian con mayor riesgo a sufrir eventos coronarios y una mayor mortalidad.¹⁶¹ Además, estimulan la síntesis de CRP a través del hígado, y elevaciones de CRP se asocian con aumento de la mortalidad cardiovascular en la población general ^{69,261} y en pacientes con ERC ³²⁷ y son predictivos de rechazo agudo en el trasplante renal.²⁴⁷

3.1. INFLAMACIÓN COMO FACTOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR.

El notable aumento en la prevalencia de la enfermedad cardiovascular en los pacientes en diálisis fue descrito por primera vez por Lindner en 1974.¹⁸⁰ La prevalencia de la ERC continúa aumentando y en muchos de los pacientes con ERC temprana no progresará a insuficiencia renal terminal ya que tienen un alto riesgo de mortalidad prematura de enfermedad cardiovascular. El modelo clásico a través del que se ha explicado durante décadas la génesis de la aterosclerosis es aquel que implica a los factores tradicionales de riesgo cardiovascular, principalmente las dislipemias; sin embargo, durante las tres últimas décadas, ha adquirido especial relevancia el papel de la inflamación en la aterosclerosis.

Poole y Florey en 1958 fueron pioneros en los estudios sobre la función de los leucocitos en la aterosclerosis,²⁵⁰ que sugirieron un posible papel de los macrófagos en la placa de ateroma. Aunque muchos estudios hablan de la presencia de células inflamatorias en la aterosclerosis,^{120,154} el papel definitivo de los leucocitos no se estableció hasta 1980. Schwartz et al en 1986 realizaron un estudio en el que abordaron el papel de los monocitos y macrófagos en la aterogénesis y propusieron el concepto de aterosclerosis como una enfermedad inflamatoria. Estudios posteriores^{148,294} han demostrado la acumulación de lípidos, células T activadas y macrófagos en la íntima y adventicia de vasos con lesiones ateroscleróticas.

A principios de 1990, diversos estudios evaluaron las funciones celulares inflamatorias, como la quimiotaxis, la transmigración de monocitos, la secreción de citoquinas, y la retención de células inflamatorias en la aterosclerosis.^{90,264,275} Se identificaron las funciones de las citoquinas y los factores de crecimiento tales como TNF α ,⁷⁸ IL-12,³¹⁵ interferon- γ ,¹²⁴ factor de crecimiento derivado de plaquetas, la expresión endotelial de moléculas de adhesión vascular^{67,199,316} y quimioquinas¹⁰⁸ que podrían participar en el reclutamiento de células inflamatorias. Estos estudios iniciaron una época de expansión en la investigación del papel del eje inmuno-inflamatorio en la patogénesis de la aterosclerosis.

3.2. CITOQUINAS

Las citoquinas son proteínas solubles de bajo peso molecular, producidas fundamentalmente por linfocitos y macrófagos activados, aunque también pueden ser producidas por leucocitos polimorfonucleares (PMN), células endoteliales, epiteliales y del tejido conjuntivo y adiposo. Actúan como

mensajeras del sistema inmune y controlan muchas funciones fisiológicas críticas tales como diferenciación y maduración celular, inflamación y respuesta inmune local y sistémica, reparación tisular, hematopoyesis, apoptosis y muchos otros procesos biológicos.

Aunque se han descrito una gran variedad de citoquinas proinflamatorias, nos vamos a centrar en las principales citoquinas que se encuentran alteradas en el entorno urémico y parecen influir en el riesgo de enfermedad cardiovascular: interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1).

3.2.1 Interleuquina-6.

La interleuquina-6 (IL-6) es una glicoproteína producida por numerosos tipos de células inmunes, incluyendo monocitos, células mesoteliales, fibroblastos, adipocitos y linfocitos en respuesta a estímulos fisiológicos, tal como TNF α , IL-1 β , endotoxinas y estrés oxidativo.²⁹³ Las citoquinas ejercen su efecto biológico a través de su unión con receptores específicos expresados en la superficie celular. Los receptores son proteínas de membrana que constan de una región extracitoplasmática de unión con la citoquina, una región transmembrana y una región citoplasmática que interviene en la transmisión de señales al interior de la célula.

El receptor de la IL-6 se compone de una subunidad de unión al ligando (IL6-R o gp 80) y una subunidad gp 130 que traduce las señales al interior de la célula. La unión de la molécula a su receptor en la superficie de la célula forma un complejo que favorece la heterodimerización de la subunidad gp 130,²⁹⁸ iniciando una cascada de señalización que, en último término, dará lugar a la transcripción de determinados genes cuyos productos proteicos son los que van a ejercer el efecto biológico correspondiente.¹⁴⁹

Los niveles séricos de IL-6 se encuentran elevados en la mayoría de los pacientes con ERC.²⁹² Las causas pueden ser atribuidas a multitud de factores (Tabla 2). Pacientes con función renal disminuida presentan signos de inflamación^{74,243} que sugieren que el riñón interviene en el aclaramiento de citoquinas proinflamatorias, puesto que los niveles de proteínas inflamatorias se incrementan a medida que la lesión renal progresa.

Aunque una menor eliminación puede ser una de las principales causas de elevación de IL-6 en pacientes con ERC, el incremento en la producción de la misma también es importante. La sobrecarga de volumen y la insuficiencia cardiaca congestiva contribuyen a incrementar los niveles de IL-6 y TNF α a medida que se deteriora la función renal.²⁷⁹

Además, infecciones persistentes por *Chlamydia pneumoniae*, se asocian con aterosclerosis y eventos cardiovasculares.³⁴⁰ Se ha demostrado que *C. pneumoniae* induce la producción de IL-6 en las células endoteliales,²²⁹ mecanismo por el cual la infección por *C. pneumoniae* podría contribuir al proceso de daño vascular durante el desarrollo y progresión de lesiones ateroscleróticas.^{156,291}

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

Factores genéticos.
Edad.
Disminución de la función renal y retención de solutos urémicos.
Comorbilidad.
Sobrecarga de volumen / insuficiencia cardiaca congestiva.
Infecciones persistentes.
<i>Chlamydia pneumoniae</i> .
Catéter (<i>Staphylococcus aureus</i>).
Periodontitis.
Estrés oxidativo.
Obesidad.
Factores relacionados con la diálisis.
Membranas bioincompatibles.
Líquido de diálisis no estéril.

Elevados niveles de IL-6 se han asociado con la progresión de aterosclerosis en pacientes con ERC.²⁹² Además, in vitro se ha observado que la IL-6 disminuye la expresión de adiponectina, una adipocina antiaterogénica,⁴² otro mecanismo por el cual la IL-6 puede también promover la aterosclerosis.

3.2.2.- Factor de necrosis tumoral alfa.

La teoría de una respuesta anti-tumoral del sistema inmune in vivo fue reconocida por el médico William B. Coley hace unos 100 años. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) debe su nombre a la habilidad para destruir células tumorales (ejerce citotoxicidad en líneas celulares tumorales) y causar necrosis hemorrágica en tumores en modelos animales in vivo.⁴⁶ Es producido principalmente por macrófagos en respuesta a daño tisular o infección.^{21,134} Pertenece a una familia de ligandos que activan a sus receptores iniciando señales para la proliferación celular y apoptosis.^{21,134,183,205}

TNF α es una potente citoquina proinflamatoria que interviene en la patogénesis de enfermedades inflamatorias crónicas, tal como la artritis reumatoide y la enfermedad renal crónica.

TNF α es sintetizado principalmente como una proteína transmembrana, dispuesta en homotrímeros estables, que se expresa en la superficie celular de linfocitos y macrófagos activados además de otros tipos celulares.^{166,190,245} A través de una escisión proteolítica mediada por una metaloproteinasa, TACE (Enzima convertidora de TNF α), pasa a su forma soluble, que es liberada y ejerce sus acciones biológicas a través de la unión con sus receptores específicos TNF-R1 y TNF-R2 (Figura 5). TNF α transmembrana también se une a ambos receptores, aunque principalmente ejerce sus efectos biológicos a través del receptor tipo 2.¹²¹ Por lo que TNF α transmembrana ejerce su función biológica por contacto célula-célula o de forma local, a diferencia de la forma

soluble que entra en el torrente sanguíneo y actúa en sitios remotos o alejados de su lugar de producción.²⁴⁶

Después de la liberación de la forma soluble de TNF α por TACE, el dominio intracelular residual del precursor migra (o se transloca) hacia el núcleo de la célula, donde media la producción de citoquinas.¹³⁴

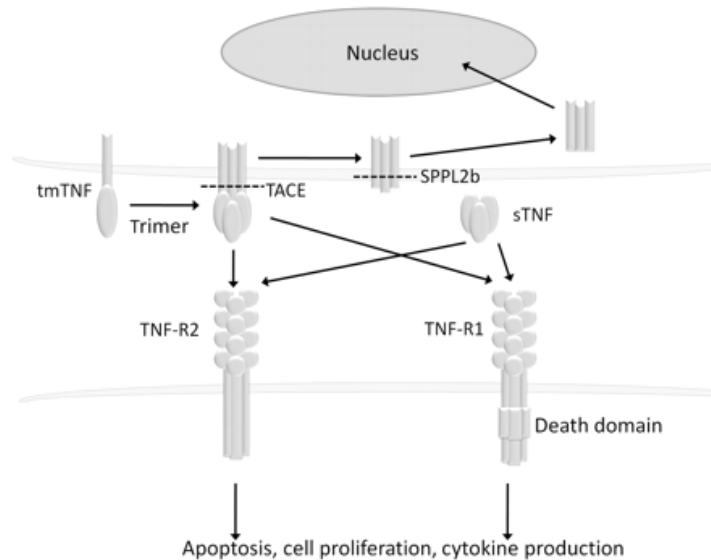


Figura 5. Biología de TNF α transmembrana y TNF α soluble. Adaptado de Horiuchi et al, 2010.¹³⁴

TNF-R1 y TNF-R2 se expresan en la mayoría de células nucleadas³¹⁸ y forman dímeros en la superficie celular, donde se unen a una molécula de TNF α trimérica, provocando la activación de un complejo proceso de señalización intracelular que media los efectos pleiotrópicos del TNF α .^{38,193}

Una señalización exagerada mediada por esos receptores lleva a inflamación severa, daño tisular y choque cardiovascular, mientras que una producción lenta y continuada de TNF α lleva a inflamación crónica.

En la uremia, el deterioro de la función renal puede ser uno de los factores más importantes asociados con un significativo aumento de la actividad de TNF α .²²⁴ En modelos animales se ha demostrado que la reducción de la función renal afecta al aclaramiento de TNF α .²³

TNF α parece tener un papel importante en el desarrollo de CV. Además de intervenir en la disfunción endotelial,^{25,91} varios estudios han demostrado que la incubación de células vasculares calcificantes (CVC) con concentraciones crecientes de TNF α condujo a un incremento dosis-dependiente de la actividad de la fosfatasa alcalina y a la deposición mineral en las células.^{304,321} Asimismo, en co-cultivos de CVC y monocitos la actividad de la fosfatasa alcalina alcanzó niveles significativamente mayores con respecto a los cultivos de CVC sin monocitos.³⁰⁵ La activación con LDL de los monocitos en co-cultivo también produjo un incremento en la actividad de la fosfatasa alcalina. Sin embargo, en cultivos de CVC sin monocitos o en co-cultivos en los cuales las CVC y los monocitos no tenían contacto directo (cultivo con insertos) no se observó este incremento en la actividad de dicha enzima. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el aumento de calcificación en CVC inducida por los monocitos se debe a dos tipos de mecanismos: la interacción intercelular y la producción de factores solubles como el TNF α .

Otro estudio reciente,²²² evidencia la correlación entre la homeostasis iónica y los mecanismos inflamatorios. Nadra demostró que los cristales básicos de fosfato cálcico provocan una respuesta inflamatoria en macrófagos humanos *in vitro*. En su estudio, los macrófagos estimulados con los cristales de fosfato cálcico liberaron TNF α , IL-1 e IL-8.

3.2.3. Interleuquina-1.

La interleuquina-1 (IL-1) fue descrita por primera vez en 1972 por Gery y Waksman como un factor activador de linfocitos.¹⁰⁹ Posteriormente se demostró que ejerce una variedad de efectos incluyendo la inducción de la inflamación, aumento de la temperatura corporal, estimulación de la proliferación de células T y B e inducción de proteínas de fase aguda.

Esta citoquina presenta dos formas biológicamente activas: la IL-1 α y la IL-1 β ,⁷⁵ que comparten una alta homología estructural y funcional.^{11,17,138,188,196} En humanos, la IL-1 β se encuentra predominantemente en circulación y la IL-1 α es un regulador de eventos intracelulares y mediador de inflamación local.⁷⁵ La activación de las células diana por la IL-1 depende de la interacción de esta proteína con receptores específicos en la membrana celular. Existen dos tipos de receptores de IL-1 (IL-1R): el tipo I (IL1-RI) y el tipo II (IL1-RII).⁷⁵

El dominio extracelular del receptor de IL-1 (IL-1RI) es el responsable de la unión del ligando e interactúa con afinidad similar con las proteínas agonistas IL-1 α e IL-1 β . Sin embargo, su interacción con la IL-1 β es menos eficiente, además es capaz de unirse con alta afinidad a la molécula pro-IL-1 α , precursor de la proteína madura. El dominio intracelular de IL-1RI es el responsable de la iniciación del mecanismo de transducción de señal que conduce a la activación de la célula (Figura 6).

El segundo tipo de receptor IL-1R (IL-1RII) comparte muchas características estructurales con la IL-1RI. Su principal diferencia se encuentra en el dominio intracelular, que en IL-1RII es muy corto y es incapaz de iniciar la transducción de señales. Así, el papel funcional de la IL-1RII es "secuestrar" a la IL-1 evitando su interacción con el receptor tipo I y la consiguiente activación, considerándose como un inhibidor natural de la actividad de la IL-

1.^{62,63,77,195} IL-1RII, a diferencia de IL-1RI, se une de manera muy eficiente a IL-1 β , mientras que su afinidad por IL-1 α es de 10 a 100 veces menor.

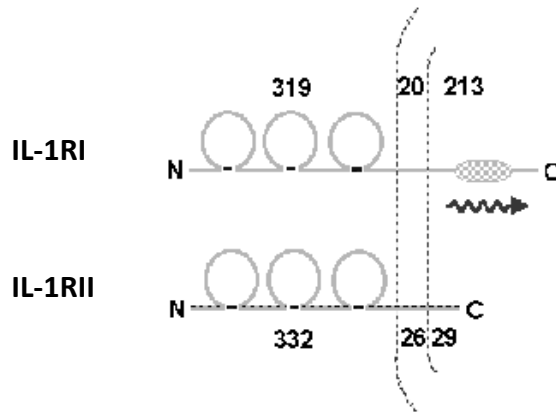


Figura 6. Señalización de IL-1. La unión de IL-1 con el receptor tipo I (IL-1RI) da lugar a la transducción de señales. La unión con el receptor tipo II (IL-1RII) es incapaz de iniciar la transducción de la señal.

Los principales tipos celulares que sintetizan IL-1 son los monocitos y los macrófagos; sin embargo, hay otras células, como las endoteliales, que también pueden producirla.⁷⁵

El efecto proaterogénico de la IL-1 se atribuye a su capacidad de participar en una serie de acontecimientos clave en el complejo proceso inflamatorio de la aterogénesis, tales como la inflamación en la pared del vaso, la quimiotaxis de leucocitos y la expresión de factores que estimulan la proliferación de células de músculo liso.^{29,177,324,325}

Durante la aterogénesis, la IL-1 promueve la inestabilidad de la placa ateromatosa debido a la regulación positiva de metaloproteinasas de matriz (MMP). Un aumento en la expresión de MMP inducido por citoquinas proinflamatorias, como la IL-1 o TNF α ,^{15,307} podría promover la

desestabilización de la placa de ateroma y conducir a la liberación de la misma con el consecuente riesgo de trombosis.¹⁰⁰

Otro efecto proaterogénico adicional que se atribuye a IL-1 es su capacidad para modular la adhesión celular y la infiltración de monocitos en el espacio subendotelial. La ausencia de IL-1 β disminuye la gravedad de la aterosclerosis en ratones deficientes en apoE, posiblemente a través de una disminución en la expresión de VCAM-1 (molécula de adhesión celular vascular) y MCP1 en la aorta.¹⁶⁰ Estas moléculas atraen a los monocitos que entran en la túnica íntima, se diferencian a macrófagos y luego a células espumosas, paso clave en la aterogénesis.

3.3. QUIMIOQUINAS.

Las quimioquinas, denominadas también citoquinas quimioatrayentes, son pequeñas proteínas que dirigen el movimiento de los leucocitos circulatorios a los lugares de inflamación o de daño. Pertenecen a una gran familia de polipéptidos de bajo peso molecular altamente básicos y que están formadas por 70-125 aminoácidos. Existen aproximadamente 40 quimioquinas humanas que se agrupan en cuatro familias en función de su estructura. La mayor de ellas, es la familia "CC". Su función se basa en atraer a las células mononucleares a los lugares de inflamación crónica y la más característica de ellas es la MCP-1. Las quimioquinas interfieren con las células mediante la activación de los receptores transmembrana de superficie.⁴⁹

Su función consiste en regular procesos celulares como la migración, el crecimiento y la activación de leucocitos, y otros tipos celulares.^{192,238} Las quimioquinas se producen en respuesta a una serie de citoquinas proinflamatorias primarias, tales como IL-1 y TNF α .

3.3.1. Proteína quimiotáctica de monocitos-1.

La proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP 1) es la quimioquina más importante que interviene en el reclutamiento de monocitos/macrófagos, jugando un papel crucial en la patogénesis de enfermedades inflamatorias. Es producida por macrófagos, células endoteliales y células de músculo liso.²²⁷ Por su actividad quimiotáctica, causa diapédesis de monocitos que desde el lumen vascular migran hacia el espacio subendotelial.²⁰⁸ Allí se convierten en células espumosas¹²⁶ iniciando así el desarrollo de la estría grasa, la primera fase de la lesión que conduce a la formación de la placa aterosclerótica, caracterizada por acumulación de células espumosas. Estos macrófagos inflamatorios que migran hacia la placa ateromatosa probablemente juegan un papel en la ruptura de la placa y el episodio isquémico resultante.

El daño vascular desencadena la secreción de MCP-1 de células endoteliales y células musculares lisas y ésta ejerce sus efectos a través de un receptor de quimioquinas 2 (CCR2).^{49,107} CCR2 se expresa en monocitos,¹⁰⁶ células dendríticas²⁸⁵ y células Th1 de memoria.⁸⁶ La unión de MCP-1 con su receptor CCR2 inicia una cascada de señalización que no solo causa la migración quimiotáctica de los monocitos, sino que también conduce a cambios en la expresión génica en los monocitos. Estos cambios génicos provocan la producción de moléculas biológicamente activas que afectan a las células vecinas e inducen la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-6 e IL-1.

Por otra parte se ha observado que el tratamiento de monocitos humanos con MCP-1 estimula la expresión de MMP, que interviene en la degradación de la elastina, uno de los mecanismos que inducen calcificación vascular.¹²⁷

En modelos animales la expresión de MCP-1 se asocia con aterosclerosis ^{7,122} y, en estudios clínicos, la elevación de la concentración plasmática de MCP-1 se asocia con factores de riesgo cardiovascular, tales como la hiperlipemia. ¹⁶⁵

4. VITAMINA D.

Las alteraciones en el metabolismo mineral y óseo se inician en estadios tempranos de la ERC y se manifiestan con un incremento progresivo en los niveles de la PTH, enfermedad ósea y calcificación vascular. Existen varios factores que contribuyen al desarrollo del hiperparatiroidismo, aunque la retención de fósforo y alteraciones en el metabolismo de la vitamina D constituyen la causa principal. La ERC induce una pérdida progresiva de la capacidad del riñón de convertir la 25(OH)D₃ a CTR, así como de mantener los niveles circulantes de 25(OH)D₃ para la síntesis de CTR no renal. Deficiencia e insuficiencia de CTR y 25(OH)D₃, son un factor de riesgo de mortalidad en individuos sanos y de deterioro renal y cardiovascular acelerado en la ERC, facilitando el desarrollo de HPT^{2º}, hipertensión e inflamación sistémica.

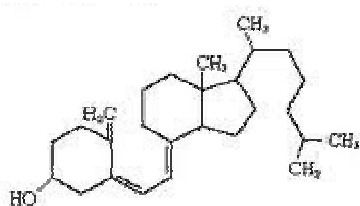
Todo esto hace necesaria la administración de vitamina D en pacientes con ERC con el fin de restaurar la normocalcemia y reducir la secreción de hormona paratiroidea. Además, más allá de la prevención de alteraciones del metabolismo mineral y óseo o del HPT^{2º}, la vitamina D y sus análogos han revelado un gran potencial terapéutico en el tratamiento de la hipertensión, diabetes, enfermedades autoinmunes, daño renal y cardiovascular y cáncer.

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

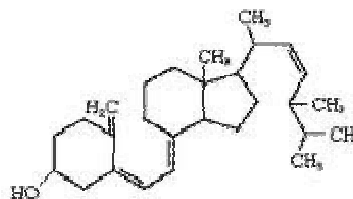
La vitamina D es una hormona esteroide importante que interviene en la homeostasis mineral y por tanto en la formación y mantenimiento de la estructura ósea.²³³ Además se le han atribuido otras funciones relacionadas con

la regulación del crecimiento, maduración y diferenciación celular,¹²⁵ la secreción hormonal⁵⁶ y la respuesta inmune.¹⁷⁸

El término vitamina D engloba una familia de compuestos derivados del colesterol. Hay dos formas predominantes de vitamina D: el colecalciferol (vitamina D₃) que se encuentra en tejidos animales y el ergocalciferol (vitamina D₂) que es sintetizado por las plantas.



Vitamina D₃ (colecalciferol)



Vitamina D₂ (ergocalciferol)

Figura 7. Formas predominantes de la vitamina D. Vitamina D₃ (colecalciferol) y vitamina D₂ (ergocalciferol).

En la piel se encuentra un derivado del colesterol, 7-dehidrocolesterol que por la exposición a la radiación ultravioleta sufre una conversión fotolítica a previtamina D₃ y de ésta a vitamina D₃ (colecalciferol).⁴⁰ La vitamina D₃ también puede ser ingerida en la dieta.

La vitamina D₃ es liberada a la sangre donde es transportada principalmente por una proteína denominada DBP (Proteína de unión a la vitamina D),⁴⁰ aunque también se puede presentar asociada a albúmina o a lipoproteínas. La concentración de vitamina D₃ sintetizada por la piel que viene determinada por la exposición de las células de la epidermis a la radiación ultravioleta va a depender de condiciones geográficas, físicas y culturales.

El colecalciferol no tiene actividad biológica y para adquirirla debe ser metabolizado a la forma activa.^{40,86} Para ello es transportado al hígado, donde sufre su primera hidroxilación mediante la enzima mitocondrial 25-hidroxilasa convirtiéndose en 25-hidroxicolecalciferol ($25(\text{OH})\text{D}_3$), también llamado calcidiol. Este es el metabolito de la vitamina D más abundante en la circulación y tiene una larga vida media. Posteriormente la 25-hidroxivitamina D sufre una segunda hidroxilación en el riñón por la enzima 1α -hidroxilasa que la convierte en 1,25 dihidroxivitamina D, forma biológicamente activa de la vitamina D, también conocida como calcitriol (CTR) y responsable de los efectos de la vitamina D en el metabolismo calcio-fósforo, mantenimiento óseo y la regulación de las glándulas paratiroides.^{34,85}

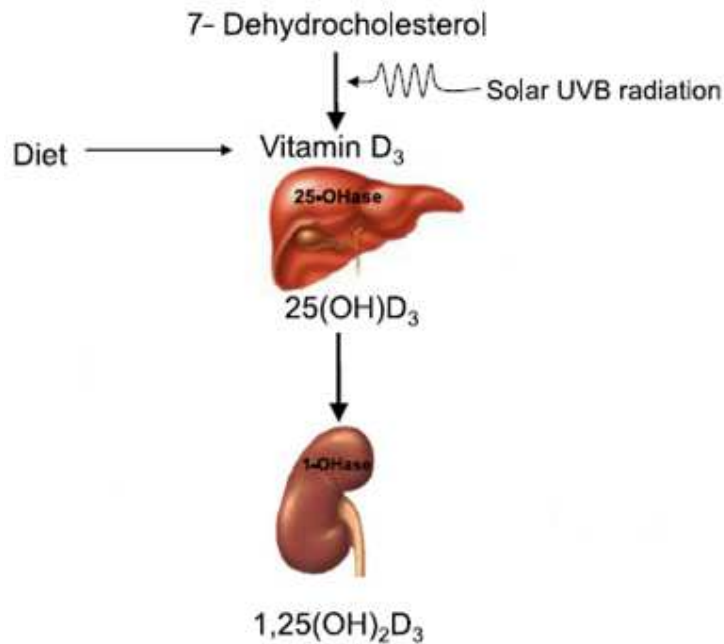


Figura 8. Síntesis de la vitamina D. El precursor de la vitamina D que se obtiene de la dieta o de la bioactivación del 7-dehidrocolesterol por las radiaciones solares sufre una serie de hidroxilaciones para obtener la forma activa $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

La 1α -hidroxilasa se localiza fundamentalmente en el riñón, aunque se han descrito otros células donde se expresa esta enzima:³¹¹ macrófagos, osteoblastos, células paratiroideas, células de músculo liso vascular, células endoteliales y tejidos como el páncreas, glándula mamaria, próstata y colon. La producción local de CTR juega un importante papel en una amplia variedad de acciones no-clásicas de la vitamina D.^{4,34}

La degradación de la vitamina D tiene lugar por la acción de la enzima 24-hidroxilasa, responsable de la hidroxilación de la $25(\text{OH})\text{D}_3$ y de CTR para dar lugar a $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ respectivamente.²⁵⁶ La enzima 24-hidroxilasa se expresa fundamentalmente en el túbulo renal, pero se ha encontrado en un amplio número de tejidos. Su afinidad por el CTR es mayor que por la $25(\text{OH})\text{D}_3$, por lo que se considera un mecanismo de eliminación del exceso de CTR con el fin de evitar toxicidad.^{41,256}

La vitamina D ejerce su acción biológica a través de la unión a su receptor VDR (vitamin D receptor). El VDR es un receptor nuclear de alta afinidad y especificidad que pertenece a la familia de los receptores esteroideos/tiroideos. Este receptor contiene varias regiones bien definidas que pueden funcionar de forma autónoma (Figura 9).

En la región N-terminal se localiza el dominio de unión al ADN (DBD), una región altamente conservada en la familia de receptores nucleares esteroideos, donde se localizan los motivos de unión al ADN y que contiene 2 dedos de zinc. Los dedos de zinc forman un lazo o "dedo de aminoácidos" que estabiliza la unión con el ADN por medio de contactos con fosfatos del esqueleto del DNA. El primer dedo de zinc es el responsable de que el VDR pueda interaccionar con alta afinidad con secuencias específicas de ADN de la región promotora de los genes diana de la vitamina D conocidas como elementos de respuesta a la vitamina D (VDREs).¹²⁹ El segundo dedo de zinc permite que el

VDR actúa como un heterodímero uniéndose al receptor del ácido retinoico (RXR).

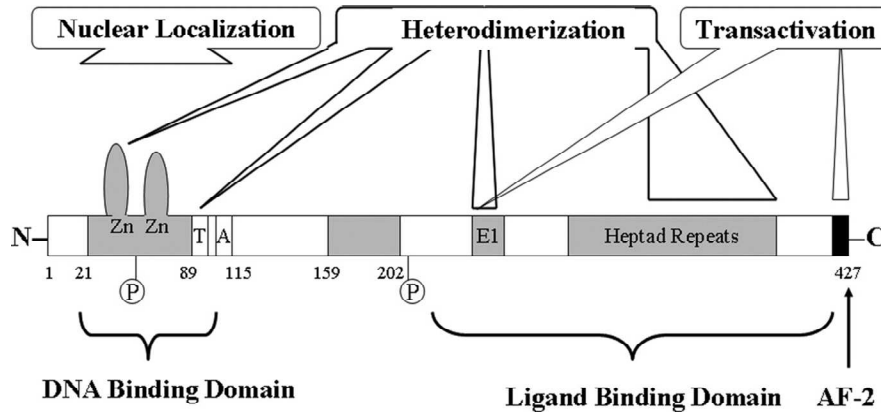


Figura 9. Dominios funcionales del receptor de la vitamina D (VDR). Adaptado Dusso et al, 2005.⁸⁵

Además el VDR contiene el dominio de unión a ligando (LBD) que constituye la región C-terminal del receptor en la que reside la capacidad del receptor para unirse a la vitamina D u otras moléculas con una estructura capaz de mimetizar la vitamina D. Estas estructuras son las responsables de la unión de alta afinidad con CTR. Este receptor tiene también capacidad para unirse a la $25(\text{OH})\text{D}_3$ y a la $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, pero con una afinidad 100 veces menor.^{41,207}

Cuando el calcitriol se une a su receptor, se produce la translocación del complejo calcitriol-VDR al núcleo de la célula, formando un heterodímero con el receptor X-retinoico (RXR).^{40,84} El complejo calcitriol-VDR-RXR se une a elementos de respuesta a vitamina D (VDREs) presentes en la región promotora de genes específicos en los tejidos diana, formando complejos con proteínas adicionales coactivadoras y correpresoras de la transcripción de

manera que pueden incrementar o disminuir la expresión de los genes diana (Figura 10).^{40,84}

El calcitriol regula la expresión de su propio receptor (VDR) estimulando su síntesis y aumentando su vida media.

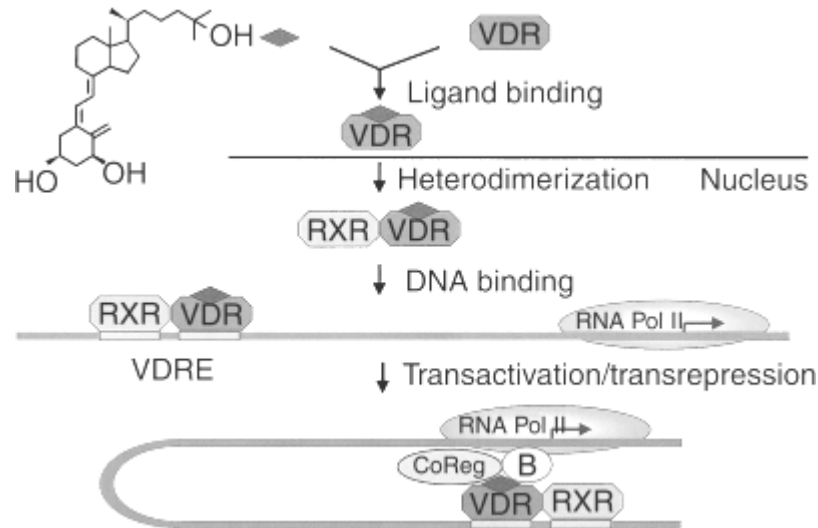


Figura 10. Acción de la vitamina D a través de su receptor (VDR). Adaptado de Dusso et al, 2003.⁸⁴

4.2. VITAMINA D EN ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.

Como ya se describió anteriormente, uno de los factores desencadenantes del hiperparatiroidismo renal secundario es el descenso progresivo de la producción de vitamina D activa.⁸⁶

Hay varios mecanismos implicados en la disminución de producción de CTR durante el curso de la enfermedad renal crónica, uno de ellos es la disminución de la masa renal funcional, que limitaría la cantidad de 1α -hidroxilasa disponible para sintetizar CTR, aunque este mecanismo no parece ser ni el único ni el principal.

Las células del túbulo proximal obtienen la 25(OH)D₃ unida a su DBP, desde el filtrado glomerular a través de un proceso activo de endocitosis mediado por la megalina.²³⁴ Una vez endocitada hacia las células del túbulo proximal, la 25(OH)D₃ puede ser metabolizada por la 1 α -hidroxilasa en la mitocondria para su conversión a CTR o retornar a la circulación para ayudar a mantener los niveles en sangre de 25(OH)D₃ y para la producción extrarrenal de calcitriol.

En la ERC, una disminución progresiva en el filtrado glomerular, causa una reducción en la disponibilidad de 25(OH)D₃ para sintetizar calcitriol y/o para su reciclado a la circulación. Además se reduce el contenido renal de megalina y con ello la entrada de 25(OH)D₃ a las células del túbulo proximal. La elevación de los niveles de FGF23 en respuesta al acúmulo de fosfato, inhibe la enzima 1 α -hidroxilasa e induce la degradación de 25(OH)D₃, lo que agravará la deficiencia funcional del riñón aumentando los requerimientos de vitamina D para corregir la producción renal y extrarrenal de CTR.¹⁰¹

La expresión de megalina es inducida por CTR,¹⁸² así, situaciones en las que los niveles de 25(OH)D₃ son bajos, resultan en una reducción de los niveles de 25(OH)D₃ en el filtrado glomerular lo que puede generar un círculo vicioso en la síntesis renal de CTR y la expresión de megalina.³⁰¹

De esta manera, en la ERC, bajos niveles de CTR agravan la progresión de la enfermedad y el hiperparatiroidismo secundario. Por otro lado, aparte de los efectos deletéreos en el metabolismo mineral, el descenso de la producción de CTR se ha asociado en enfermos renales con un aumento en la morbimortalidad cardiovascular³³⁹ y un incremento en inflamación renal.³³⁵ Todo esto hace necesaria la administración de vitamina D en pacientes con ERC con el fin de restaurar la normocalcemia y reducir la secreción de hormona paratiroidea.

4.3. ANÁLOGOS DE LA VITAMINA D.

En la ERC no sólo existe un déficit de la forma activa de la vitamina D, sino también resistencia a la acción de la misma³⁵ Debido a que la ERC se asocia con una alta prevalencia de insuficiencia y deficiencia de vitamina D, se ha recomendado que el primer paso en la corrección de los niveles de vitamina D en pacientes con ERC debería ser corregir los niveles de 25(OH)D₃.¹⁰ La acción principal del CTR es disminuir la transcripción del gen de la PTH. Sin embargo, la forma activa de la vitamina D tiene una limitación terapéutica importante al promover la absorción de Ca y P en el intestino, lo que contribuye a aumentar el riesgo de calcificación cardiovascular en pacientes con ERC por el riesgo de hipercalcemia e hiperfosfatemia. Esto ha llevado al desarrollo de análogos de la vitamina D capaces de reducir los niveles de PTH, pero que no provoquen hipercalcemia e hiperfosfatemia como sucede con el CTR.

Las moléculas empleadas para normalizar los niveles de vitamina D en pacientes urémicos son el falecalcitriol, el maxacalcitol, el doxercalciferol, el paricalcitol y el CTR.

El **falecalcitriol** es un análogo sintético de la vitamina D en cuya molécula se han sustituido los átomos de hidrógeno de los carbonos 26 y 27 por flúor, por lo que muestra una actividad mayor que el CTR debido a que su metabolismo es más lento. Un estudio realizado en pacientes urémicos en hemodiálisis mostró la efectividad de este análogo en cuanto a supresión de la secreción de PTH, si bien se acompañó de un incremento en los niveles séricos de Ca.²³⁰

El **maxacalcitol** o **22-oxacalcitriol** es otro análogo sintético de la vitamina D del que se observó inicialmente que mimetizaba ciertas acciones del CTR como antiproliferativo e inmunomodulador y posteriormente se confirmó su utilidad en el tratamiento del HPT^{2º}. En un estudio multicéntrico a doble ciego

controlado con placebo se comprobó su eficacia como supresor de la secreción de PTH, si bien se detectó una alta incidencia de episodios de hipercalcemia en pacientes tratados con dosis elevadas de la molécula.⁸

El impacto del **doxercalciferol** sobre el metabolismo mineral se evaluó en un estudio multicéntrico randomizado a doble ciego y controlado por placebo que incluyó pacientes con HPT2°. Los pacientes tratados con este análogo experimentaron un importante descenso en los niveles de PTH durante el periodo de tratamiento y sin incrementos en los niveles séricos de Ca.⁵⁹ En un estudio posterior realizado en rata urémicas se abordó el impacto del doxercalciferol sobre la CV, en comparación con el paricalcitol. Los resultados demostraron que, pese a mostrar un control similar del HPT2°, el doxercalciferol indujo el desarrollo de calcificación aórtica además de incrementar la velocidad de pulso en estos animales.²³²

Paricalcitol (19-nor-1,25(OH)₂D₃), es un análogo de la vitamina D de tercera generación, desarrollado en 1985. Su estructura es similar a la del CTR, con la excepción de que carece de un grupo metileno en la posición C19 y tiene un grupo metilo y doble enlace en la cadena lateral (Figura 11).

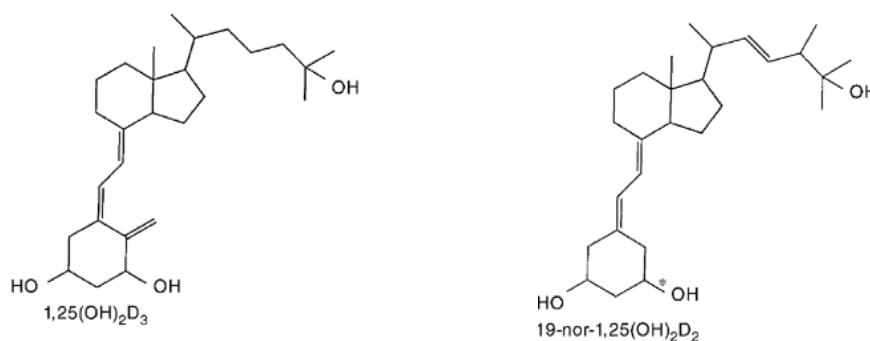


Figura 11. Estructura del CTR (1,25(OH)₂D₃) y del paricalcitol (19-nor-1,25(OH)₂D₃).

Paricalcitol (PCT) es un activador sintético del receptor de la vitamina D efectivo en la supresión de la secreción de PTH, pero de carácter menos calcemiante que el CTR. Actúa regulando al alza selectivamente el receptor de la vitamina D de las glándulas paratiroides, sin incrementar su actividad en el intestino,²⁹⁹ y es menos activo sobre la resorción ósea.^{133,198} PCT también regula al alza el receptor sensible al calcio de las glándulas paratiroides. Por consiguiente, PCT reduce la concentración de PTH inhibiendo la proliferación paratiroidea y disminuyendo la síntesis y la secreción de la misma, con un mínimo impacto sobre los niveles de calcio y fósforo; además, puede actuar directamente sobre las células óseas para mantener el volumen óseo y mejorar las superficies de mineralización.

Slatopolsky y colaboradores²⁸⁴ demostraron que PCT fue efectivo en la supresión de la PTH, tanto en cultivo de células paratiroides bovinas como en ratas urémicas con hiperparatiroidismo secundario. Además, encontraron una disminución significativa en la expresión del VDR en el intestino, lo cual explica los efectos sobre el calcio y fósforo de este análogo en contraste con calcitriol. Finch y colaboradores⁹³ también realizaron un estudio comparativo en ratas paratiroidectomizadas para evaluar sus efectos sobre la resorción ósea y observaron que paricalcitol es aproximadamente 10 veces menos activo que calcitriol en movilizar calcio y fósforo del hueso.

Esto hace que PCT sea una importante herramienta terapéutica para el tratamiento del hiperparatiroidismo renal secundario.

4.4. LA VITAMINA D Y EL SISTEMA INMUNE.

Además de sus conocidas funciones en la homeostasis del calcio y en la regulación de la PTH, la vitamina D y sus análogos han sido reconocidos por

su efecto sobre la proliferación, diferenciación e inmunomodulación.^{128,317,333} El efecto inmunomodulador de la vitamina D se descubrió hace décadas cuando en pacientes con tuberculosis se encontró un gran beneficio clínico cuando eran expuestos a la radiación solar. En todas las culturas antiguas el sol fue símbolo de vitalidad porque eran conscientes de su poder terapéutico. Antes de la era de los antibióticos tomar el sol y la administración de aceite de hígado de bacalao eran la única terapia eficaz contra la tuberculosis cutánea.^{50,330} La vitamina D también se usó para tratar la tuberculosis pulmonar, tanto como agente único, como tratamiento complementario al tratamiento con antibióticos.⁹²

Desde su descubrimiento en 1919, la vitamina D ha tenido un papel central en el control de la homeostasis del calcio y el metabolismo óseo. Durante muchos años el estudio de esta vitamina se centró solamente en estas acciones y en su relación con enfermedades como el raquitismo y la osteomalacia. Sin embargo, a partir de la detección del receptor de la vitamina D en células del sistema inmune, se han descrito importantes acciones moduladoras de la vitamina D sobre el sistema inmune, la proliferación y diferenciación celular.^{170,255}

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

El receptor de la vitamina D (VDR) se expresa en macrófagos y células dendríticas, lo que sugiere que la vitamina D juega un papel importante en la modulación de la respuesta inflamatoria.²⁰¹ Además la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ puede ser sintetizada por ambos tipos de células, ya que expresan la enzimas 25-hidroxilasa y la 1α -hidroxilasa, que permiten la producción de $25(\text{OH})\text{D}_3$ y $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ respectivamente.^{98,283} En los macrófagos y en las células dendríticas, la enzima 1α -hidroxilasa está regulada fundamentalmente por

mediadores inflamatorios como el interferon gamma ($\text{IFN}\gamma$) y lipopolisacáridos (LPS).³¹⁷

Como hemos descrito anteriormente, la vitamina D_3 se sintetiza a partir de la conversión fotolítica del 7-dehidrocolesterol presente en la piel,⁴⁰ y también puede ser ingerida en la dieta. La vitamina D_3 es transportada al hígado donde sufre su primera hidroxilación mediante la enzima mitocondrial 25-hidroxilasa convirtiéndose en 25-hidroxicolecalciferol ($25(\text{OH})\text{D}_3$). Posteriormente sufre una segunda hidroxilación en el riñón por la enzima 1α -hidroxilasa que la convierte en 1,25 dihidroxivitamina D, forma biológicamente activa de la vitamina D, también conocida como calcitriol (CTR) y responsable de los efectos de la vitamina D en el metabolismo calcio-fósforo, mantenimiento óseo y la regulación de las glándulas paratiroides.^{34,85} Además de ser procesada en el hígado y los riñones, la vitamina D_3 también puede ser metabolizada por las células del sistema inmune.^{132,283} (Figura 12).

De esta manera, $25(\text{OH})\text{D}_3$ se concentra localmente en estos microambientes linfoides que contienen fisiológicamente altas concentraciones de vitamina D_3 , lo que aumenta su acción específica y limita efectos sistémicos indeseables, como la hipercalcemia y una mayor resorción ósea.³¹⁷ Las células T activadas (y probablemente también las células B) sólo pueden realizar el paso final de conversión de $25(\text{OH})\text{D}_3$ a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.^{54,283} Sin embargo, los macrófagos y las células dendríticas expresan los dos conjuntos de enzimas necesarias para convertir la vitamina D_3 en $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.^{98,283,317}

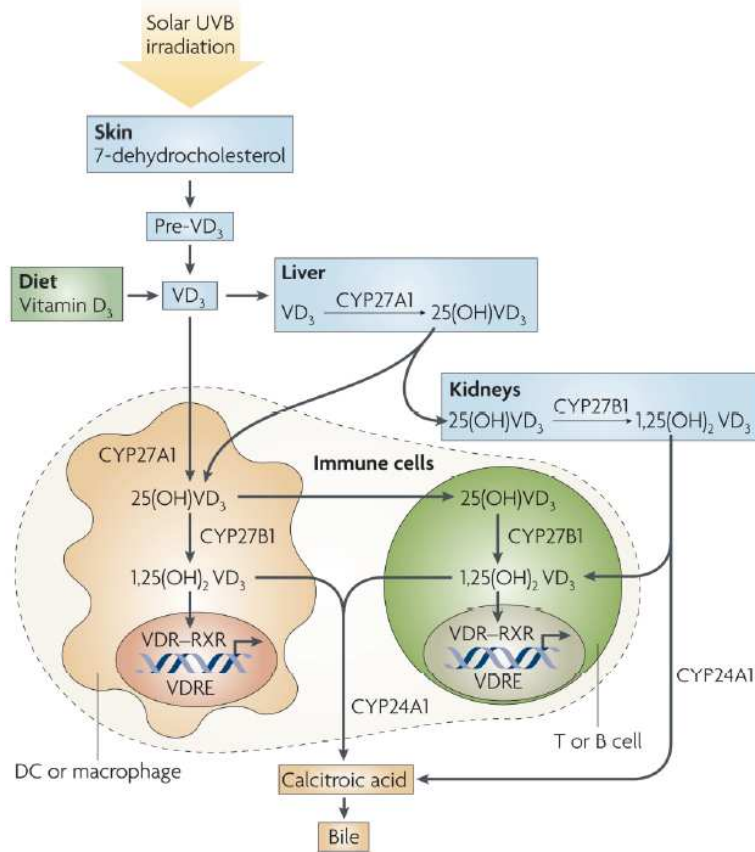


Figura 12. Metabolismo de la vitamina D en el sistema inmune. Adaptado de Mora et al, 2008.²¹⁸

4.4.2. Efecto inmunomodulador de la vitamina D.

Los macrófagos son células con gran capacidad de producción de citoquinas, en particular, $\text{TNF}\alpha$.¹⁸¹ La activación transcripcional del gen de $\text{TNF}\alpha$ en macrófagos depende en gran medida de $\text{NF-}\kappa\text{B}$, un regulador importante de la respuesta inmune, la inflamación y el estrés.¹⁹

En macrófagos estimulados por LPS, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ regula al inhibidor de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ($\text{I}\kappa\text{B}$) aumentando la expresión del mismo y su estabilidad al disminuir

su fosforilación. El aumento en los niveles de I κ B conduce a una reducción en la translocación nuclear de NF- κ B, lo que provoca una disminución de su actividad. Lo que sugiere que la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ tiene acción antiinflamatoria en macrófagos.⁶⁰

Además, la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ suprime la expresión de toll like receptor (TLR) 2 y TLR4 en monocitos humanos ²⁶⁷ (Figura 13). TLR desempeña un papel fundamental en el reconocimiento de patógenos, en la activación de la inmunidad innata y median en la producción de citoquinas necesarias para el desarrollo de la inmunidad. La incubación de monocitos aislados con 1,25(OH) $_2$ D $_3$ atenúa la expresión de citoquinas proinflamatorias, tales como IL-1, IL-6 y TNF α .¹¹³

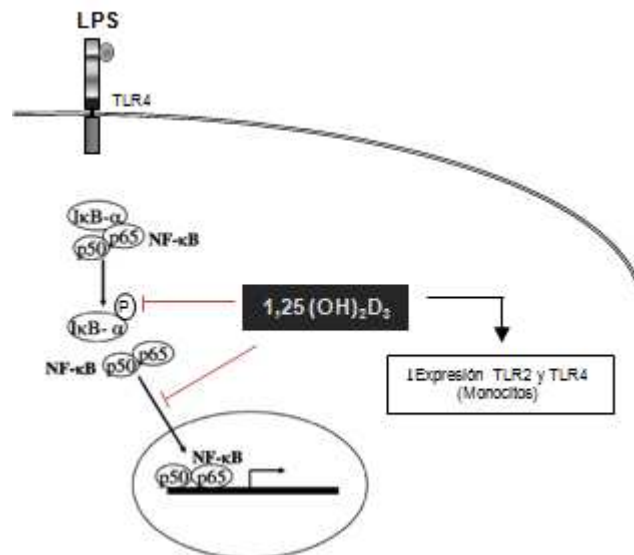


Figura 13. La vitamina D modula la respuesta inflamatoria en células del sistema inmune.

A pesar de que los datos experimentales apoyan la participación de la vitamina D en la modulación de la respuesta inflamatoria, los estudios clínicos y

epidemiológicos son todavía escasos. Los estudios observacionales han generado resultados contradictorios. Algunos estudios transversales indican que la deficiencia de vitamina D se asocia con mayores niveles séricos de biomarcadores inflamatorios, como la IL-6, TNF α y CRP en personas sanas^{79,145,228,248} y en sujetos obesos,²² mientras que otros no pudieron confirmar estos resultados.^{102,140,153,320} En algunas enfermedades asociadas con la inflamación, como la insuficiencia cardíaca crónica, la ERC y la osteoporosis, suplementos de vitamina D parece atenuar los niveles séricos de TNF α e incrementar los niveles de IL-10.^{31,142,271}

El hecho de que el VDR se exprese en distintos tipos celulares, dio lugar a que se realizaran diversos estudios sobre las funciones de la vitamina D independientes del metabolismo mineral. Los análogos de la vitamina D se han utilizado en el tratamiento de cáncer, así como en trasplantes y diversas enfermedades autoinmunes.

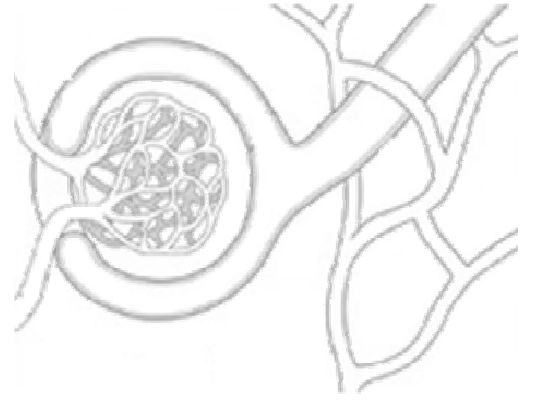
En ratones, la 1,25(OH)₂D₃ se ha utilizado para prevenir lupus eritomatoso sistémico, artritis inducida por colágeno, enfermedad inflamatoria intestinal y encefalomiелitis autoinmune experimental, una esclerosis múltiple cuya progresión está impulsada por células T activadas.⁵ La adición de 1,25 (OH)₂D₃ a la dieta impidió el inicio y progresión de la encefalomiелitis.^{45,170}

En la psoriasis, un trastorno inflamatorio crónico de la piel que se caracteriza por una disfunción de los queratinocitos y una infiltración en la epidermis de células inmunitarias, también se realizó el tratamiento con 1,25 (OH)₂D₃ o en combinación con antiinflamatorios esteroideos supuso hasta el 50% de éxito en casos moderados con estadios clínicos de la enfermedad.^{16,200} Los queratinocitos expresan VDR y la síntesis de 1,25 (OH)₂D₃ induce diferenciación de los queratinocitos. Los efectos positivos de la vitamina D

observada en la psoriasis se han atribuido a su capacidad de diferenciación y a sus propiedades antiproliferativas e inmunomoduladoras.

El aumento de IL-10 (citoquina anti-inflamatoria) y una disminución de IL-8 (citoquina pro-inflamatoria) se han encontrado en lesiones psoriásicas después del tratamiento tópico con vitamina D.¹⁵⁵ El tratamiento con 1,25(OH)₂D₃ también aumenta la expresión de los receptores de IL-10 en células epidérmicas humanas.²¹⁰

Los mecanismos exactos por los que la forma activa de la vitamina D afecta al sistema inmunológico no están del todo claros, pero se sabe que las propiedades inmunomoduladoras están mediadas por el VDR.^{47,71,129} El VDR está presente en la mayoría de tipos de células del sistema inmune, como en macrófagos, células dendríticas y linfocitos T CD4+ y CD8+.^{39,255,319} En este tipo de células, los ligandos del VDR inhiben la expresión de ciertas citoquinas, IL-2 en células T, IL-12 en mielomonocitos e IL-2, TNF α , IFN γ y GM-CSF en polimorfonucleares.^{68,219,308} La 1,25(OH)₂D₃ inhibe la proliferación de linfocitos e incrementa la maduración y supervivencia de células dendríticas.^{203,244} En general, la 1,25(OH)₂D₃ parece inhibir principalmente a los linfocitos Th1 (intervienen en la inmunidad celular), mientras que favorecen la diferenciación de los Th2 (intervienen en la inmunidad humoral).³¹²



METODOLOGÍA

1. ESTUDIO IN VIVO.

1.1. ANIMALES



Para el desarrollo de este estudio se usó un modelo experimental con ratas de raza Wistar, hembras de 8 semanas de edad y con un peso comprendido entre 250-300 grs. Los animales se mantuvieron en jaulas especiales para roedores atendiendo a las condiciones mínimas exigidas por la normativa vigente para animales de experimentación con un ciclo luz/oscuridad de 12h/12h. Previamente a su utilización, las ratas se evaluaron clínicamente, descartándose aquellos animales que presentaban cualquier signo de alteración patológica. Los individuos utilizados en nuestros experimentos presentaban un estado higiénico-sanitario óptimo. Todas recibieron los cuidados adecuados de acuerdo con los Principios para el Cuidado de Animales de Experimentación formulados por la Sociedad Americana para la Investigación Médica y la Guía para el Cuidado y Utilización de Animales de Experimentación realizada por la academia Nacional de las Ciencias, y publicadas por el Instituto Nacional de la Salud (National Institute of Health, publicación nº 86-26, revisada en 1985). Los protocolos experimentales fueron revisados y aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Córdoba.

Los animales se alimentaron a base de pienso compuesto equilibrado (Tabla 3), en formato de pellets y dispusieron además de agua potable “*ad libitum*”.

Proteína bruta	19%	Sodio (Na)	0,17%
Materias grasas	2,5%	Lysina	0,91%
Celulosa bruta	5,8%	Meth/Cystin	0,68%
Calcio	0,89%	Vitamina D₃	5000Kg
Fósforo (P)	0,65%	Vitamina E	80mg/kg

Tabla 3. Constituyentes analíticos de la dieta.

1.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Los animales fueron sometidos a una nefrectomía 5/6 (Nx) para inducirles insuficiencia renal.³⁰²

Para la anestesia de los animales se combinó una mezcla de xilacina (5 mg/kg/i.p.)(Ronpum[®], Bayer, Leverkusen, Alemania) y ketamina (80 mg/kg/i.p.)(Ketolar[®], Pfizer, Madrid, España), para no deprimir en exceso a los animales y pudieran revertir rápidamente del estado anestésico.

La nefrectomía 5/6 (5/6 Nx), es un procedimiento en dos etapas que reduce la masa renal a 1/6 del basal (Figura 14):

En la primera etapa los animales se anestesiaron y seguidamente se realizó una incisión en la superficie mediolateral izquierda del abdomen y se exteriorizó el riñón izquierdo. Se ligaron los dos polos (craneal y caudal) del riñón y, a continuación, se extirparon. Seguidamente, el remanente renal se volvió a colocar en su posición anatómica normal en la cavidad abdominal. Se suturó la incisión con hilo de sutura absorbible y la rata se alojó en una jaula individual.

Pasada una semana el animal se volvió a anestésiar y se realizó una incisión de 5-8 mm en la superficie mediolateral derecha del abdomen. Se exteriorizó el riñón derecho, se desencapsuló, se ligó el pedículo renal y se extirpó el riñón. El pedículo ligado se retornó a su posición anatómica y la herida se cerró mediante sutura. Los animales del grupo control fueron sometidos a los mismos procedimientos (anestesia y laparotomía), excluyendo la manipulación renal.

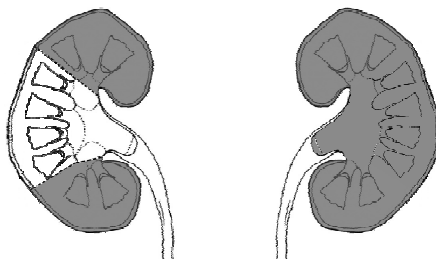


Figura 14. Modelo de ERC. La parte coloreada representa el tejido que se elimina.

El día siguiente de la segunda intervención, las ratas recibieron una dieta de alto contenido en fósforo (Ca 0,6% y P 0,9%) para acelerar el desarrollo del HPT 2° (Figura 15). Las ratas se distribuyeron al azar en 5 grupos: a) Control, b) 5/6 Nx + vehículo, c) 5/6 Nx + LPS, d) 5/6 Nx + LPS + CTR (80 ng/kg/48h ip.) y e) 5/6 Nx + LPS + PCT (240 ng/kg/48h ip.). A los grupos de ratas tratados con LPS, se les administró LPS a dosis crecientes (40, 80, 120, 160, 240, 320 y 400 $\mu\text{g}/\text{Kg}$), vía intraperitoneal todos los días durante 14 días, repitiendo la misma dosis dos días consecutivos. Este modelo de administración de LPS crónico a ratas ha sido adaptado de Moncek y colaboradores.²¹⁶

Tras los 14 días de tratamiento, las ratas se sacrificaron por exanguinación mediante punción de la arteria aorta abdominal, previamente anestesiadas. Para la anestesia se utilizó tiopental sódico (Pentothal[®] Sódico, Abbott, Ireland, IL, USA), con el fin de provocar un estado de inconsciencia profunda que evitara movimientos durante el proceso de extracción sanguínea y estados dolorosos de agonía en el animal. Se administraron 0,3 ml/rata/i.p. (7,5 mg/rata).

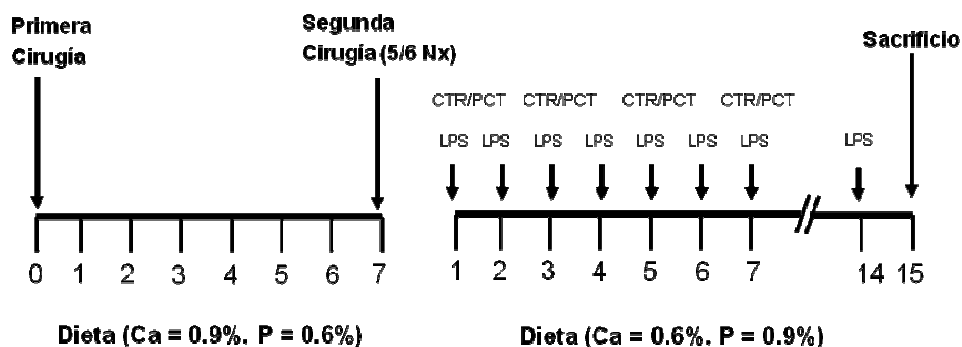


Figura 15. Diseño experimental.

1.3. OBTENCIÓN Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS.

➤ **Sangre.** Se colocó a la rata en decúbito supino, se elevó de forma suave la piel y se practicó una incisión cutánea. Posteriormente, con unas tijeras se perforaron las capas musculares y las fascias hasta llegar al peritoneo. Tras retirar lateralmente todo el paquete intestinal, se diseccionó cuidadosamente el peritoneo para poder acceder al paquete vascular que transcurre por el techo abdominal retroperitonealmente y proceder a la punción de la arteria, previa ingurgitación distal por presión con un clamp atraumático. La punción se practicó con una aguja de calibre 20 G acoplada a una jeringa. La cantidad de sangre extraída por animal fue de 4-5 ml. Una vez recolectadas las muestras de sangre arterial, se depositaron en un tubo (BD Vacutainer™, LH PST™, Belliver Industrial Estate, Plymouth, Reino Unido) con heparina de litio y se mantuvieron en condiciones de refrigeración entre 0-4 °C, por inmersión en hielo picado, hasta su procesado. Posteriormente se procedió a la centrifugación de la sangre y obtención de plasma. Los tubos se centrifugaron a una velocidad de 3500 rpm durante 5 minutos en una centrifuga

termostatizada (BR4i, Jouan S.A. Saint-Herblain, Francia), que permitió mantenerlos a una temperatura de 4 °C durante el proceso. Una vez separado el plasma, se almacenó en tubos Eppendorf[®], y se guardó a -20° C para realizar mediciones posteriores.

➤ **Aorta torácica.** La arteria se extrajo desde la altura del diafragma hasta el comienzo del arco aórtico. Las aortas se colocaron en placas de Petri con suero fisiológico estéril (Fisiológico MEIN, Fresenius Kabi, Barcelona, España) y se limpiaron cuidadosamente para eliminar cualquier resto de sangre o tejido adiposo presente. Finalmente, la aorta se seccionó en tres trozos del mismo tamaño, uno de los cuales se conservó en un vial con formaldehído al 10% en un tiempo no superior a 24 horas con el fin de evitar la pérdida de antigenicidad, para el estudio histológico, y los dos trozos restantes se almacenaron en seco a -80°C para cuantificación del depósito mineral.

1.4. DETERMINACIONES

1.4.1. Parámetros relacionados con el metabolismo mineral.

En todas las muestras de plasma obtenidas en los animales de este estudio se realizaron las siguientes determinaciones bioquímicas: Ca²⁺, P, creatinina, PTH.

➤ Calcio iónico (Ca²⁺)

La medición se llevó a cabo mediante electrodos selectivos utilizando un gasómetro analizador de iones Ciba-Corning 634 ISE (Ciba-Corning, Essex, Reino Unido).

➤ Fósforo (P) y Creatinina.

Se llevó a cabo mediante espectrofotometría con kits comerciales (Biosystems, Barcelona, España).

El fósforo inorgánico presente en la muestra reacciona con el molibdato en medio ácido originando un complejo que se cuantifica por espectrofotometría.

La creatinina presente en la muestra reacciona con el picrato en medio alcalino originando un complejo coloreado. Se mide la velocidad de formación de dicho complejo en periodos iniciales cortos, evitándose así la formación de otros compuestos.

➤ PTH

La determinación de la concentración de hormona paratiroidea en las muestras de plasma se llevó a cabo utilizando un ensayo inmunoradiométrico (IRMA) para cuantificación de PTH intacta de rata (Allegro Intact-PTH, Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, CA, USA). Esta técnica se basa en la utilización de dos anticuerpos dirigidos frente a distintas porciones de la molécula de PTH. La muestra que contiene PTH se incubaba simultáneamente con un anticuerpo preadsorbido en bolas de poliestireno, el cual reacciona con las regiones intermedia y C-terminal (35-84) de la molécula de PTH, y con otro anticuerpo marcado con I^{125} , que se adhiere a la región N-terminal (1-34) de la molécula de PTH. Las moléculas de PTH intacta contenidas en la muestra se unen inmunológicamente a los dos anticuerpos para formar un “complejo sándwich” (Figura 16).

La concentración de PTH presente en las muestras analizadas se cuantificó mediante una curva estándar. Ésta se realizó representando en una escala logarítmica el valor medio de cuentas por minuto (c.p.m.) de cada estándar

frente a la concentración de PTH respectiva. La concentración de PTH de las muestras se calculó interpolando en la curva estándar el número de c.p.m. obtenido al ensayar cada muestra.

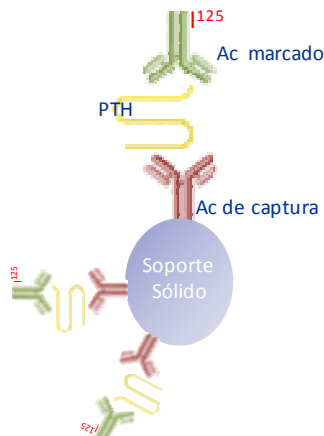


Figura 16. Radioinmunoensayo empleado para la detección de PTH.

1.4.2. Parámetros relacionados con la inflamación.

➤ TNF- α

La determinación de TNF- α se llevó a cabo mediante una técnica de ELISA, un inmunoensayo enzimático para la detección cuantitativa de TNF- α de rata (Figura 17).

El ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmoadsorbente) la reacción antígeno anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato

específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro.

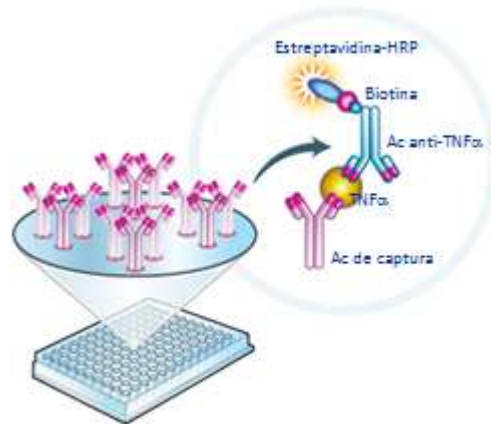


Figura 17. Representación esquemática de la técnica ELISA utilizada para la medición de TNF α .

Los pocillos de la placa tenían adherido un anticuerpo policlonal específico para TNF α (Anticuerpo de captura). Al añadir las muestras a los pocillos, el TNF α presente en el plasma fue capturado por el anticuerpo inmovilizado. El antígeno anclado fue reconocido por un anticuerpo policlonal anti-TNF α de rata marcado con una enzima. Finalmente se añadió el sustrato, desarrollándose una reacción enzimática que produjo color en proporción a la cantidad de citoquina presente en la muestra.

➤ IL-1 α y MCP-1

Para la cuantificación de IL-1 α y MCP-1 se utilizó un kit comercial FlowCytomix (Bender MedSystems Inc). Esta tecnología es multiparamétrica y posibilita el análisis simultáneo de ambas citoquinas en una misma muestra.

El principio de este análisis es similar a un inmunoensayo tipo sándwich (Figura 18) cuantificable mediante citometría de flujo.

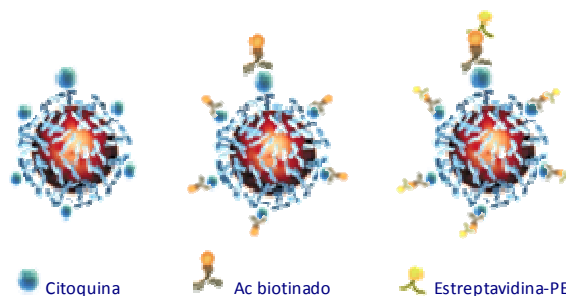


Figura 18. Inmunoensayo tipo sándwich empleado para la medición de IL-1 α y MCP-1.

La citometría de flujo es una técnica para medir cantidades mínimas de compuestos a través de su reconocimiento por medio de una reacción inmunológica que se verifica por la emisión de fluorescencia. Existen cuentas de dos tamaños distintos que en su interior contienen material fluorescente y su exterior está recubierto por un anticuerpo marcado con biotina. La combinación tamaño de la cuenta y grado de fluorescencia es característico para cada citoquina y de esta forma se identifican y cuantifican las citoquinas en una muestra.

Una vez que se realiza el ensayo, que se lleva a cabo en tubos donde se hace reaccionar la citoquina de interés en la muestra con el anticuerpo específico marcado con biotina, se le agrega estreptavidina para reconocer la cantidad de biotina incorporada y se procede a la lectura (adquisición) de las muestras.

1.4.3. Cuantificación del contenido mineral.

➤ **Aorta torácica.** Para extraer el contenido de sales cálcicas existentes en un trozo de aorta usamos el método descrito por Price y colaboradores.²⁵⁶ De forma resumida, se toma un trozo de aproximadamente 2 cm de longitud de aorta torácica y se limpia con solución salina estéril (Fisiológico EIN 500 ml, Laboratorios Kabi, España) de cualquier resto de sangre y otros tejidos adyacentes. Estos segmentos de aorta se colocan en una placa de 24 pocillos de plástico (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania) con solución de lavado preparada con: Cl_2Ca (0,147 g/L), HEPES (0,0476 g/L), NaCl (0,0876 g/L) y NaN_3 (0,002 g/L) (Sigma Aldrich Inc, MO, EE.UU.). Las aortas permanecieron en la solución de lavado durante 48 horas (renovando la solución a las 24 horas), durante este tiempo el tejido estuvo en agitación orbital a 37°C y en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 . Transcurridas las 48 horas se secaron, pesaron e introdujeron en 500 μl de ácido fórmico al 10% (Merck KgaA, Darmstadt, Alemania) durante 48 horas a temperatura ambiente. Pasadas las 48 horas, se retiró el trozo de aorta y se guardó el sobrenadante a -20° C hasta la posterior medición del contenido mineral.

La cuantificación del contenido en calcio iónico y fósforo inorgánico en el sobrenadante, se llevó a cabo mediante espectrofotometría (BTS-310, Biosystems S.A. Barcelona, España), tras obtener un producto de reacción con azul de metiltimol legible a 610 nm para el calcio (BioSystems, Barcelona, España) y con fosfomolibdato, legible a 340 nm para el fósforo (BioSystems, Barcelona, España)

1.4.4. Tinción Von Kossa.

Para la detección de los depósitos de calcio se utilizó la tinción Von Kossa. Esta tinción se basa en la sustitución de los iones de calcio intratisulares en forma de fosfatos o carbonatos, por iones de plata en solución acuosa sometidos a un proceso de exposición a la luz. Los depósitos iniciales de calcio se colorean de marrón-negro.¹⁰⁵

El casete con la muestra de aorta torácica se introdujo en un procesador Thermo Shandon Citadel (Thermo Electron Corporation, MA, USA). Posteriormente, las muestras fueron incluidas en parafina utilizando un dispensador Thermo Shandon Histocentre 2 (Thermo Electron Corporation, MA, USA). Una vez hecho el bloque de parafina, se obtuvieron secciones de 3 µm de grosor con un microtomo (Leica RM2125RT, Leica Microsystems, Nussloch, Alemania). Las secciones fueron fijadas en portas previamente tratados con Vectabond™ (Vectabond™ Reagents, Vector Laboratories Inc., CA, USA) para una mejor adhesión del tejido al cristal.

A continuación, las muestras se desparafinaron y rehidrataron por inmersión en: Xilol (15 minutos), Alcohol 100° (5 minutos), Alcohol 100° (5 minutos), Alcohol 96° (5 minutos), Alcohol 70° (5 minutos), Agua Bidestilada (5 minutos).

La tinción se llevó a cabo con una solución de nitrato de plata (Merck, Darmstadt, Alemania) al 2% durante 30-60 minutos en estufa a 37°C. Las muestras se lavaron con agua bidestilada durante 10 minutos, y se eliminó el exceso de nitrato de plata pasando las muestras (1-2 segundos) por una solución de tiosulfato de sodio al 5% (Sigma Aldrich Inc, MO, EE.UU.). Las muestras se aclararon con agua bidestilada y se tiñeron con safranina (Merck, Darmstadt, Alemania). Después se lavaron con agua durante 10 minutos, y

fueron deshidratadas en la escala ascendente de alcoholes (5 minutos en cada uno), y sumergidas en Xilol (15 minutos). Los portaobjetos se montaron con Eukitt (Panreac Química, SA, Barcelona, España).

Asimismo se llevó a cabo una contratinción con Hematoxilina-Eosina, para el estudio de la arquitectura tisular. El procedimiento que se siguió para la fijación, desparafinado y rehidratación de las muestras es el mismo utilizado para la tinción con Von Kossa. Las muestras se tiñeron con Hematoxilina (Merck, Darmstadt, Alemania) durante 20 minutos. Después fueron lavadas con agua (5 minutos), sumergidas en HCl (5 minutos), nuevamente lavadas con agua, y luego teñidas con Eosina (10 minutos) (Merck, Darmstadt, Alemania). Las muestras se lavaron, deshidrataron y montaron de la misma manera que en el protocolo del Von Kossa.

1.4.5. Inmunohistoquímica.

El procesado del tejido es similar al descrito en el estudio histológico. Las muestras se fijaron en formol durante 24 h y se introdujeron inmediatamente en el procesador de tejidos, para evitar dañar los antígenos de las células mononucleares.

El estudio de la inmunoexpresión se llevó a cabo mediante el método indirecto de la inmunoperoxidasa (ABC). Para el bloqueo de la peroxidasa endógena se usó peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 30 minutos y para bloquear las uniones inespecíficas suero normal de cabra al 10% en PBS (30 minutos a temperatura ambiente). Para la recuperación antigénica se realizó una digestión enzimática con pronasa al 0.1% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción fue revelada mediante un pase de 1 minuto

en una solución fresca de diaminobencidina al 0,035% en TBS con peróxido de hidrógeno al 0,1% y sobre fondo blanco.

Para la contratinción se utilizó Hematoxilina durante 15 segundos. Todas las preparaciones fueron montadas aplicando una gota de Eukitt® al cubreobjetos y dejando caer suavemente el portaobjetos.

Anticuerpo	Especificidad	Dilución	Isotipo	Fuente
CD3	Pan T	1:200	Anti-conejo biotinado (1:200)	Dako
CD68	Macrófagos	1:50	Anti-ratón biotinado (1:50)	Dako

Tabla 4. Características de la anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica.

2. ESTUDIO EX VIVO.

2.1. EXPLANTES DE AORTA.

Las aortas torácicas se obtuvieron de ratas Wistar, de 8 semanas de edad y un peso entre 200 y 300 gramos. Las aortas fueron extraídas de la siguiente manera: tras anestesiarse a las ratas con Tiopental Sódico (Pentothal Sódico 1 g, Abbott Laboratories S.A., Madrid, España) vía intraperitoneal, se incidió en la línea media del abdomen localizando la aorta abdominal y realizando un corte en la misma para exanguinar al animal, después se expuso la aorta torácica y se extrajo la arteria desde la altura del diafragma hasta el comienzo del arco aórtico.

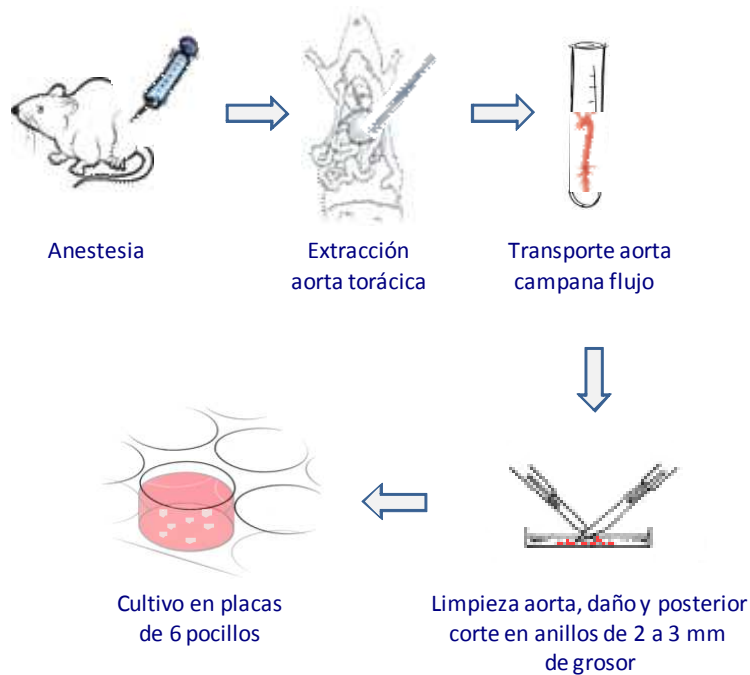


Figura 19. Representación esquemática del proceso de obtención y cultivo de las aortas torácicas de rata destinadas a explantes aórticos.

Las aortas se limpiaron cuidadosamente con suero fisiológico estéril (Fisiológico MEIN, Fresenius Kabi, Barcelona, España) en una campana de flujo laminar (Heraeus, HeraSafe, Alemania), para eliminar cualquier resto de sangre o tejido adiposo presente. Posteriormente se ocasionó un daño en la adventicia de la aorta con una torunda de algodón, frotándola 30 veces por toda la longitud del vaso. Finalmente, la aorta se seccionó en anillos de 2 a 3 mm de grosor (Figura 19).

2.2. CULTIVO DE EXPLANTES DE AORTA.

Los anillos de aorta se colocaron en placas de 6 pocillos (Becton Dickinson Labware, NJ, EE.UU.) con medio de cultivo. El medio de cultivo utilizado fue DMEM (Sigma Aldrich Inc, MO, EE.UU.) suplementado con 1 mmol/l de piruvato sódico (Bio Whittaker, Verviers, Bélgica), 4,5 g/l de glutamina (Bio Whittaker, Verviers, Bélgica), 100 U/ml de penicilina (Penilevel, Laboratorios ERN, SA, Barcelona, España), 100 mg/ml de estreptomycin (Reig Jofré, SA, Barcelona, España) y 20 mM de HEPES (Sigma Aldrich Inc., MO, EE.UU).

La inducción de calcificación en el modelo de explantes de aorta se consiguió con un medio de alto contenido en fósforo, que fue preparado con DMEM añadiendo fósforo y 3,75 U/ml de fosfatasa alcalina (Promega, WI, EE.UU). Al contrario de las CMLV, los explantes en cultivo no producen fosfatasa alcalina, de ahí la necesidad de suplementar. El medio tiene una concentración de calcio de 1,8 mM y el fosfato se incorpora en una proporción 2:1 de Fosfato Monobásico y Dibásico (Sodium Phosphate, Sigma Aldrich Inc, MO, EE.UU) a una concentración final de 3,3 mM.

Como estímulo inflamatorio, se añadió al medio de cultivo TNF α (Sigma Aldrich Inc, MO, EE UU). Se realizaron curvas dosis-respuesta

con las siguientes concentraciones de TNF α : 1 ng/ml, 10 ng/ml y 100 ng/ml. La concentración de TNF α con la que se obtuvo una mayor respuesta en calcificación sobre los explantes de aorta fue la de 10 ng/ml, tras 9 días de cultivo.

Se estudiaron 5 grupos experimentales: un grupo control, un grupo fosfato al que se le añadió sales de fosfato de sodio para permitir la mineralización. Tres grupos fosfato a los que se le adicionó TNF α (10 ng/ml), dos de los cuales se suplementaron con CTR (10^{-8} M) o PCT ($3 \cdot 10^{-8}$ M).

Tras colocar los explantes de aorta en el medio de cultivo, se mantuvieron en una estufa a 37°C, en una atmósfera húmeda y 5% de CO₂ (Heraeus, Heracell, Alemania) durante 9 días. El medio se cambió cada 2 días.

2.3. CUANTIFICACIÓN DE CALCIO.

Tras finalizar el tiempo del experimento los anillos de aorta se colocaron en placas de 24 pocillos (Becton Dickinson Labware, NJ, EE.UU.) con una solución de lavado preparada con: Cl₂Ca (0,147 g/l), HEPES (0,0476 g/l), NaCl (0,0876 g/l) y NaN₃ (0,002 g/l) (Sigma Aldrich Inc, MO, EE.UU.). Las aortas permanecieron en la solución de lavado durante 48 horas (renovando la solución a las 24 horas), durante este tiempo el tejido estuvo en agitación y a 37°C, en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

A continuación, los explantes se lavaron con agua bidestilada y se secaron con papel de filtro (Filtros ANDIA, Barcelona, España). Posteriormente, se pesaron en una balanza de precisión (Sartorius AG, Alemania) y se desmineralizaron en ácido fórmico al 10% (Panreac Química, SA, Barcelona, España), durante un periodo de 48 horas.

El contenido de calcio en el extracto de ácido fórmico, obtenido de la desmineralización de los explantes de aorta, se determinó colorimétricamente por el método o-Cresoftaleína Complexona (Calcium C Test, WAKO Chemicals GmbH, Neuss, Alemania). El reactivo o-Cresoftaleína Complexona al combinarse con metales alcalinos asume un color rojo púrpura; la 8-hidroxiquinolina presente en el reactivo colorante permite que se desarrolle el color en la presencia de calcio. El contenido de calcio de la muestra fue determinado por espectrofotometría (Biotek Power Wave XS, EE.UU.) a una longitud de onda de 570 nm con lámpara de luz visible. El resultado de la medición del calcio se normalizó con el peso de las aortas, y se expresa como μg de calcio/mg de tejido.

2.4. TINCIÓN VON KOSSA.

Tras concluir los experimentos, los explantes de aorta fueron embebidos en formaldehído al 10% por un tiempo no superior a 24 horas. El casete con la muestra se introdujo en el procesador y seguidamente las muestras fueron incluidas en parafina. Una vez hecho el bloque de parafina, se obtuvieron secciones de 3 μm de grosor que fueron fijadas en portaobjetos previamente tratados y se tiñeron de acuerdo al protocolo Von Kossa descrito anteriormente (apartado 1.5.4)

3. ESTUDIO IN VITRO.

3.1. CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR (CMLV).

Las Células de Músculo Liso Vascular (CMLV) provenientes de aorta humana se obtuvieron de una línea celular (Clonetics- Lonza Walkersville, Inc., EE.UU.). Las células se estudiaron entre el 5º y el 8º pase. El medio utilizado en las células en crecimiento fue SmBm (Smooth muscle Basal medium), suplementado con SmGM-2 SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factors (Clonetics- Lonza Walkersville, Inc., EE.UU.) que contiene: suero fetal bovino (15%), hEGF (Factor de crecimiento epidermal recombinante, humano), insulina, hFGF-B (Factor de crecimiento de fibroblastos β , humano), gentamicina y anfotericina-B. Las células en crecimiento se cultivaron en frascos de 75 cm² (Becton Dickinson Labware, NJ, EE.UU.).

Al alcanzar el 80% de confluencia, las células fueron subcultivadas de la siguiente manera: se retiró el medio de cultivo y las células adheridas al frasco fueron lavadas con suero fisiológico. Posteriormente, las células se levantaron añadiendo una solución de Tripsina/EDTA (Sigma Aldrich Inc, MO, EE.UU.) al frasco y se incubaron durante 5 minutos. Transcurrido el período de incubación, se añadió medio de crecimiento (15% FBS), para inhibir la acción de la tripsina. La suspensión celular fue centrifugada a 1500 rpm, durante 5 minutos, a 20°C. El pellet se resuspendió en medio de crecimiento, y se extrajo una alícuota para contar las células. Para los estudios con CMLV, las células se cultivaron en placas de 6 pocillos (Becton Dickinson Labware, NJ, EE.UU.).

3.1.1. Recuento y viabilidad celular.

Para contar las células en cada subcultivo se añadió 10 μ l de suspensión celular y la misma cantidad de la solución de azul tripan (Sigma Aldrich Inc, MO, EE.UU.), en un vial tipo Eppendorf. Después, se colocaron 10 μ l en la cámara de Neubauer y se procedió al recuento de las células utilizando un microscópio óptico.

La cámara de Neubauer (Figura 20) es una cámara de contaje adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro. Tiene grabadas, en su parte central, dos cuadrículas microscópicas con cuatro áreas de 4x4 cuadrados.

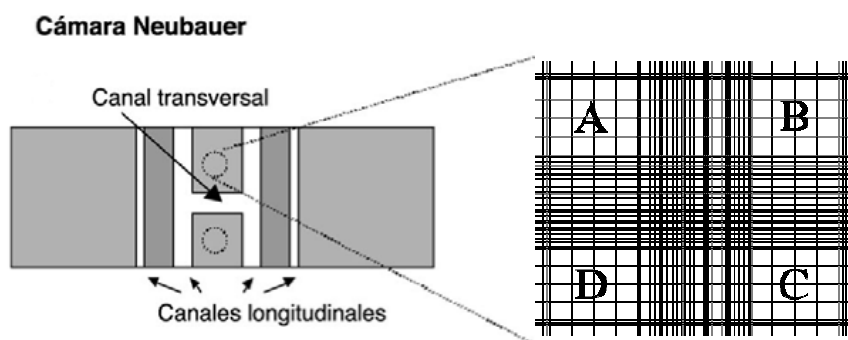


Figura 20. Cámara de Neubauer.

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

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

Si contamos las células que hay en cada área, se puede calcular la concentración de la suspensión celular según la siguiente fórmula:

$$\text{Células/ml} = \text{Media de contajes de las cuatro zonas} \times 10000 \times \text{factor dilución}(2)$$

3.1.2. Cultivo de CMLV.

Cuando las células en cultivo alcanzaron el 80% de confluencia, se inició el tratamiento. Al igual que en los explantes de aorta se estudiaron 5 grupos experimentales: un grupo control, un grupo fosfato al que se le añadió sales de fosfato de sodio a una concentración final de 3,3 mM para permitir la mineralización, y tres grupos fosfato a los que se le adicionó TNF α (10 ng/ml) para promover la inflamación, dos de los cuales se suplementaron además con CTR (10^{-8} M) o PCT ($3 \cdot 10^{-8}$ M).

3.1.3. Cuantificación de calcio.

Al final de cada experimento, el medio de los pocillos fue retirado y los pocillos se lavaron dos veces con PBS (Sigma Aldrich Inc, MO, EE.UU.). Después las células se descalcificaron con HCl 0,6 N (Merck, Darmstadt, Alemania) durante 24 horas, a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

El contenido de calcio en el extracto ácido obtenido se determinó colorimétricamente por el mismo método que en los explantes. Después de la descalcificación, las células fueron solubilizadas con NaOH 0,1 M (Panreac Química, SA, Barcelona, España) y SDS 0,1% (Sigma Aldrich Inc, MO,

EE.UU.), y levantadas por el método de raspado. El contenido de proteína en la suspensión de células obtenida fue cuantificado por el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Munich, Alemania),

➤ Bradford. La determinación de la concentración de proteínas se llevó a cabo mediante el método de Bradford,³⁷ una técnica de cuantificación espectrofotométrica de proteínas, rápida y muy sensible. El método se basa en el cambio de color que experimenta el colorante Azul Coomassie en medio ácido en presencia de proteínas. Las proteínas producen el cambio de la coloración anaranjada del reactivo a una tonalidad azulada cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteína. Se cuantifica midiendo su absorbancia a 595 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro. Los valores obtenidos se comparan con una curva estándar, obteniendo así valores relativos de la concentración de proteínas totales en la muestra.

El contenido de calcio se normalizó con el de proteína de las células, de manera que el contenido de calcio de las células se expresa como μg de calcio/mg de proteína.

3.1.4. Tinción Von Kossa.

Tras finalizar el experimento, las células se lavaron dos veces con agua bidestilada en la misma placa de cultivo. A continuación, se fijaron con una solución de formaldehído y metanol (Panreac Química, SA, Barcelona, España), en una proporción de 1:9 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas nuevamente e incubadas durante una hora en una solución de nitrato de plata al 5% (Sigma Aldrich Inc, MO, EE.UU.), bajo una fuente de luz UV. Después las células se lavaron con agua bidestilada y se incubaron en tiosulfato sódico al 5% (Sigma Aldrich Inc, MO, EE.UU.)

durante 5 minutos para detener la reacción del nitrato de plata. En seguida, las células fueron lavadas dos veces, incubadas con hematoxilina de Mayer (Sigma Aldrich Inc, MO, EE.UU.) durante 3 minutos, y posteriormente lavadas 3 veces.

3.1.5. Expresión génica.

➤ Extracción de ARN total y cuantificación. Para la extracción del ARN nos basamos en el método de Chomczynski y Sacchi⁵⁸ (Figura 21). Este método usa dos fuertes desnaturizantes de proteínas (guanidina y tiocianato). El fenol es un solvente orgánico que se utiliza para separar las proteínas de los ácidos nucleicos. Las proteínas son hidrofóbicas y se encuentran en la fase orgánica. Los ácidos nucleicos están altamente cargados y se encuentran en la fase acuosa.

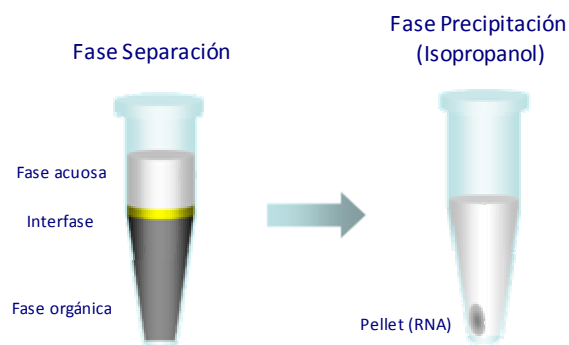


Figura 21. Extracción de RNA total por el método de Chomczynski y Sacchi.

La recolección de las células destinadas a extracción de ARN se realizó de la siguiente manera: tras finalizar los experimentos los pocillos fueron lavados 2

veces con PBS y las células se resuspendieron en 1 ml de Trizol (Tri-Reagent[®], Sigma, MO, USA). A continuación se añadieron 200 µl de cloroformo, se agitó la muestra y se incubó 15 min a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se centrifugó a máxima velocidad durante 15 minutos a 4°C. Terminada la centrifugación se traspasó la fase acuosa a un vial al que previamente se añadió 500 µl de isopropanol, para así precipitar el ARN. Se incubó 1 minuto a -80°C y a continuación se centrifugó a máxima velocidad durante 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet resultante se lavó con 1ml de etanol al 75%, centrifugando a máxima velocidad durante 5 minutos a 4°C, para eliminar los restos de isopropanol. Por último, el ARN obtenido se resuspendió en agua libre en RNAsas, se incubó durante 10 min a 60°C para una mejor disolución del mismo y se cuantificó en un espectrofotómetro (NanoDrop[®] ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer; NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU) midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm.

Cuando el ratio de pureza 260/280 no se encontraba dentro del rango 1,6-2, las muestras fueron descartadas como indicativo de contaminación por proteínas o restos de fenoles. A su vez las muestras fueron tratadas con ADNasa (Sigma Aldrich Inc, MO, EE.UU.) para minimizar la contaminación por ADN y así evitar todo tipo de amplificación inespecífica en la RT-PCR. Por cada µg de ARN se añadió 1µl de buffer de reacción 10X, 1µl de ADNasa y agua bidestilada hasta completar un volumen final de 10µl y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se trató con 1µl de la solución de parada y seguidamente se incubó durante 10 minutos a 70°C para inactivar la enzima. Para comprobar la integridad del ARNm obtenido, se procedió a separar la solución que contenía el ARN en un gel de agarosa desnaturalizante.

La muestra se conservó a -80°C hasta su uso.

➤ RT-PCR y análisis de la expresión génica. La RT-PCR (Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa), es una técnica muy sensible que permite la amplificación de una cantidad pequeña de moléculas de ARNm con gran especificidad, mediante la transcripción reversa del ARN a ADNc, que posteriormente es amplificado.

Se utilizó el sistema *Lightcycler* 480 (Figura 22) de Roche (Roche Molecular Biochemicals; Indianápolis, IN, EE.UU.), que posibilita la cuantificación de ADN sintetizado “de novo” a partir de ARN, y la identificación de productos por su temperatura de fusión en una misma reacción. Esta técnica está basada en la monitorización de la PCR usando técnicas de fluorescencia. Sybr-Green I es un fluorocromo que se intercala en la molécula sintetizada de ADN y permite la detección de fluorescencia.



Figura 22. Sistema LightCycler 480.

La RT-PCR se llevó a cabo en un solo paso usando el kit *QuantiTect SYBR Green™ RT-PCR* (Qiagen, Hilden, Alemania). Para un volumen final de $20\ \mu\text{l}$

se utilizaron 100 ng de ARN total (un exceso de ARN puede provocar inespecificidad e incluso inhibición de la reacción). La mezcla de reacción contenía 150 nM de cada *primer*, 10 μ l de *SYBR Green* PCR master mix y 0,2 μ l de RT (retrotranscriptasa). El ADNc se sintetizó mediante la incubación en el termociclador a 50°C durante 20 min. Los híbridos ADNc/ARNm se desnaturalizaron a 95°C y 15 min. La amplificación se llevó a cabo durante 50 ciclos a 95°C durante 15 s (desnaturalización), 30 s a 60°C (*annealing*), seguido de 30 s a 72°C (extensión). La detección de la fluorescencia del producto se realizó al final de cada ciclo de extensión a 72°C. Para confirmar la especificidad de la amplificación, se analizaron las curvas de *melting* o de fusión de los productos de la PCR desde 65 a 95°C.

Síntesis de ADNc	50°C	20 minutos	4,4°C/s
Activación	95°C	15 minutos	4,4°C/s
Amplificación	95°C	15 segundos	4,4°C/s
	60°C	30 segundos	2,2°C/s
	72°C	30 segundos	4,4°C/s
Melting	95°C	1 segundo	4,4°C/s
	65°C	15 segundos	2,2°C/s
Cooling	40°C	30 segundos	2,2°C/s

Tabla 5. Características de la RT-PCR.

Las muestras de ARNm se analizaron al menos tres veces en condiciones similares de RT-PCR. Se incluyeron controles negativos, que contenían agua en lugar de ARN, para confirmar que las muestras no estaban contaminadas. La cuantificación de la expresión relativa se determinó mediante una curva estándar y se normalizó con el gen de la β - Actina.

Las secuencias de los *primers* usados en este estudio se diseñaron con los programas Oligo 6.0 y Primers 3.0.

Primer directo o sentido Cbfa1:

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

Primer reverso o antisentido Cbfa1:

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

Primer directo o sentido β -Actina:

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

Primer reverso o antisentido β -Actina:

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

Primer directo o sentido BMP2:

5'-AGG.AGG.CAA.AGA.AAA.GGA.ACG.GAC-3'

Primer reverso o antisentido BMP2:

5'-GGA.AGC.AGC.ACC.GCT.AGA.AGA.CGA-3'

Primer directo o sentido Dlx5:

5'-CAA CTT TGC CCG AGT CTT C-3'

Primer reverso o antisentido Dlx5:

5'-GTT GAG AGC TTT GCC ATA GG-3'

3.2. CÉLULAS MONONUCLEARES.

Para aislar el efecto de los análogos de la vitamina D sobre las células del sistema inmune, se realizaron una serie de experimentos en células mononucleares estimuladas con LPS a las cuales se le adicionó CTR o PCT.

3.2.1. Aislamiento de células mononucleares.

El aislamiento de células mononucleares se realizó a partir de sangre arterial heparinizada de ratas sanas, por centrifugación en gradiente de densidad según la técnica descrita por Böyum ³⁶ utilizando ficol. El ficol es un polisacárido sintético de alto peso molecular (400 kDa) con un gran contenido en grupos hidroxilo y una buena solubilidad en medios acuosos; no presenta grupos ionizables que puedan servir de unión a las muestras y tiene una viscosidad elevada. Debido a sus propiedades, se utiliza para la separación de células y partículas subcelulares mediante centrifugación zonal. Así, según se observa en la figura 23, se pueden separar las células mononucleares del resto de las células sanguíneas.

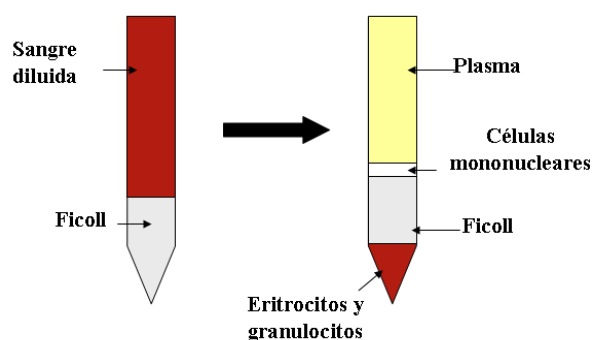


Figura 23. Centrifugación en gradiente de densidad.

3.2.2. Cultivo de células mononucleares.

Las células mononucleares de sangre arterial fueron recolectadas, lavadas y resuspendidas en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (10%), conteniendo 2mM L-glutamina (Sigma), 100 U/ml de penicilina (Penilevel, Laboratorios ERN, SA, Barcelona, España) y 100 mg/ml de estreptomycin (Reig Jofré, SA, Barcelona, España), y sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad de 1×10^6 células/ml medio.

Las células fueron estimuladas durante 24h con distintas dosis de LPS (10 y 100 ng/ml). Pasadas las 24 h, los sobrenadantes fueron recolectados y centrifugados a 1800 rpm durante 10 minutos a 4°C para eliminar restos celulares. En el sobrenadante se cuantificaron los niveles de IL-1 α , MCP-1 y TNF α utilizando un kit comercial FlowCytomix (Bender MedSystems Inc) cuantificable mediante citometría de flujo (apartado 1.4.2).

En un estudio posterior se evaluó el efecto antiinflamatorio de los análogos de la vitamina D (CTR y PCT), en este modelo experimental, adicionando al medio de cultivo de las células mononucleares LPS a una concentración de 10 ng/ml suplementado con dosis crecientes de CTR (10^{-7} mM, 10^{-8} mM, 10^{-9} mM) o PCT (3×10^{-7} mM, 3×10^{-8} mM, 3×10^{-9} mM). Pasadas 24 h, se recolectaron los sobrenadantes y se centrifugaron a 1800 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se utilizó para la cuantificación de IL-1 α , MCP-1 y TNF α por inmunoensayo tipo sándwich cuantificable mediante citometría de flujo de acuerdo al protocolo descrito anteriormente (apartado 1.4.2).

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

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

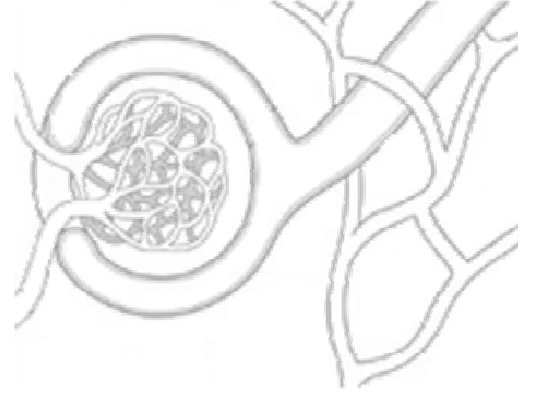
Para la comparación de medias entre 3 o más grupos se usó el análisis de varianza (ANOVA). Si el test ANOVA mostraba diferencias estadísticamente significativas, posteriormente se aplicaba un test post-hoc, la prueba Fisher LSD, para determinar diferencias entre grupos. Se consideraron significativos aquellos valores de $P < 0,05$.

Para la comparación entre medias entre dos grupos pertenecientes al mismo intervalo de tiempo, se utilizó una prueba t de Student. El nivel de significación estadística se fijó en $P < 0,05$.

Todos los resultados se presentan como media \pm error estándar de la media ($X \pm$ ESM).

5. REDACCIÓN Y PRESENTACIÓN GRÁFICA

Toda la redacción de este trabajo, así como la elaboración de las gráficas y figuras, han sido elaboradas con el software incluido en el paquete informático de Microsoft Office[®] versión 2007 (Microsoft Corporation, USA) bajo el sistema operativo Microsoft Windows XP Professional[®] (Microsoft Corporation, USA).



RESULTADOS

1. ESTUDIO IN VIVO.

En el procedimiento experimental se emplearon ratas Wistar sometidas a nefrectomía 5/6 (Nx 5/6), que fueron alimentadas durante 15 días con una dieta con elevado contenido en fósforo (0,9%) y tratadas con dosis crecientes de LPS y con análogos de la vitamina D (CTR y PCT). La supervivencia en los diferentes grupos experimentales fue cercana al 100%, sólo hubo pérdidas esporádicas en algunos de ellos, sin que se observasen diferencias significativas entre grupos.

1.1. BIOQUÍMICA

En la Tabla 6 se muestran los valores de bioquímica sanguínea. Como podemos observar el valor de creatinina fue significativamente superior en todos los grupos de ratas Nx 5/6 con respecto al grupo de ratas con función renal normal (control) lo que confirma la inducción de la insuficiencia renal con este modelo de nefrectomía. La concentración plasmática de creatinina aumentó de forma significativa en el grupo de ratas Nx 5/6 tratado con LPS + CTR cuando lo comparamos con el grupo Nx 5/6 + vehículo. Sin embargo, el grupo de ratas al que se le administró LPS + PCT no experimentó este aumento.

En las ratas urémicas se apreció un descenso significativo en los valores plasmáticos de calcio iónico, excepto en el grupo tratado con LPS + CTR en el que los niveles de calcio iónico en plasma fueron similares a los del grupo control.

La concentración de fósforo plasmático estuvo consistentemente elevada en el grupo de ratas Nx 5/6 + vehículo. Los valores de fósforo más elevados se

observaron en el grupo de ratas Nx 5/6 tratado con LPS + CTR, alcanzando niveles significativamente superiores con respecto al grupo LPS + PCT.

Los valores de PTH se elevaron de forma significativa en todos los grupos de ratas Nx 5/6 con respecto a las ratas con función renal intacta, lo que evidencia la existencia de un HPT 2° en las ratas sometidas a nefrectomía. El tratamiento con ambos análogos de la vitamina D, PCT y CTR, redujo de forma significativa la concentración de hormona paratiroidea circulante, aunque el CTR parece disminuirla un poco más.

	Creatinina (mg/ml)	Ca Iónico (mmol/l)	Fósforo (mg/dl)	PTH (pg/ml)
Control	0,46±0,03	1,20±0,05	6,20±0,30	30,5±6,5
Nx 5/6 + vehículo	0,98±0,06 ^{a,b}	1,03±0,04 ^a	8,95±0,44 ^a	311,4±39,4 ^a
Nx 5/6 + LPS	1,04±0,05 ^{a,b}	1,00±0,03 ^a	9,48±0,44 ^a	352,1±44,2 ^a
Nx 5/6 + LPS + CTR	1,21±0,14 ^{a,b,c,d}	1,16±0,03 ^{c,d}	11,71±1,13 ^{a,b,c,d}	91,6±20,0 ^{c,d}
Nx 5/6 + LPS + PCT	0,93±0,07 ^{a,b}	1,08±0,03 ^a	9,31±0,70 ^{a,b}	141,2±62,3 ^{c,d}

Tabla 6. Valores de bioquímica sanguínea (media ± ESM) en los diferentes grupos experimentales de ratas. ^a p<0,05 vs control, ^b p<0,05 vs Nx 5/6 + LPS + CTR, ^c p<0,05 vs Nx 5/6 + vehículo, ^d p<0,05 vs Nx 5/6 + LPS.

1.2. CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS

➤ TNF α (Figura 24). En el grupo de animales Nx 5/6 + vehículo se observó un leve aumento de los niveles de TNF α con respecto al grupo control (68,7 ± 19,8 vs 59,5 ± 10,6 pg/ml, p = 0,723), aunque las diferencias no llegaron a alcanzar significación estadística. Esta elevación de TNF α pudiera estar asociado al estado urémico de estos animales.

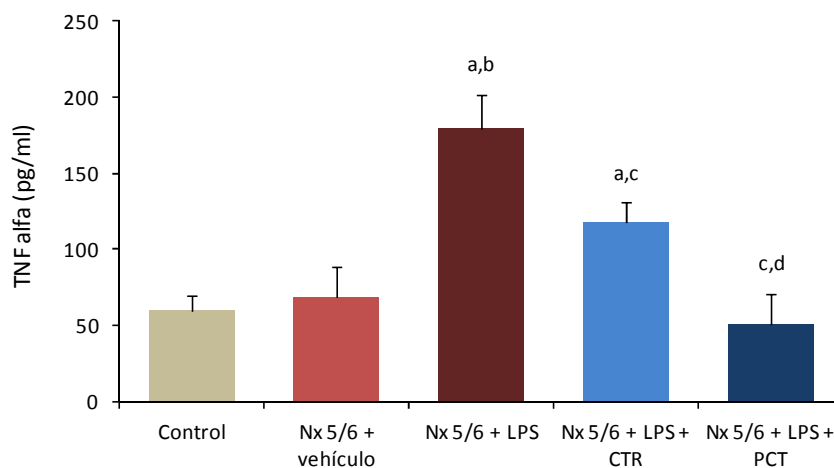


Figura 24. Valores de TNF α en los diferentes grupos de ratas: control, nefrectomizadas con vehículo (Nx 5/6 + vehículo), nefrectomizadas tratadas con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (Nx 5/6 + LPS), nefrectomizadas tratadas con LPS y calcitriol (Nx5/6 + LPS + CTR) y nefrectomizadas tratadas con LPS y paricalcitol (Nx5/6 + LPS + PCT). ^a p<0,05 vs control, ^b p<0,05 vs Nx 5/6 + vehículo, ^c p<0,05 vs Nx 5/6 + LPS, ^d p<0,05 vs Nx 5/6 + LPS + CTR.

La administración de LPS a las ratas urémicas elevó significativamente los valores plasmáticos de TNF α ($179,6 \pm 21,6$ pg/ml).

El tratamiento con ambos análogos de la vitamina D disminuyó de manera significativa la concentración de TNF α , siendo este descenso más acentuado en el grupo de ratas tratadas con PCT. De hecho, los valores de TNF α del grupo de ratas urémicas tratadas con LPS + PCT ($51,6 \pm 12,1$ pg/ml) son similares al grupo de ratas urémicas que no recibieron tratamiento con LPS.

➤ MCP-1 (Figura 25). La concentración de MCP-1 aumentó significativamente con la uremia, así en las ratas control encontramos unos niveles de $205,9 \pm 14,2$ pg/ml que son significativamente inferiores a los recogidos en las ratas nefrectomizadas tratadas con vehículo ($411 \pm 18,2$ pg/ml).

pg/ml). La administración de LPS incrementó de manera significativa los niveles de MCP-1 ($482,4 \pm 26,4$ pg/ml).

Aunque MCP-1 disminuye al administrar ambos análogos de la vitamina D, sólo encontramos diferencias significativas en el grupo de ratas urémicas tratadas con LPS + PCT, en el que se observó una disminución estadísticamente significativa con respecto al grupo Nx 5/6 + LPS + CTR ($387,3 \pm 34,5$ vs $463,9 \pm 17,5$ pg/ml respectivamente, $p= 0.022$).

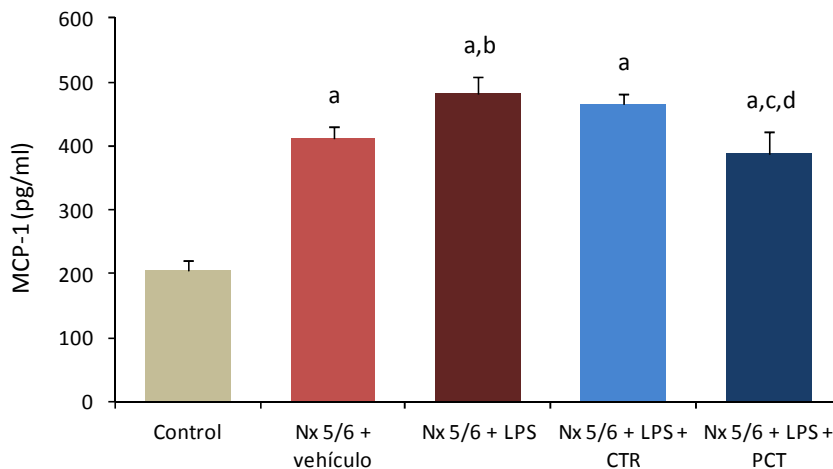


Figura 25. Valores de MCP-1 en los diferentes grupos de ratas: control, nefrectomizadas con vehículo (Nx 5/6 + vehículo), nefrectomizadas tratadas con lipopolisacarido de *Escherichia coli* (Nx 5/6 + LPS), nefrectomizadas tratadas con LPS y calcitriol (Nx5/6 + LPS + CTR) y nefrectomizadas tratadas con LPS y paricalcitol (Nx5/6 + LPS + PCT). ^a $p<0,05$ vs control, ^b $p<0,05$ vs Nx 5/6 + vehículo, ^c $p<0,05$ vs Nx 5/6 + LPS, ^d $p<0,05$ vs Nx 5/6 + LPS + CTR.

➤ IL-1 α (Figura 26). La uremia produjo un aumento no significativo en los niveles de IL-1 α (grupo control $4,1 \pm 1,39$ vs $18,7 \pm 5,8$ pg/ml en el grupo 5/6Nx+ vehículo, $p= 0.082$), y la administración de LPS a los animales

urémicos produjo un incremento significativo de ésta ($24,2 \pm 7,1$ pg/ml) con respecto al grupo control.

De nuevo, se observó una tendencia de ambos análogos de la vitamina D a disminuir los niveles de esta citoquina circulante, aunque el descenso más marcado lo experimentó el grupo de ratas urémicas tratadas con LPS + PCT ($16,5 \pm 2,7$ pg/ml), sin embargo este descenso no llegó a tener significación estadística como se observa en la figura 26.

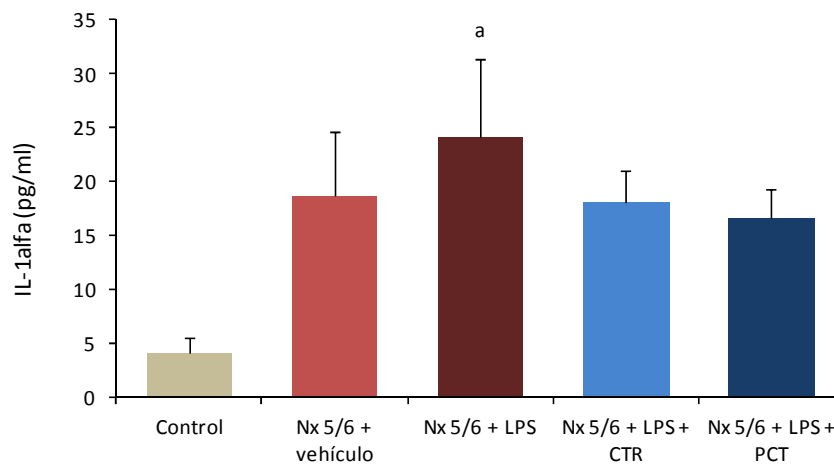


Figura 26. Valores de IL-1 α en los diferentes grupos de ratas: control, nefrectomizadas con vehículo (Nx 5/6 + vehículo), nefrectomizadas tratadas con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (Nx 5/6 + LPS), nefrectomizadas tratadas con LPS y calcitriol (Nx5/6 + LPS + CTR) y nefrectomizadas tratadas con LPS y paricalcitol (Nx5/6 + LPS + PCT). ^a p<0,05 vs control.

1.3. CONTENIDO MINERAL EN AORTA.

En las ratas control el depósito mineral de calcio en la pared arterial fue relativamente bajo (Figura 27). En el grupo de ratas Nx 5/6 + vehículo se observó un leve incremento en el contenido mineral de calcio pero no se apreciaron diferencias significativas con respecto al grupo control. Las ratas urémicas que recibieron LPS aumentaron de forma significativa los niveles de calcio en aorta con respecto a los grupos control y Nx 5/6 + vehículo ($1,6 \pm 0,1$ vs $0,8 \pm 0,1$ mg/g de tejido).

El tratamiento con CTR produjo un incremento significativo del contenido mineral de calcio en aorta ($3,2 \pm 0,8$ mg/g de tejido). A diferencia del CTR, el tratamiento con PCT no aumentó los niveles de calcio aórtico ($1,6 \pm 0,6$ mg/g de tejido).

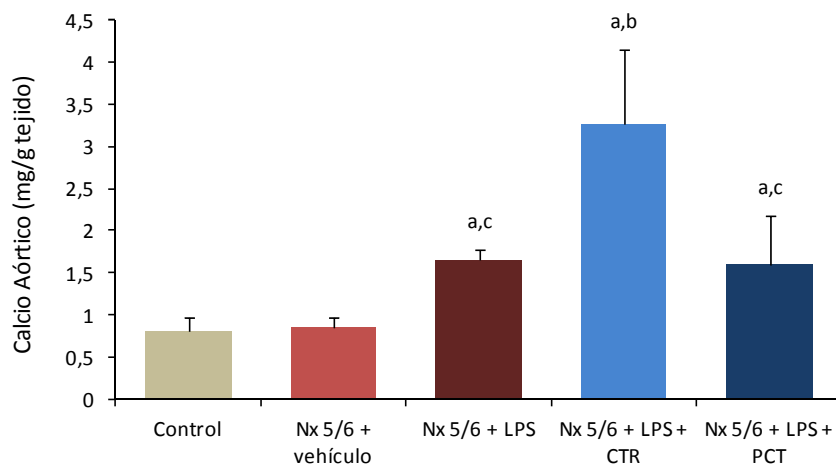


Figura 27. Contenido mineral de calcio en aorta. ^a $p < 0,05$ vs Nx 5/6 + vehículo, ^b $p < 0,05$ vs Nx 5/6 + LPS, ^c $p < 0,05$ vs Nx 5/6 + LPS + CTR.

1.4. HISTOLOGÍA AÓRTICA.

El estudio histológico de la calcificación mediante la tinción de Von Kossa corroboró los resultados obtenidos tras la cuantificación del depósito mineral de sales cálcicas en la aorta (Figura 28).

En los grupos de ratas con bajo contenido mineral de calcio fue difícil distinguir el pigmento marrón indicativo de mineralización. El tratamiento con LPS + CTR reveló una extensa calcificación en la capa media vascular, mientras que en el grupo de ratas urémicas a las que se le administró LPS + PCT no se apreció un depósito mineral visible.

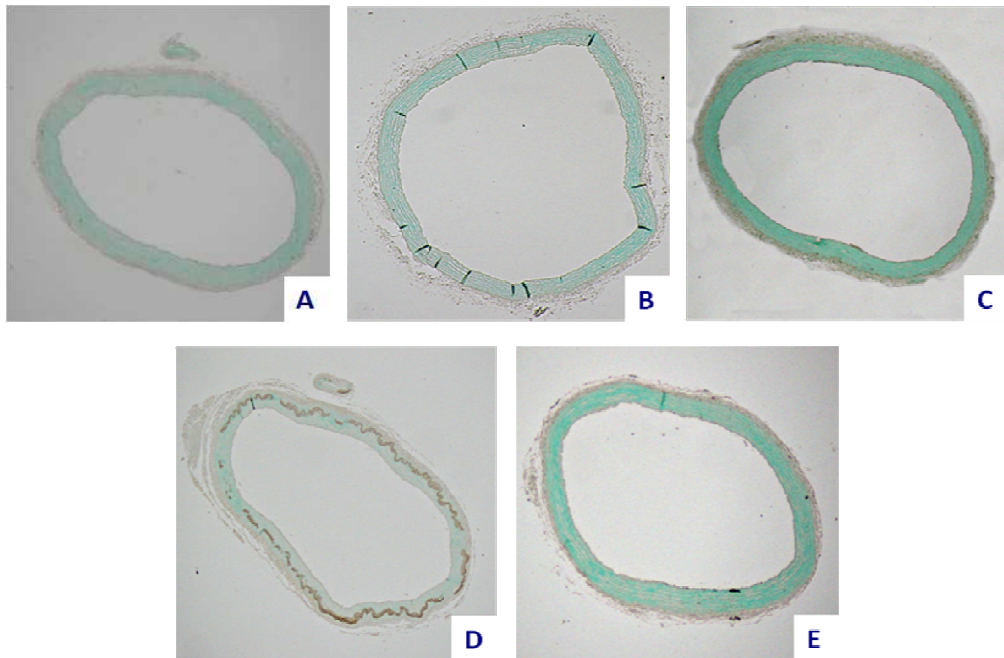


Figura 28. Tinción Von Kossa aorta. A) Control, B) Nx 5/6 + vehículo, C) Nx 5/6 + LPS, D) Nx +5/6 + LPS + CTR y E) Nx 5/6 + LPS + PCT.

1.5. INMUNOHISTOQUIMICA.

Para identificar un posible infiltrado de células inflamatorias en el tejido vascular, tras el sacrificio se realizó inmunohistoquímica para CD3 y CD68 y la contratinción Hematoxilina-Eosina (H-E) de aorta torácica de ratas urémicas tratadas con LPS (Figura 29).

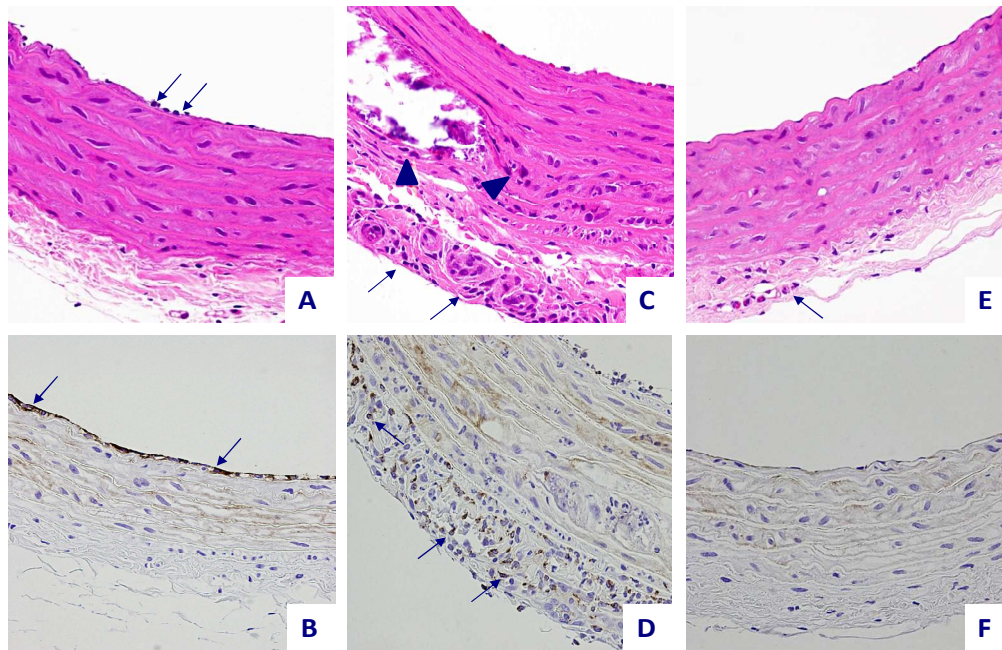


Figura 29. Inmunohistoquímica para CD68 (fila inferior) y H-E (fila superior) de aortas de ratas nefrectomizadas tratadas con LPS (A, B), con LPS + CTR (C, D) y con LPS + PCT (E, F).

En el grupo de ratas urémicas que recibieron LPS se puede observar un infiltrado de células mononucleares CD3⁻ y CD68⁺ en la túnica íntima. El tratamiento con LPS + CTR produjo una reacción inflamatoria más intensa, con infiltrado mononuclear presente tanto en la adventicia como en las proximidades de los focos de calcificación. Estas células inflamatorias fueron

positivas para CD 68. En contraste, el grupo de ratas urémicas tratadas con LPS + PCT mostraron mínimos signos de inflamación en la pared arterial, observándose ocasionalmente células inflamatorias perivasculares cerca de la túnica adventicia.

2. ESTUDIO EX VIVO.

Para llevar a cabo este estudio, se utilizaron anillos en cultivo procedentes de aorta torácica de ratas Wistar sanas. El primer objetivo propuesto fue evaluar el papel de la inflamación en la calcificación vascular, para lo cual se realizó una curva dosis-respuesta con distintas concentraciones de TNF α , que oscilaron entre 1 y 100 ng/ml. Una vez establecida la dosis adecuada de TNF α se analizó el papel de los análogos de la vitamina D (CTR y PCT) en calcificación vascular asociada a inflamación.

2.1. CONTENIDO MINERAL DEL CALCIO.

Los explantes de aorta cultivados con concentraciones crecientes de TNF α durante 9 días calcificaron de una manera dosis-dependiente (Figura 30).

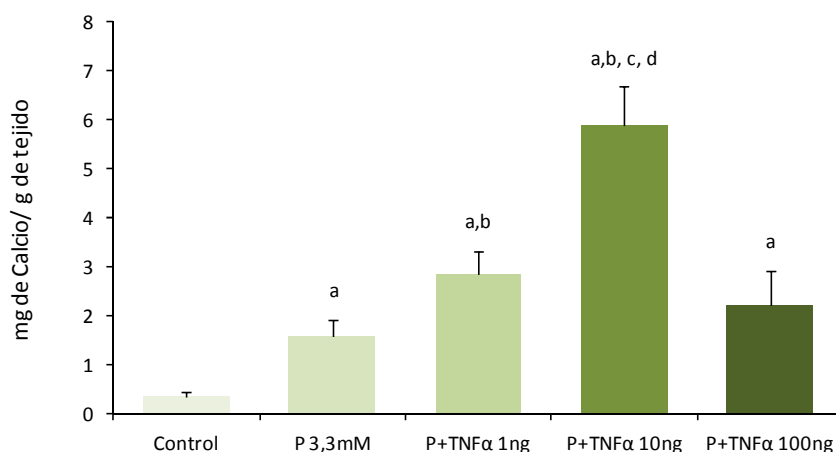


Figura 30. Contenido mineral de calcio en explantes de aorta cultivados con concentraciones crecientes de TNF α durante 9 días. ^a p<0,05 vs Control, ^b p<0,05 vs P 3,3mM, ^c p<0,05 vs P + TNF α 1ng, ^d p<0,05 vs P + TNF α 100 ng.

La calcificación obtenida en los anillos de aorta a los que se adicionó TNF α a 1 ng/ml y 10 ng/ml ($2,9 \pm 0,5$, $5,9 \pm 0,8$ μg de calcio/mg de tejido, respectivamente) fue significativamente ($p < 0,05$) más alta que la del grupo fosfato ($1,6 \pm 0,3$ μg de calcio/mg de tejido). Cuando se utilizó la concentración de 100 ng/ml TNF α los niveles de calcificación ($2,2 \pm 0,7$ μg de calcio/mg de tejido) se mantuvieron similares a los del grupo fosfato, encontrándose únicamente diferencias significativas con respecto al grupo control ($0,4 \pm 0,1$ μg de calcio/mg de tejido). Por tanto se eligió la dosis de 10 ng/ml de TNF α para trabajar en el siguiente grupo de experimentos con explantes de aorta.

En los explantes de aorta (Figura 31) incubados con alto fósforo (3,3 mM) durante 9 días se observó un incremento significativo ($p < 0,01$) en el contenido mineral de sales cálcicas ($3,1 \pm 0,3$ mg /g de tejido) cuando se comparó con el grupo control de anillos aórticos incubados sin alto fósforo ($0,5 \pm 0,1$ mg/g de tejido). La adición de TNF α al medio de cultivo resultó en un mayor aumento

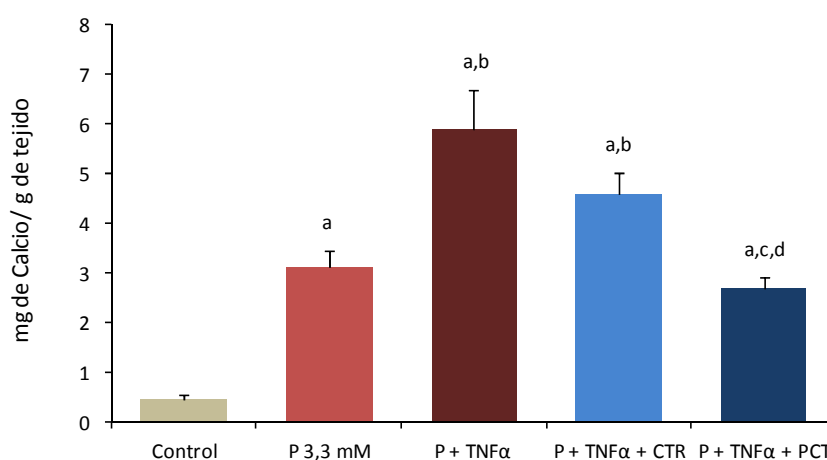


Figura 31. Contenido mineral de calcio en explantes de aorta incubados con TNF α 10 ng/ml y suplementados con CTR (10^{-8} mM) o PCT ($3 \cdot 10^{-8}$ mM). ^a $p < 0,05$ vs control, ^b $p < 0,05$ vs P 3,3 mM, ^c $p < 0,05$ vs P + TNF α 10 ng/mL, ^d $p < 0,05$ vs P+ TNF α + CTR.

de los niveles de calcio aórtico ($5,9 \pm 0,8$ mg/g de tejido, $p=0,03$ versus P 3,3 mM). Cuando se suplementó el medio con CTR el depósito mineral de calcio experimentó un leve descenso, aunque no llegó a ser significativo ($4,6 \pm 0,4$ mg/g de tejido). En cambio, la adición de PCT disminuyó de forma significativa la concentración de calcio aórtico ($2,7 \pm 0,2$ mg/g de tejido) con respecto a su grupo homólogo tratado con CTR.

2.2. TINCIÓN VON KOSSA.

La histología de los explantes de aorta confirmó los datos obtenidos mediante la cuantificación de calcio. En la Figura 9 podemos observar el depósito mineral de sales cálcicas (color marrón oscuro) en aquellos grupos en los que el contenido mineral de calcio fue mayor (Figura 32).

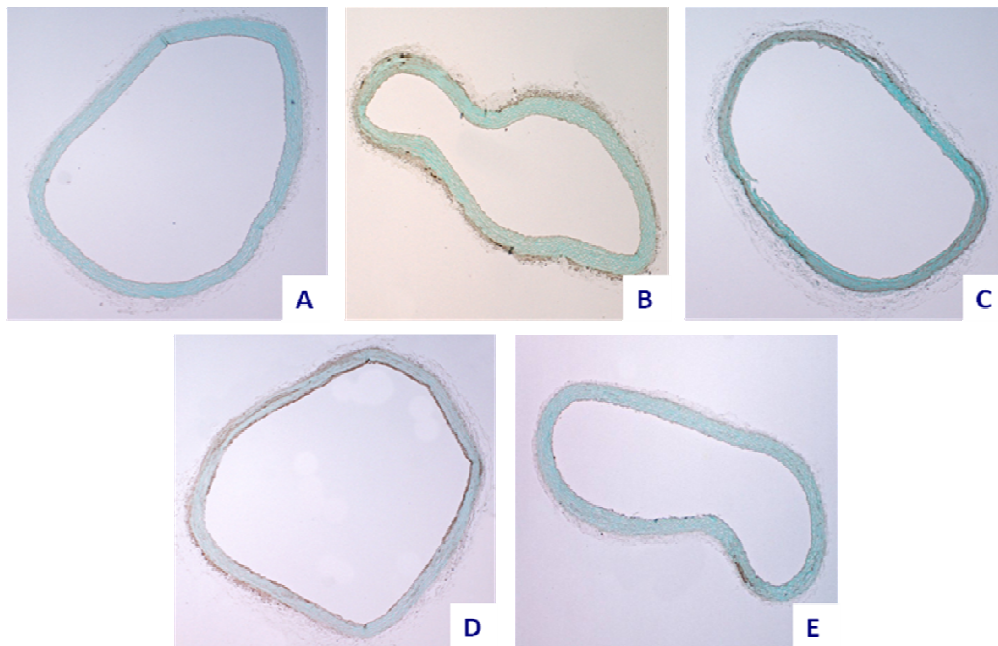


Figura 32. Tinción Von Kossa en explantes de aorta. A) Control, B) P 3,3 mM, C) P + TNF α 10ng/ml, D) P + TNF α + CTR y E) P + TNF α + PCT.

3. ESTUDIO IN VITRO

3.1. CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR.

Los estudios in vitro se llevaron a cabo con una línea de células de músculo liso vascular procedentes de aorta humana. Con los explantes de aorta tuvimos la ventaja de mantener la arquitectura tisular intacta lo que favoreció que el modelo de anillos de aorta se asemejara más a un organismo vivo. Sin embargo, con el modelo de CMLV en monocapa eliminamos posibles interferencias con otros tipos celulares y además nos permitió evaluar la transformación fenotípica, de CMLV a células de estirpe osteogénica, mediante el estudio de la expresión génica de los marcadores osteoblásticos: Runx2, BMP-2 y Dlx5 por RT-PCR.

3.1.1. Contenido mineral de calcio.

En las CMLV la calcificación inducida por TNF α en concentraciones crecientes (Figura 33) fue similar a la obtenida en los explantes de aorta.

Las CMLV en cultivo durante 9 días con concentraciones de TNF α por encima de 1 ng/ml presentaron un grado de calcificación más pronunciado (TNF α 1 ng/ml $3,6 \pm 0,4$ μ g de calcio/mg de proteína; TNF α 10 ng/ml $7,4 \pm 1,4$ μ g de calcio/mg de proteína), en comparación con el grupo de fosfato sin TNF α ($2,01 \pm 0,1$ μ g de calcio/mg de proteína).

En la figura 34 observamos que las CMLV incubadas con alto fósforo aumentaron significativamente el contenido mineral de calcio ($2,9 \pm 0,2$ μ g/mg) con respecto a las del grupo control sin alto fósforo ($0,3 \pm 0,07$ μ g/mg). La adición de TNF α a las células indujo un incremento estadísticamente significativo en los niveles de calcio ($7,3 \pm 0,9$ μ g/mg de proteína) con respecto tanto al grupo control como al grupo de alto fósforo.

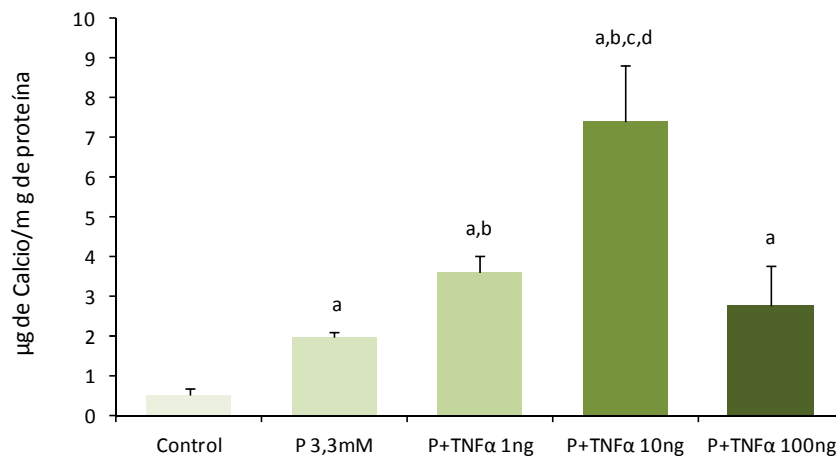


Figura 33. Contenido mineral de calcio en CMLV cultivadas con concentraciones crecientes de TNF α durante 9 días. ^a p<0,05 vs Control, ^b p<0,05 vs P 3,3mM, ^c p<0,05 vs P + TNF α 1ng, ^d p<0,05 vs P + TNF α 100ng.

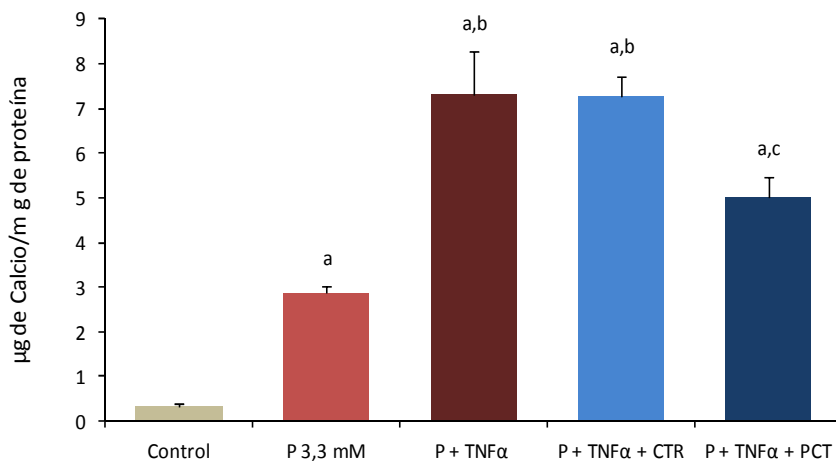


Figura 34. Contenido mineral de calcio en CMLV incubadas con TNF α 10 ng/ml y suplementados con CTR (10^{-8} mM) o PCT ($3 \cdot 10^{-8}$ mM). ^a p<0,05 vs control, ^b p<0,05 vs P 3,3 mM, ^c p<0,05 vs P + TNF α 10 ng/mL, ^d p<0,05 vs P+ TNF α + CTR.

Como sucedió en los explantes de aorta, el tratamiento con análogos de la vitamina D disminuyó su contenido mineral en calcio, pero en el caso del grupo con CTR el descenso fue muy leve ($7,3 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) mientras que el grupo suplementado con PCT experimentó un marcado y significativo descenso de los niveles de calcio ($5,03 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína).

3.1.2. Tinción Von Kossa.

El estudio de la calcificación mediante la tinción de Von Kossa en los cultivos de CMLV ratificó los resultados obtenidos de la cuantificación del contenido mineral de calcio.

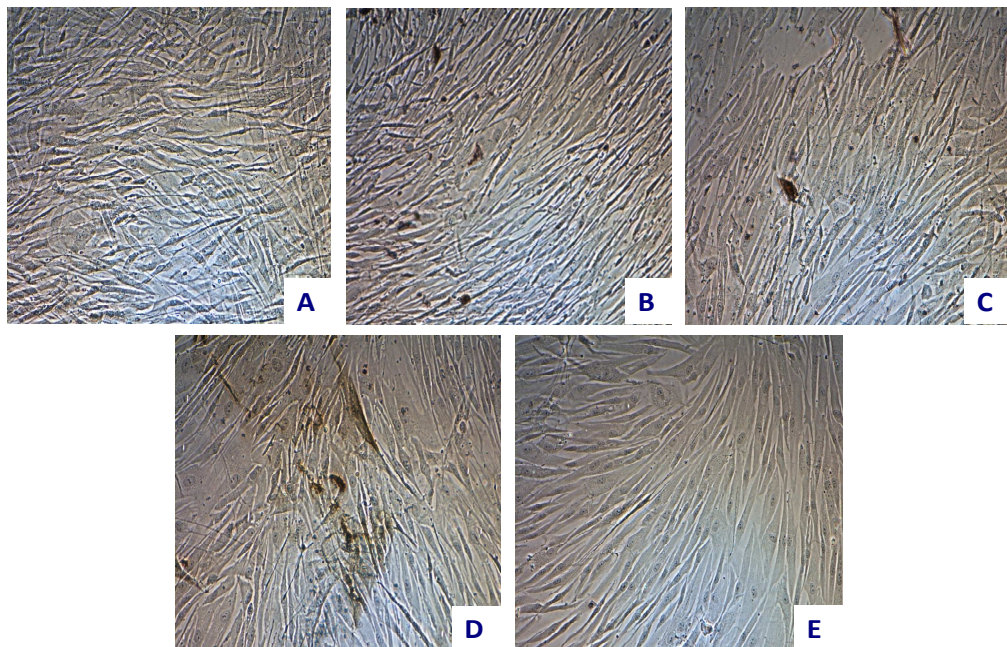


Figura 35. Tinción Von Kossa en CMLV. Control (A), P 3,3 mM (B), P + TNF α (C), P + TNF α + CTR (D) y P + TNF α + PCT (E).

La tinción Von Kossa (Figura 35) después de 9 días de cultivo confirmó que las CMLV cultivadas con P 3,3 mM exhiben un extenso depósito mineral y presentan alteraciones en el patrón de crecimiento asociadas a la transición fenotípica hacia células de estirpe osteoblástica, como la formación de nódulos. Los depósitos minerales y las anomalías en el crecimiento se acentuaron con la adición de TNF α al medio de cultivo y con TNF α + CTR. Este tipo de alteraciones no se observaron en los cultivos tratados con PCT.

3.1.3. Expresión génica.

➤ **Runx2.** Como se puede apreciar en la Figura 36, la expresión génica de Runx2 aumentó de forma significativa en CMLV cultivadas con alto fósforo durante 9 días ($1,3 \pm 0,09$ ARNm Runx2/ β actina) comparado con el grupo control ($0,9 \pm 0,06$ ARNm Runx2/ β actina).

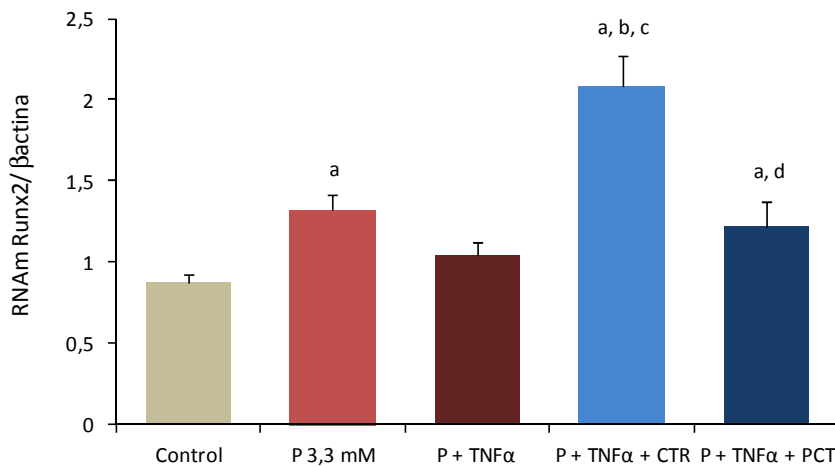


Figura 36. ARNm Runx-2/ β actina en CMLV. ^a $p < 0,05$ vs control, ^b $p < 0,05$ vs P 3,3 mM, ^c $p < 0,05$ vs P + TNF α , ^d $p < 0,05$ vs P + TNF α + CTR.

Sin embargo, la adición de $\text{TNF}\alpha$ al medio de cultivo no provocó cambios significativos en la expresión génica de este marcador osteogénico. Como era de esperar, cuando se cultivaron CMLV con CTR, la expresión de Runx2 incrementó significativamente ($2,08 \pm 0,2$ ARNm Runx2/ β actina, $p < 0,05$) en comparación con el resto de grupos estudiados. Los niveles de Runx2 encontrados en el grupo con PCT no experimentaron cambios significativos con respecto del grupo en las mismas condiciones de P sin el análogo de la vitamina D ($1,2 \pm 0,2$ vs $1,3 \pm 0,09$ ARNm Runx2/ β actina)

BMP2. En la Figura 37 podemos observar como los niveles de ARNm de BMP2 aumentaron significativamente en las CMLV incubadas con alto fósforo comparadas con el grupo control ($2,9 \pm 0,3$ vs $1,1 \pm 0,2$ ARNm BMP2/ β actina, $p = 0,013$) y este incremento se potenció con la adición de $\text{TNF}\alpha$ ($3,5 \pm 0,8$ ARNm BMP2/ β actina).

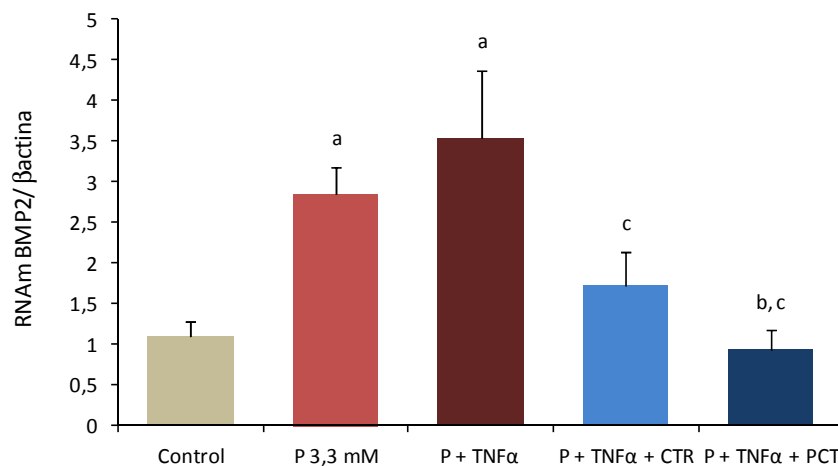


Figura 37. ARNm BMP2/ β actina en CMLV. ^a $p < 0,05$ vs control, ^b $p < 0,05$ vs P 3,3 mM, ^c $p < 0,05$ vs P + $\text{TNF}\alpha$.

La suplementación del medio de cultivo con ambos análogos de la vitamina D disminuyó de forma significativa la expresión génica de este marcador, aunque este descenso fue más acentuado en el grupo de CMLV incubadas con PCT ($0,9 \pm 0,3$ ARNm BMP2/ β actina) que con CTR ($1,7 \pm 0,4$ ARNm BMP2/ β actina).

➤ **Dlx5.** En cuanto a la expresión génica de Dlx5 (Figura 38), se observó un aumento progresivo en CMLV cultivadas con alto fósforo ($1,6 \pm 0,3$ ARNm Dlx5/ β actina) y con $\text{TNF}\alpha$ ($2,04 \pm 0,6$ ARNm Dlx5/ β actina) respectivamente, aunque no llegó a ser estadísticamente significativo.

De nuevo ambos análogos de la vitamina D lograron disminuir los niveles de ARNm de Dlx5 de manera significativa con respecto al grupo de CMLV tratadas con $\text{TNF}\alpha$ ($p < 0,05$), siendo este descenso más acentuado en el grupo con PCT ($0,6 \pm 0,2$ ARNm Dlx5/ β actina) que en el grupo con CTR ($0,9 \pm 0,3$ ARNm Dlx5/ β actina).

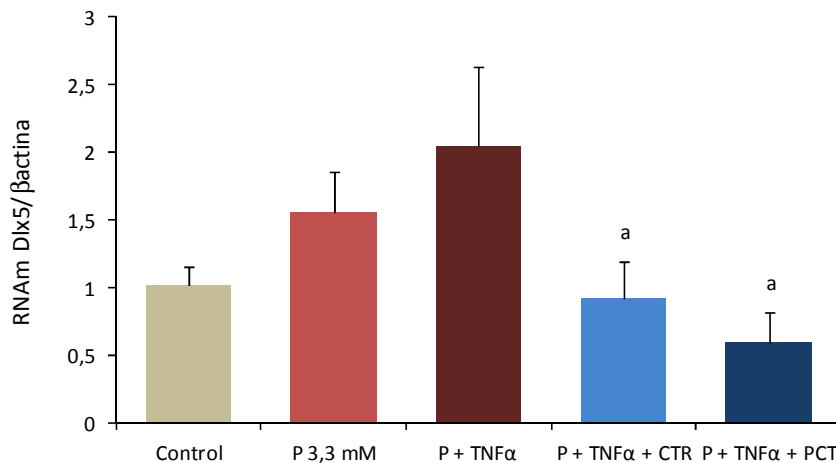


Figura 38. ARNm Dlx5/ β actina en CMLV. ^a $p < 0,05$ vs P + $\text{TNF}\alpha$.

3.2. MODULACION DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA POR ANALOGOS DE LA VITAMINA D EN CÉLULAS MONONUCLEARES.

Varios estudios han constatado que la vitamina D tiene efectos inmunomoduladores sobre las células del sistema inmune. Con esta premisa, decidimos evaluar los efectos directos de CTR y PCT sobre células mononucleares estimuladas con LPS.

En un primer estudio analizamos los niveles de citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL-1 α y MCP-1) a dosis crecientes de LPS (Figura 39). Los resultados muestran un aumento de los niveles de IL-1 α , MCP-1 y TNF α de manera dosis-dependiente. Las células mononucleares incubadas durante 24h con LPS 10 ng/ml y 100 ng/ml aumentaron la concentración de IL-1 α proporcionalmente ($30,4 \pm 3,4$ y $88,2 \pm 15,7$ pg/ml respectivamente) cuando se compararon con el grupo control ($22,6 \pm 3,8$ pg/ml). De igual modo, los niveles de MCP-1 incrementaron de forma significativa en presencia de LPS (LPS 10 ng/ml $485,6 \pm 182,4$, LPS 100ng/ml $1059,6 \pm 324,8$ pg/ml) respecto al grupo control ($68,4 \pm 4,5$ pg/ml).

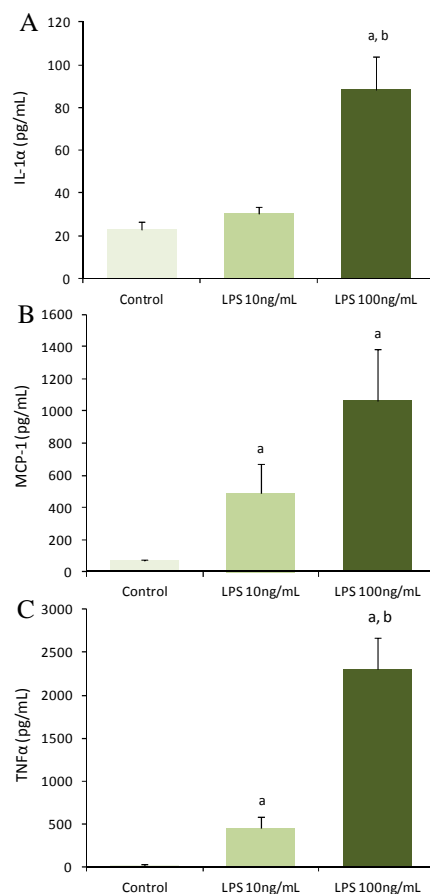


Figura 39. Curva dosis-respuesta LPS. IL-1 α (A), MCP-1 (B) y TNF α (C). ^a p<0,05 vs Control, ^b p<0,05 vs LPS 10 ng/ml.

Por último observamos un comportamiento similar en los niveles de TNF α cuando las células se trataron con LPS. Los niveles de TNF α aumentaron significativamente: LPS 10 ng/ml $451,9 \pm 138,8$, LPS 100 ng/ml $2303,9 \pm 359,8$ pg/ml, comparados con su grupo control ($23 \pm 4,6$ ng/ml)

Seguidamente, se evaluó el efecto de los análogos de la vitamina D (CTR y PCT) en cultivos de células mononucleares incubadas con LPS a una concentración de 10 ng/ml suplementadas con dosis crecientes de CTR (10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} mM) y PCT ($3 \cdot 10^{-7}$, $3 \cdot 10^{-8}$ y $3 \cdot 10^{-9}$ mM).

➤ IL-1 α . Como se muestra en la figura 40, los niveles de IL-1 α no experimentaron cambios con el tratamiento con ambos análogos de la vitamina D a ninguna de las dosis utilizadas. Todos los valores se mantuvieron cercanos al valor recogido en el grupo control tratado con LPS, solo observamos un aumento en los niveles de IL-1 α en el grupo tratado con LPS + PCT $3 \cdot 10^{-8}$ mM ($163,6 \pm 36,5$ %) respecto a este grupo con LPS 10 ng/ml (100%).

➤ MCP-1. En cuanto a los valores de MCP-1 (Figura 41), disminuyeron de forma significativa ($p < 0,05$) en los grupos tratados con las concentraciones más altas de los análogos de vitamina D (LPS + CTR 10^{-7} $37,3 \pm 11,1$ %; LPS + PCT $3 \cdot 10^{-7}$ $49,3 \pm 12,6$ %) cuando se compararon con el grupo LPS 10 ng/ml (100%). Sin embargo, el uso de dosis más bajas de análogos de vitamina D en los cultivos no consiguió reducir de forma significativa los niveles de esta citoquina con respecto al grupo control.

➤ TNF α . Del mismo modo que ocurría con el MCP-1, el TNF α experimentó una disminución estadísticamente significativa en los grupos tratados con las dosis más altas de los análogos de la vitamina D, (LPS + CTR 10^{-7} $23,9 \pm 4,7$ % y LPS + PCT $3 \cdot 10^{-7}$ $60,9 \pm 3,9$ %) con respecto a los demás grupos que mantuvieron niveles similares al grupo control con LPS 10 ng/ml (Figura 42).

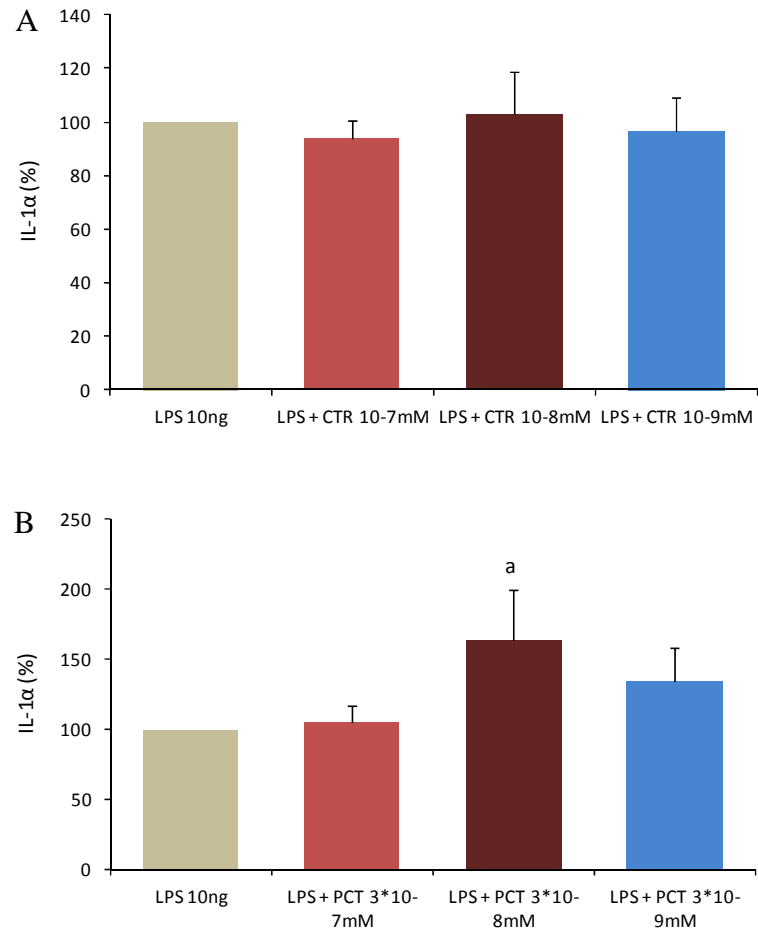


Figura 17. IL-1 α en monocitos incubados con LPS 10 g/ml y suplementados con dosis crecientes de CTR (A) o PCT (B). ^a $p < 0,05$ vs LPS 10 ng/ml.

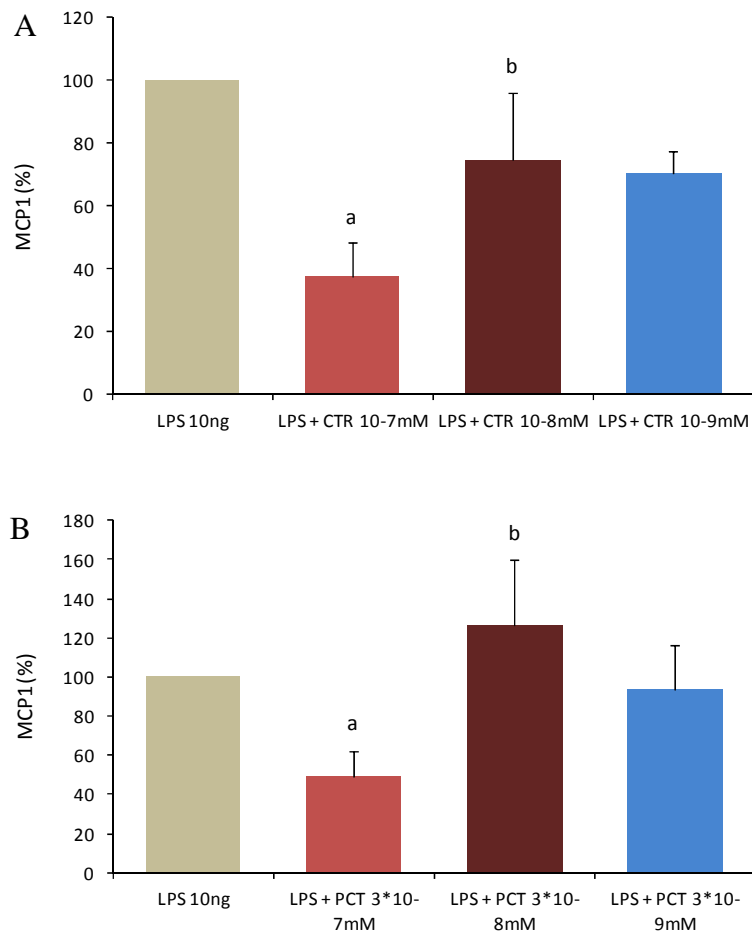


Figura 18. MCP-1 en monocitos incubados con LPS 10 ng/ml y suplementados con dosis crecientes de CTR (A) o PCT (B). ^a p<0,05 vs LPS 10 ng/ml, ^b p< 0,05 vs LPS CTR 10⁻⁷/ PCT 3*10⁻⁷ mM.

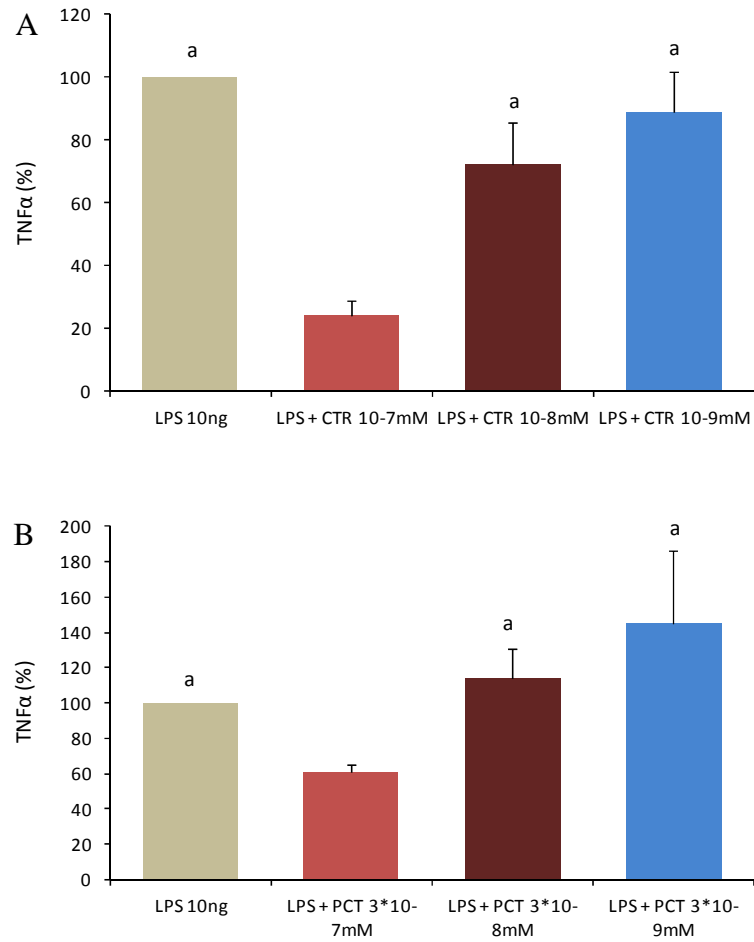
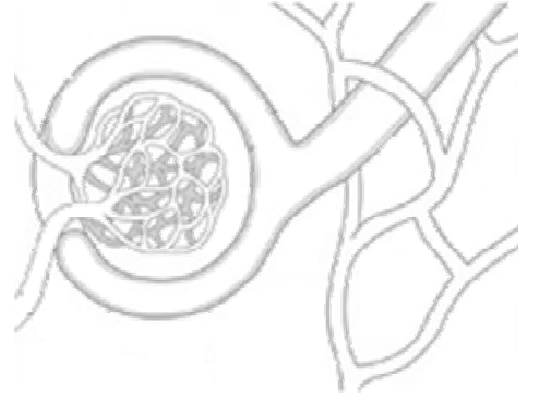


Figura 17 TNF α en monocitos incubados con LPS 10 ng/ml y suplementados con dosis crecientes de CTR (A) o PCT (B). ^a $p < 0,05$ vs LPS CTR 10^{-7} / PCT $3 \cdot 10^{-7}$ mM.



DISCUSIÓN

La finalidad del presente estudio era diseñar un modelo animal para inducir inflamación crónica mediante la administración de LPS en ratas urémicas y poder estudiar el papel del estado inflamatorio en el desarrollo de calcificaciones vasculares. El principal objetivo era evaluar la hipótesis de que el tratamiento con los derivados de la vitamina D podrían modificar la respuesta vascular a los mediadores de la inflamación y de esta manera modular el desarrollo y progresión de las CV.

Los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto que los animales que recibieron de forma crónica LPS sufrían un estado inflamatorio crónico evidenciado por la elevación significativa de los niveles plasmáticos de TNF α , IL-1 α y MCP-1. La inflamación inducida por LPS favoreció el desarrollo de CV en ratas urémicas y el tratamiento con análogos de la vitamina D, sobre todo PCT, redujo la respuesta inflamatoria y se acompañó de una disminución en la CV. Por otra parte, el estudio histológico de las aortas reveló un infiltrado de células inflamatorias (mononucleares) en los animales tratados con LPS y CTR, que se redujo a la mínima expresión en los animales tratados con PCT. El infiltrado de monocitos-macrófagos se redujo en las aortas de las ratas tratadas con PCT, pero no en las aortas de ratas tratadas con CTR. De la misma manera, en estudios *in vitro* con explantes de aorta y CMLV, el tratamiento con TNF α aceleró el desarrollo de CV por la vía BMP-2, los análogos de la vitamina D redujeron la expresión de BMP-2 y además el PCT disminuyó la calcificación inducida por TNF α .

Para el desarrollo de los objetivos planteados en este estudio se utilizaron un modelo experimental con ratas urémicas y dos modelos experimentales *in vitro*, el primero consiste en explantes de aorta de ratas Wistar sanas, y el segundo en una línea de CMLV proveniente de aorta humana. Además, este trabajo se complementó con estudios en células mononucleares para ver el efecto directo de los análogos de la vitamina D sobre el sistema inmune.

A continuación, la discusión de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis se desglosará, en base a los objetivos planteados.

1. MODELO DE INFLAMACIÓN CRÓNICA EN RATAS URÉMICAS.

Basándonos en estudios anteriores de nuestro laboratorio en los que se demostró el efecto del CTR sobre el desarrollo de CV¹⁸⁹ y en un modelo de administración crónica de LPS²¹⁶ se diseñó un modelo experimental con ratas en el que se combinaban dos de los factores implicados en el fenómeno de CV que sufren los enfermos renales: las alteraciones del metabolismo mineral y los procesos inflamatorios.

Los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto que los animales a los que se le indujo insuficiencia renal mediante nefrectomía 5/6, mostraron un aumento en los niveles de TNF α , MCP-1 e IL-1 α con respecto al grupo control y que este aumento en los niveles de citoquinas proinflamatorias circulantes fue potenciada mediante el tratamiento crónico de LPS.

Diferentes trabajos han documentado la existencia de un proceso inflamatorio crónico en pacientes con ERC, hecho que se ve reflejado por la elevación de marcadores inflamatorios, tales como IL-6, TNF α y CRP.

La causa de este proceso microinflamatorio no está bien establecida, pero se postula que una exposición continua a estímulos inflamatorios como el medio urémico y algunas endotoxinas, así como el incremento de sustancias oxidantes, por una activación del estrés oxidativo, resultan en una inducción de la inflamación local y sistémica.

En nuestro modelo in vivo se intentó simular una situación clínica similar a la presente en los pacientes tanto en hemodiálisis como en diálisis peritoneal, que generan un incremento en los niveles plasmáticos de citoquinas

proinflamatorias. Además, las toxinas urémicas ejercen efectos proinflamatorios sobre monocitos y macrófagos, que podrían contribuir tanto a la enfermedad cardiovascular como a la propensión de complicaciones infecciosas en pacientes con ERC.¹¹⁴ A todo esto se unen las alteraciones en el metabolismo mineral que aumentan el riesgo de CV y pueden actuar como foco para la respuesta inflamatoria local.⁸⁰

En la ERC disminuye el aclaramiento renal de moléculas inflamatorias y éstas tienden a acumularse en el medio interno.^{23,224} Estudios experimentales en ratas han mostrado que el riñón es el principal sitio de degradación de algunas citoquinas como IL-1 β . Aunque una menor eliminación renal puede ser una de las principales causas de la elevación de IL-6 en pacientes con ERC, la existencia de un estado inflamatorio crónico en los pacientes renales, como se ha explicado anteriormente, puede también favorecer la persistencia de niveles elevados de estos marcadores proinflamatorios. El incremento en la producción de alguna de estas citoquinas (IL-6 y TNF α) está relacionado con la sobrecarga de volumen y la insuficiencia cardiaca congestiva que se desarrolla con el deterioro progresivo de la función renal.²⁷⁹ De hecho, el tratamiento con diuréticos reduce la concentración plasmática de algunas citoquinas.

Nogueras y colaboradores desarrollaron un modelo animal de daño endotelial inducido por la administración de LPS y evaluaron la dinámica de daño y reparación endotelial. Observaron que LPS inducía apoptosis y pérdida de células endoteliales en la pared arterial paralelas a un aumento en el número de células angiogénicas circulantes en sangre periférica.²³¹ En nuestro estudio el estado inflamatorio inducido por LPS también se evidenció en la pared arterial, observándose un infiltrado subendotelial de monocitos-macrófagos en ratas urémicas tratadas con LPS.

De cualquier manera, queremos puntualizar que en este trabajo se han estudiado solo algunos de los mediadores inflamatorios más importantes, pero el estado inflamatorio inducido por la uremia y LPS provoca alteraciones en muchas otras moléculas proinflamatorias y antiinflamatorias. En la ERC, la liberación de citoquinas proinflamatorias es contrarrestada con la secreción de IL-10. En este trabajo no hemos cuantificado citoquinas antiinflamatorias, que podrían influir en el balance final inflamatorio. Además, nuestros resultados se basan en una sola medida (a tiempo final) de marcadores inflamatorios, y hay que apuntar que estudios clínicos revelan una gran variabilidad inter e intraindividual en los niveles de citoquinas plasmáticas. Meuwese y colaboradores recientemente han publicado un trabajo en el que analizan la variación trimestral de CRP, IL-6 y TNF α en la mortalidad de pacientes en diálisis. Los autores concluyen que los pacientes con niveles persistentemente elevados de estos tres marcadores son los que tienen una mayor mortalidad y surge la cuestión de si reducir la inflamación o estabilizar su variabilidad para mejorar la supervivencia en pacientes con ERC.²⁰⁹

2. EFECTO DE LA INFLAMACIÓN SOBRE EL DESARROLLO DE CALCIFICACIONES VASCULARES.

La mayor parte de los estudios realizados en la última década en relación a riesgo cardiovascular y mortalidad en pacientes con ERC han centrado su atención en identificar factores o biomarcadores que puedan señalar a los pacientes con mayor riesgo cardiovascular para intentar establecer medidas de forma preventiva lo más precozmente. De manera que estos marcadores inflamatorios se han identificado, en numerosos estudios, como predictores de pronóstico en los pacientes renales.

Se ha demostrado que las calcificaciones vasculares están altamente correlacionadas con la mortalidad en las enfermedades cardiovasculares, especialmente en pacientes con enfermedad renal en estadio final o que desarrollen diabetes. En los últimos años, se han propuesto varios mecanismos para explicar las calcificaciones vasculares.¹¹⁰ Una de estas teorías mantiene la idea de que la presencia de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1, IL-6 y TNF α , inducen la formación de hueso en las paredes de los vasos como consecuencia de una alteración fenotípica en las CMLV.

La arteriosclerosis es frecuente en los pacientes urémicos, que también se sabe que sufren un estado inflamatorio crónico. Varios estudios apuntan hacia una relación entre el aumento de mediadores inflamatorios y el riesgo cardiovascular en pacientes urémicos. Además, experimentos *in vitro* demuestran la presencia de mediadores de los procesos inflamatorios en lesiones ateroscleróticas, incluyendo TNF α , IL-6 y NF- κ B activado. Por otro lado, la activación de los genes TNF α e IL-6 por LPS en células de músculo liso vascular sugiere que la secreción de citoquinas inflamatorias por las CMLV en respuesta al tratamiento de LPS contribuye al desarrollo de arteriosclerosis.

Nuestros resultados, demostraron un aumento en el contenido mineral de calcio aórtico en ratas nefrectomizadas tratadas con LPS, en explantes de aorta y CMLV expuestos a alto fósforo suplementado con TNF α , lo que apoya la hipótesis de que la inflamación crónica promueve la CV en la uremia. En este estudio utilizamos dos modelos in vitro, el primero consistió en explantes de aorta torácica de ratas Wistar sanas y el segundo en una línea de CMLV procedentes de aorta humana. La calcificación fue similar en ambos modelos, aunque los niveles de calcio en el modelo de CMLV fueron un poco mayores que los observados en el modelo de explantes de aorta. Este hecho puede estar relacionado con la conservación de la arquitectura vascular en el modelo de explantes de aorta, lo que permitiría una respuesta más compleja ante el estímulo inflamatorio.

Las CMLV de aorta humana se usan comúnmente para estudios de calcificación inducida por alto fósforo,^{174,331} sin embargo, debido a algunas de las limitaciones de los cultivos celulares en monocapa, entre las que destacan la conversión de las CMLV a fenotipo sintético después de determinado número de pases y la necesidad de usar factores de crecimiento, autores como Lomashvili y colaboradores¹⁸⁷ desarrollaron un modelo de explantes de aorta para estudiar algunos aspectos de la fisiopatología de la calcificación de la media de las arterias. Estos explantes pueden cultivarse a largo plazo sin necesidad de utilizar factores de crecimiento. Los explantes de aorta presentan la ventaja adicional de mantener intacta la arquitectura tisular. Además, la presencia de todas las poblaciones celulares que conforman la aorta y el contacto intercelular hacen que este modelo que se asemeje más a un organismo vivo que el modelo de CMLV. Sin embargo, el modelo de CMLV en monocapa también tiene sus ventajas puesto que permite aislar el efecto del TNF α sobre las CMLV sin la interferencia de otros tipos celulares y proporciona mejores resultados en la biología molecular. Por todo ello, en este

158

estudio se trabajó con ambos modelos para asegurar que los hallazgos obtenidos son independientes de la metodología utilizada.

Se ha observado, tanto en arterias calcificadas de pacientes urémicos como en modelos in vitro de calcificación inducida por alto fósforo, que las CMLV sufren una profunda transición fenotípica que conduce a la disminución o pérdida total de expresión de los marcadores de CMLV. De manera simultánea, se observa en estas células un aumento en la expresión de los marcadores osteocondrogénicos.^{32,111} Diversos autores han demostrado que al añadir fósforo al medio de cultivo de CMLV, en concentraciones similares a las encontradas en individuos hiperfosfatémicos, se produce una disminución en la expresión de SM α -actina,^{289,326} calponina^{282,306} y SM22 α ,^{173,289,303} y un aumento en la expresión de factores osteocondrogénicos, como Runx2,^{214,289,303} BMP-2,¹⁷³ y osteopontina.^{187,289} Aunque esta plasticidad fenotípica se considera una ventaja evolutiva para adaptarse al ambiente, el cambio de fenotipo y la adquisición de nuevas características por parte de la CMLV contribuyen marcadamente al desarrollo y/o la progresión de diversas enfermedades cardiovasculares.

Nuestros resultados también evidenciaron un aumento en la expresión de marcadores osteogénicos en estas células: Runx2, BMP-2 y Dlx5, lo que verifica la transición fenotípica inducida por fósforo en las CMLV. BMP-2, es una proteína implicada en procesos de CV y es requerida tanto en la diferenciación osteogénica como en la mineralización. Esta proteína también es clave en la transdiferenciación osteogénica asociada a inflamación, así se observa en este trabajo que la adición de TNF α en el medio de cultivo aumentó la expresión de BMP-2 en las CMLV. Varios estudios han demostrado que TNF α induce un aumento en la expresión génica de BMP2 mediada por la vía NF- κ B.^{38,334}

Además, se ha reportado que TNF α acelera la calcificación de las células intersticiales de válvulas aórticas obtenidas de pacientes con estenosis valvular aórtica calcificada.³³⁴ En este mismo trabajo, Yu y colaboradores observaron que TNF α aumentaba la expresión génica de BMP-2 a través de la translocación de NF- κ B al núcleo, lo que estimulaba la expresión de Dlx5 resultando en calcificación, independiente de la expresión de Runx2.

Este estudio avala nuestros resultados, en los cuales la exposición de las CMLV a TNF α , resultó en una disminución de la expresión génica de Runx2. Estos datos sugieren que Runx2 parece no jugar un papel importante en el desarrollo de calcificaciones ectópicas inducidas por un estímulo inflamatorio. En esta misma línea, Gilbert y colaboradores realizaron un estudio en células de calvaria fetal de rata en las que observaron que TNF α inhibe la actividad del promotor de Runx2, mediante la desestabilización del ARNm y supresión transcripcional de Runx2.¹¹²

Además de un efecto directo de la inflamación en la CV, la administración de LPS también puede promover la CV a través de mecanismos indirectos relacionados con los cambios en el metabolismo mineral. Nuestros resultados mostraron una tendencia a aumentar los niveles de fósforo plasmático y las concentraciones de PTH después de la administración de LPS, y ambos factores podrían favorecer el desarrollo de CV. La relación entre inflamación y metabolismo mineral no es un fenómeno bien conocido. En la bibliografía encontramos trabajos en los que se ha evidenciado una disminución de los niveles de calcio y un aumento en la concentración de PTH en inflamación aguda en caballos,³¹⁰ en pacientes críticos durante las primeras 24 horas en la unidad de cuidados intensivos¹⁷⁹ y en un modelo animal de ratas.²²³ Sin embargo, en inflamación crónica hay cierta discrepancia: mientras que Welch y colaboradores no observaron cambios en los niveles de PTH en un modelo de glomerulonefritis en ratas en donde se evidenció inflamación en el

intersticio renal;³²⁸ Naumovic y colaboradores encontraron una correlación positiva entre los niveles de IL-1 β y PTH en pacientes con HPT^{2º} y malnutrición.²²⁶ Aunque los cambios en el metabolismo mineral pueden influir en el efecto procalcificante de la inflamación, no parecen jugar un papel importante en el desarrollo de las CV en nuestro estudio, como se demuestra por los experimentos in vitro en los que se induce calcificación mediante la adición de TNF α al medio de cultivo sin cambios en las concentraciones de P o PTH.

3. IMPLICACIÓN DE LOS ANÁLOGOS DE LA VITAMINA D EN LA CALCIFICACIÓN VASCULAR.

La CV es un proceso complejo caracterizado por un aumento del grosor de la pared y el endurecimiento de las arterias. Este proceso está acelerado en pacientes con ERC que presentan una disminución de la síntesis de CTR y desarrollan HPT^{2º}. El HPT^{2º} que desarrollan los pacientes con ERC, requiere de terapia para minimizar los efectos de la PTH sobre los huesos y otros tejidos. Los bajos niveles de CTR en sangre juegan un papel importante en la iniciación y mantenimiento del HPT^{2º}. La terapia para el control del HPT^{2º} en pacientes con ERC consiste en diferentes activadores de VDR, que inhiben la síntesis y secreción de PTH y suprimen los fenómenos proliferativos en la glándula paratiroides, además regulan la absorción intestinal de calcio y fósforo y su movilización en el hueso. En este trabajo comprobamos que el tratamiento con dos análogos de la vitamina D (CTR y PCT) es igual de eficaz a la hora de suprimir la secreción de PTH en las ratas urémicas.

Sin embargo, es importante puntualizar que el uso de la forma activa de la vitamina D, CTR, tiene una limitación terapéutica importante al promover de forma intensa la absorción de Ca y P en el intestino lo que puede provocar episodios de hipercalcemia e hiperfosfatemia, y por lo tanto aumenta el riesgo de calcificación cardiovascular en pacientes con ERC. Esto ha llevado al desarrollo de análogos de la vitamina D, como el PCT, capaces de reducir los niveles de PTH, pero que no provoquen hipercalcemia e hiperfosfatemia. Nuestros resultados apoyan esta particularidad del PCT, de manera que el tratamiento de ratas urémicas con este análogo no aumentó el contenido mineral de calcio aórtico, mientras que las ratas urémicas que recibieron CTR demostraron una significativa calcificación. Los efectos beneficiosos del PCT sobre la prevención de CV se atribuyen al hecho de que este fármaco es menos

hipercalcemiante que otros derivados de la vitamina D, como el CTR. Nuestros resultados confirman que la administración de CTR a ratas urémicas resultó en un aumento de los niveles séricos de Ca y P, contrariamente, PCT no produjo cambios significativos en los niveles de Ca y P. Lo que sugiere que PCT es efectivo en la supresión de PTH en ratas urémicas con HPT2° y es menos calcemiante que el CTR. En 1998, Slatopolsky y colaboradores, observaron una disminución en la expresión de VDR en intestino de ratas urémicas tratadas con PCT, que puede explicar parte de su efecto menos calcémico e hiperfosfatémico.²⁸⁴

Aunque, los efectos de la vitamina D sobre el proceso de calcificación pueden estar relacionados con las elevaciones en el calcio y fósforo en sangre, no se debe perder de vista el efecto directo que potencialmente puede ejercer la vitamina D sobre las CMLV. Se ha demostrado con estudios *in vitro* que las CMLV expresan receptores para la vitamina D, los cuales responden a la estimulación por CTR. En este estudio el tratamiento con CTR induce una significativa mineralización en el cultivo de CMLV humanas. Estos resultados están de acuerdo con los de Jono y colaboradores, que fueron los primeros en mostrar que la adición de CTR a un cultivo de CMLV bovinas incrementa la calcificación de una manera dosis-dependiente, a la vez que regula positivamente la expresión de marcadores osteogénicos como la osteopontina y la fosfatasa alcalina.¹⁵¹ Este aumento en la calcificación está ausente en las CMLV tratadas con PCT, incluso a una concentración tres veces mayor que la del CTR.

La afinidad del PCT por su receptor (VDR) es tres veces menor que la del CTR.⁹³ Este es un punto importante ya que puede ser la causa de disminución e incluso bloqueo de la respuesta. Cuando el ligando natural se une al VDR, éste sufre el cambio conformacional preciso para poder interactuar tanto con el VDRE del gen diana como con los coactivadores encargados de formar el

complejo transcripcional. Los análogos de la vitamina D imitan a la forma activa de la vitamina D y actúan a través del mismo mecanismo. Por lo tanto, las diferencias de biopotencia que se pueden encontrar entre los análogos de la vitamina D y su forma activa podrían deberse en parte a cambios de acoplamiento a la hora de dimerizarse o de interaccionar con los coactivadores.

Aunque en el cultivo de CMLV in vitro el CTR ejerce un efecto procalcificante, los resultados no son tan claros con otros modelos experimentales. Un estudio realizado con explantes de aorta muestra que el calcitriol, incluso a dosis altas (100 nM) no altera la deposición de calcio producida por el fósforo.¹⁸⁶ Sin embargo, también en este modelo, se incrementó significativamente la expresión de osteopontina en el grupo tratado con CTR con respecto al grupo tratado únicamente con alto fósforo. En nuestro trabajo encontramos que la calcificación fue similar en ambos modelos, aunque los niveles de calcio en el modelo de CMLV fueron un poco mayores que los observados en el modelo de explantes de aorta.

Actualmente se entiende que la calcificación vascular es un proceso activo, regulado, en el que hay varios mecanismos implicados, tales como transformación de CMLV en células similares a osteoblastos, la apoptosis y el desequilibrio entre inhibidores e inductores de la calcificación. Las CMLV comienzan a expresar proteínas asociadas al hueso que conducen a la mineralización de la matriz extracelular.¹⁵⁰ En los estudios in vitro con CMLV hemos demostrado que el CTR aumenta la expresión de marcadores osteogénicos como el Runx2. Runx2, es un factor de transcripción esencial para la osteogénesis y para la condrogénesis.³⁰³ Asimismo, Runx2 es necesario para que las células progenitoras mesenquimales se diferencien a células osteoprogenitoras, y además regula la formación de la matriz extracelular en la diferenciación osteoblástica.³⁰³ La transición fenotípica de CMLV hacia

células de estirpe osteogénica, inducida por altas concentraciones de fosfato (3,3mM) conlleva un aumento en la expresión de Runx2 con la subsiguiente calcificación *in vitro*.²¹⁷ Por lo tanto, nuestros resultados indicarían que el CTR, a través de un efecto directo sobre Runx2, puede dar lugar a un cambio fenotípico de las CMLV hacia células osteogénicas y así se potenciaría el efecto de la inflamación sobre el desarrollo y progresión de las calcificaciones.

4. EFECTO DE LOS ANÁLOGOS DE LA VITAMINA D SOBRE EL ESTADO INFLAMATORIO.

La enfermedad vascular de los enfermos urémicos está condicionada por diferentes factores de riesgo. Junto a factores de riesgo cardiovascular tradicionales, se perfilan otros de no menor entidad que van ligados de forma específica a las alteraciones circulatorias que acompañan a la ERC. En este contexto, destacamos el proceso inflamatorio crónico que sufren los pacientes urémicos y que contribuye sustancialmente a la morbilidad y mortalidad por enfermedad cardiovascular y disfunción endotelial en estos individuos.^{57,236,242,293,295,338}

Desde su descubrimiento en 1919, la vitamina D ha tenido un papel central en el control de la homeostasis del calcio y el metabolismo óseo. Sin embargo, a partir de la detección del receptor de la vitamina D en células del sistema inmune, se han observado importantes acciones moduladoras de la vitamina D sobre el sistema inmune, la proliferación y diferenciación celular.^{128,170,255,317,333}

En este sentido, nuestros resultados muestran ese efecto inmunomodulador de los análogos de la vitamina D, CTR y PCT, reduciendo la producción de citoquinas proinflamatorias en ratas urémicas tratadas con LPS. Aunque, al comparar los efectos de ambos análogos, hay que resaltar que el PCT obtuvo un efecto antiinflamatorio superior al CTR, alcanzando niveles séricos de TNF α y MCP-1 similares al grupo de ratas nefrectomizadas que no recibieron LPS.

En relación a las diferencias observadas en cuanto al efecto inmunomodulador de ambos análogos, en el estudio histopatológico, se observó un marcado infiltrado de células inflamatorias CD68+ en el tejido vascular de ratas urémicas tratadas con CTR, que afectó tanto a la túnica media como a la túnica adventicia. Por el contrario, el infiltrado inflamatorio que se observó en los

anillos aórticos de ratas urémicas tratadas con PCT fue mínimo, lo que apoya una vez más el mayor potencial antiinflamatorio de este fármaco con respecto al CTR. Las diferencias observadas entre la acción de los derivados de la vitamina D sobre la inflamación sistémica (donde tanto CTR como PCT, disminuyeron la producción de citoquinas proinflamatorias) y local (donde observamos que calcitriol promovió una mayor respuesta celular) también podrían estar relacionadas con la presencia de focos de calcificación en la pared vascular de las ratas urémicas tratadas con LPS+CTR, que pudieran actuar como un estímulo inflamatorio local adicional, atrayendo células inflamatorias hacia el lugar de lesión.

Estos resultados demuestran que, además de sus efectos en el metabolismo mineral, el tratamiento con PCT reduce los niveles de citoquinas circulantes de forma más eficiente que el CTR y además inhibe la inflamación local en la pared arterial. De esta manera, el efecto antiinflamatorio más marcado del PCT, también podría influir en sus propiedades menos calcificantes.

TNF α parece tener un papel importante en el desarrollo de CV. También se ha demostrado que TNF α estimula la expresión de BMP-2 en células mesenquimales,¹⁷⁵ en condrocitos,⁹⁹ en células endoteliales⁶⁵ y en células del folículo dental.³³² En nuestro estudio, BMP-2, que es una proteína clave en la transdiferenciación osteogénica asociada a inflamación, aumentó su expresión en CMLV expuestas a TNF α y ambos análogos de la vitamina D lograron disminuir los niveles de BMP-2, siendo este descenso más acentuado en el grupo tratado con PCT. De la misma manera ocurrió con la expresión de Dlx5, un factor de transcripción implicado en la diferenciación osteoblástica²⁹⁷ y necesario en el desarrollo craneofacial,³ tanto CTR como PCT lograron disminuir los niveles de Dlx5, que estaban aumentados en presencia de TNF α ,

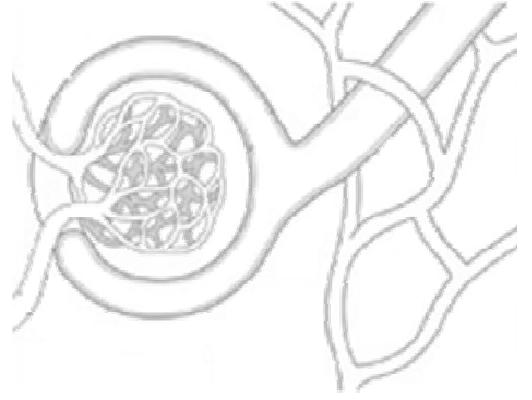
aunque de nuevo con el uso de PCT se consiguió una disminución más acentuada de este marcador osteogénico, que con el CTR.

Varios estudios han demostrado que TNF α induce un aumento en la expresión génica de BMP-2 mediada por la translocación de NF- κ B al núcleo, lo que estimula la expresión de Dlx5, resultando en calcificación independiente de la expresión de Runx2.³³⁴ En cultivo de células endoteliales CTR inhibe la activación del factor de transcripción NF- κ B^{88,296} y PCT atenúa los efectos inflamatorios que se desarrollan en un modelo animal de ratones con nefropatía obstructiva a través de la vía de señalización NF- κ B. Recientemente, se ha publicado un trabajo que demuestra que dos análogos de la vitamina D (PCT y maxacalcitol) inhiben la mineralización de CMLV inducida por fosfato y TNF α mediante la supresión de MMP2,¹⁴ una elastasa liberada por las CMLV que induce degradación de la elastina. La síntesis de esta enzima depende de NF- κ B.²⁵¹ Asimismo, se ha reportado que los análogos de la vitamina D no tienen efectos sobre la mineralización de CMLV inducida por fosfato sin la presencia de TNF α , lo que sugiere la importancia del efecto antiinflamatorio de estos fármacos en sus acciones anticalcificantes.¹⁴

Para profundizar en el estudio comparativo del efecto inmunomodulador de ambos análogos, evaluamos de forma directa los efectos de la vitamina D sobre la respuesta inflamatoria de células mononucleares de rata estimuladas con LPS. Observando en primer lugar que los niveles de citoquinas proinflamatorias, incluyendo TNF α , IL-1 α y la quimioquina MCP-1 aumentaron de manera dosis dependiente; y, posteriormente, que el tratamiento con ambos análogos de la vitamina D, CTR y PCT, resultó en un descenso significativo de los niveles de estas citoquinas, siendo la dosis más efectiva la de 10⁻⁷mM para CTR y 3*10⁻⁷mM para PCT. Este hallazgo sugiere

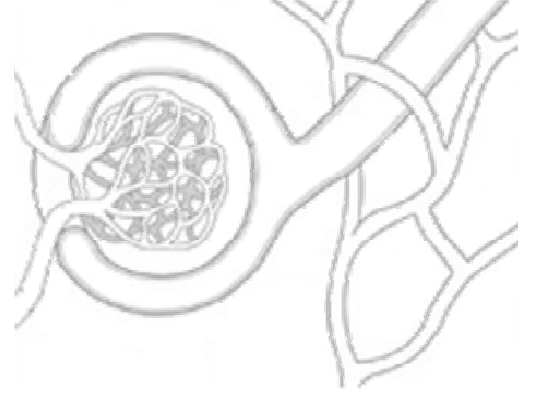
que pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas que son deficientes en vitamina D pueden beneficiarse del tratamiento con CTR o PCT. Existen varios artículos que confirman nuestros resultados y apuntan en esta misma dirección. Así, Gao y colaboradores recientemente publicaron un estudio en el que observaron cómo la vitamina D disminuyó la producción de MCP-1 y otros marcadores proinflamatorios en preadipocitos humanos, células principales del tejido adiposo implicadas directamente en procesos inflamatorios, y redujo la migración de monocitos.¹⁰⁴ También, Zhang y colaboradores demostraron en un modelo murino que la vitamina D disminuía la producción de TNF α e IL-6 en macrófagos derivados de médula ósea activados por mitógenos, a través de la inhibición de la vía de las proteínas quinasas.³³⁷

A pesar de que los datos experimentales apoyan la participación de la vitamina D en la modulación de la respuesta inflamatoria, los estudios clínicos y epidemiológicos son todavía escasos. Los estudios observacionales han generado resultados contradictorios: algunos estudios transversales indican que la deficiencia de vitamina D se asocia con mayores niveles séricos de biomarcadores inflamatorios, como IL-6, TNF α y CRP, en personas sanas^{79,145,228,248} y en sujetos obesos;²² mientras que otros estudios clínicos no pudieron confirmar estos resultados.^{102,140,153,320} En la práctica clínica, parece que el uso terapéutico de suplementos de vitamina D contribuye a reducir los niveles séricos de TNF α e incrementar los niveles de IL-10 en pacientes con enfermedades asociadas a inflamación, como la insuficiencia cardiaca crónica, la ERC y la osteoporosis.^{31,142,271}



CONCLUSIONES

1. En ratas, la insuficiencia renal, inducida mediante nefrectomía 5/6, produce un aumento en las concentraciones de TNF α , MCP-1 e IL-1 α . Este incremento en los niveles de citoquinas proinflamatorias circulantes se potencia por la administración crónica de LPS a ratas urémicas.
2. Las citoquinas generadas tras la administración de LPS tienen un efecto procalcificante *in vivo*. Del mismo modo, *in vitro*, la presencia de TNF α , tanto en cultivos de explantes de aorta como en cultivos de CMLV, promueve la calcificación.
3. El tratamiento *in vitro* de CMLV con TNF α aumenta la expresión de genes osteogénicos, principalmente BMP2.
4. El tratamiento con PCT reduce los niveles de citoquinas circulantes de forma más eficiente que el tratamiento con CTR y además disminuye la inflamación local en la pared arterial en ratas urémicas tratadas con LPS.
5. Los análogos de la vitamina D reducen la expresión de BMP2 y el PCT, además, disminuye la CV inducida por TNF α .
6. Ambos análogos de la vitamina D, CTR y PCT reducen de forma significativa la producción de citoquinas inflamatorias en monocitos estimulados con LPS *in vitro*.



BIBLIOGRAFÍA

1. Abe, E, et al. «Essential requirement of BDNF-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin.» *J Bone Miner Res*, 2000; 15: 663-673.
2. Abedin, M, Y Tintut, y L Demer. «Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications.» *Arterioscl Thromb Vasc Biol*, 2004; 24: 1161-1170.
3. Acampora, D, et al. «Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the Distal-less-related gene *Dlx5*.» *Development*, 1999; 126: 3795-3809.
4. Adams, JS, y M Hewison. «Update in vitamin D.» *J Clin Endocrinol Metab*, 2010; 95: 471-478.
5. Adorini, L. «Immunomodulatory effects of vitamin D receptor ligands in autoimmune diseases.» *Int Immunopharmacol*, 2002; 2: 1017-1028.
6. Ahmed, S, K O'Neill, A Hood, A Evan, y S Moe. «Calciphylaxis is associated with hyperphosphatemia and increased osteopontin expression by vascular smooth muscle cells.» *Am J Kidney Dis*, 2001; 37: 1267-1276.
7. Aiello, RJ, et al. «Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.» *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999; 19: 1518-1525.
8. Akizawa, T, et al. «Dose-response study of 22-oxacalcitriol in patients with secondary hyperparathyroidism.» *The Apher Dial*, 2004; 8: 480-491.
9. Al-Aly, Z. «Medial vascular calcification in diabetes mellitus and chronic kidney disease: The role of inflammation.» *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2007; 7: 1-6.
10. Al-Badr, W, y KJ Martin. «Vitamin D and kidney disease.» *Clin J Am Soc Nephrol*, 2008; 3: 1555-1560.
11. Allan, SM, y PJ Rothwell Tyrrell. «Interleukin-1 and neuronal injury.» *Nat Rev Immunol*, 2005; 5: 629-640.
12. Allon, M, et al. «Impact of dialysis dose and membrane on infection-related hospitalization and death: Results of the HEMO Study.» *J Am Soc Nephrol*, 2003; 14: 1863-1870.

13. Anderson, HC. «Electron microscopic studies of induced cartilage development and calcification.» *J Cell Biol*, 1967: 35: 81-101.
14. Aoshima, Y, et al. «Vitamin D receptor activators inhibit vascular smooth muscle cell mineralization induced by phosphate and TNFalpha.» *Nephrol Dial Transplant*, 2012: 27: 1800-1806.
15. Apostolopoulos, J, P Davenport, y PG Tipping. «Interleukin-8 production by macrophages from atheromatous plaques.» *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996: 16: 1007-1012.
16. Ashcroft, DM, AL Po, HC Williams, y CE Griffiths. «Systematic review of comparative efficacy and tolerability of calcipotriol in treating chronic plaque psoriasis.» *Br Med J*, 2000: 320: 963-967.
17. Auron, PE, et al. «Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA.» *Proc Natl Acad Sci USA* , 1984: 81: 7907-7911.

18. **B**adimon, L, J Badimon, M Cohen, J Chesebro, y V Fuster. «Vessel wall-related risk factors in acute vascular events.» *Drugs*, 1991: 42: 1-9.
19. Baker, RG, MS Hayden, y S Ghosh. «NF-kappa B, inflammation, and metabolic disease.» *Cell Metab*, 2011: 13: 11-22.
20. Basalyga, DM, DT Simionescu, W Xiong, BT Baxter, BC Starcher, y NR Vyavahare. «Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model: Role of matrix metalloproteinases.» *Circulation*, 2004: 110: 3480-3487.
21. Bazzoni, F, y B Beutler. «The tumor necrosis factor ligand and receptor families.» *N Engl J Med*, 1996: 334: 1717-1725.
22. Bellia, A, et al. «Serum 25-hydroxyvitamin D levels are inversely associated with systemic inflammation in severe obese subjects.» *Intern Emerg Med*, 2011: doi:10.1007/s11739-011-0559-x.
23. Bemelmans, MH, DJ Gouma, y WA Buurman. «Influence of nephrectomy on tumor necrosis factor clearance in murine model.» *J Immunol*, 1993: 150: 2007-2017 .
24. Bernard, GW, y DC Pease. «An electron microscopic study of initial intramembranous osteogenesis.» *Am J Anat*, 1969: 125: 271-290.

25. Bhagat, K, y P Vallance. «Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo.» *Circulation*, 1997: 96: 3042-3047.
26. Block, GA, TE Hulbert-Shearon, NW Levin, y FK Port. «Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: A national study.» *Am J Kidney Dis*, 1998: 31: 607-617.
27. Block, GA, y FK Port. «Re-evaluation of risks associated with hyperphosphatemia and hyperparathyroidism in dialysis patients: Recommendations for a change in management.» *Am J Kidney Dis*, 2000: 35: 1226-1237.
28. Blyth, K, E Cameron, y J Neil. «The RUNX genes: Gain or loss of function in cancer.» *Nat Rev Cancer*, 2005: 5: 376-387.
29. Bochner, BS, et al. «Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: Contributions of endothelial cell adhesion molecules.» *J exp Med*, 1991: 173: 1553-1557.
30. Bonucci, E. «Fine structure of early cartilage calcification.» *J Ultrastruct Res*, 1967: 20: 33-50.
31. Borazan, A, H Ustun, A Cefle, N Sekitmez, y A Yilmaz. «Comparative efficacy of oral and intravenous calcitriol treatment in haemodialysis patients: Effects on serum biochemistry and cytokine levels.» *J Int Med Res*, 2003: 31: 489-496.
32. Bostrom, K. «Cell differentiation in vascular calcification.» *Z Kardiol*, 2000: 89: 69-74.
33. Bostrom, K, KE Watson, s Horn, C Wortham, IM Herman, y LL Demer. «Bone morphogenic protein expression in human atherosclerotic lesions.» *J Clin Invest*, 1993: 91: 1800-1809.
34. Bouillon, R, et al. «Vitamin D and human health: Lessons from vitamin D receptor null mice.» *Endocr Rev*, 2008: 29: 726-776.
35. Bover, J, et al. «Factors in the development of secondary hyperparathyroidism during graded renal failure in the rat.» *Kidney Int*, 1994: 45: 953-961.
36. Boyum, A. «Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of

- granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g.» *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 1968: 97: 77-89.
37. Bradford, M. «A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.» *Anal Biochem*, 1976: 72: 248-254.
38. Bradley, JR. «TNF-mediated inflammatory disease.» *J Pathol*, 2008: 214: 149-160.
39. Brennan, A, et al. «Dendritic cells from human tissues express receptors for the immunoregulatory vitamin D3 metabolite, dihydroxy cholecalciferol.» *Immunology*, 1987: 61: 457-461.
40. Brown, AJ, A Dusso, y E Slatopolsky. «VitaminD.» *Am J Physiol Renal Physiol*, 1999: 277: F157-F175.
41. Brumbaugh, PF, y MR Haussler. «1 alpha,25-dihydroxycholecalciferol receptors in intestine. I. Association of ii alpha,25-dihydroxycholecalciferol with intestinal mucosa chromatin.» *J Biol Chem*, 1974: 249: 1251-1257.
42. Bruun, JM, et al. «Regulation of adiponectin by adipose tissue-derive cytokines: In vivo and in vitro investigations in humans.» *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003: 285: E527-E533.
43. Burke, A, A Taylor, A Farb, G Malcom, y R Virmani. «Coronary calcification: insights from sudden coronary death victims.» *Z Kardiol*, 2000: 89: 49-53.
44. **C**aglar, K, et al. «Inflammatory signals associated with hemodialysis.» *Kidney Int*, 2002: 62: 1408-1416.
45. Cantorna, MT, CE Hayes, y HF DeLuca. «1,25-dihydroxyvitamin D3 reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis.» *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996: 93: 7861-7864.
46. Carswell, EA, LJ Old, RL Kassel, S Green, N Fiore, y B Williamson. «An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.» *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975: 72: 3666-3670.

47. Casteels, K, R Bouillon, M Waer, y C Mathieu. «Immunomodulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3.» *Curr Opin Nephrol Hypertension*, 1995: 4: 313-318.
48. Chang, Q, S Hoefs, AW van der Kemp, CN Topala, RJ Bindels, y JG Hoenderop. «The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel.» *Science*, 2005: 310: 490-493.
49. Charo, IF, y RM Ransohoff. «The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation.» *N Engl J Med*, 2006: 354: 610-621.
50. Charpy, J. «Aspects of vitamin and functional substance therapy in dermatology.» *Bull Med*, 1950: 64: 555-559.
51. Chaudhary, L, A Hofmeister, y K Hruska. «Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation.» *Bone*, 2004: 34: 402-411.
52. Chen, N, et al. «The mechanisms of uremic serum-induced expression of bone matrix proteins in bovine vascular smooth muscle cells.» *Kidney Int*, 2006: 70: 1046-1053.
53. Chen, N, y S Moe. «Vascular calcification in chronic kidney disease.» *Semin Nephrol*, 2004: 24: 61-68.
54. Chen, S, GP Sims, XX Chen, YY Gu, y PE Lipsky. «Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation.» *J Immunol*, 2007: 179: 1634-1647.
55. Cheng, S, J Shao, N Charlton-Kachigian, A Loewy, y D Towler. «Msx2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors.» *J Biol Chem*, 2003: 278: 45969-45977.
56. Chertow, BS, WI Sivitz, NG Baranestsky, SA Clark, A Waite, y HF Deluca. «Cellular mechanisms of insulin release - the effects of vitamin-D deficiency and repletion on rat insulin-secretion.» *Endocrinology*, 1983: 113: 1511-1518.
57. Cheung, WW, KH Paik, y RH Mak. «Inflammation and cachexia in chronic kidney disease.» *Pediatr Nephrol*, 2010: 25: 711-724.
58. Chomczynski, P, y N Sacchi. «The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on.» *Nat Protoc*, 2006: 1: 581-585.

59. Coburn, JW, et al. «Doxercalciferol safely suppresses PTH levels in patients with secondary hyperparathyroidism associated with chronic kidney disease stages 3 and 4.» *Am J Kidney Dis*, 2004: 43: 877-890.
60. Cohen-Lahav, M, S Shany, D Tobvin, C Chaimovitz, y A Douvdevani. «Vitamin D decreases NF kappa B activity by increasing I kappa B alpha levels.» *Nephrol Dial Transplant*, 2006: 21: 889-897.
61. Coll, B, et al. «Large artery calcification on dialysis patient is located in the intima and related to atherosclerosis.» *Clin J Am Soc Nephrol*, 2011: 6: 303-310.
62. Colotta, F, SK Dower, JE Sims, y A Mantovani. «The type II decoy receptor: A novel regulatory pathway for interleukin 1.» *Immunol Today*, 1994: 15: 562-566.
63. Colotta, F, et al. «Interleukin-1 type II receptor: A decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4.» *Science*, 1993: 261: 472-475.
64. Cross, HS, H Debiec, y M Peterlik. «Mechanism and regulation of intestinal phosphate absorption.» *Miner Electrolyte Metab*, 1990: 16: 115-124.
65. Csiszar, A, K Smith, A Koller, G Kaley, J Edwards, y Z Ungvari. «Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression in endothelial cells: Role of nuclear factor-kappa B activation by tumor necrosis factor-alpha, H₂O₂, and high intravascular pressure.» *Circulation*, 2005: 111: 2364-2372.
66. Csiszar, A, et al. «Bone morphogenetic protein-2 induces proinflammatory endothelial phenotype.» *Am J Pathol*, 2006: 168: 629-638.
67. Cybulsky, MI, y Jr MA Gimbrone. «Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis.» *Science*, 1991: 251: 788-791.
68. **D**'Ambrosio, D, et al. «Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D₃.» *J Clin Invest*, 1998: 101: 252-262.
69. Danesh, J, et al. «C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease.» *N Engl J Med*, 2004: 350: 1387-1397.

70. Dao, HH, R Essalihi, C Bouvet, y P Moreau. «Evolution and modulation of age-related medial elastocalcinosis: impact on large artery stiffness and isolated systolic hypertension.» *Cardiovasc Res*, 2005: 66: 307-317.
71. DeLuca, HF, y MT Cantorna. «Vitamin D: Its role and uses in immunology.» *FASEB J*, 2001: 15: 2579-2585.
72. Demer, LL. «Vascular calcification and osteoporosis: inflammatory responses to oxidized lipids.» *Int Epidemiol*, 2002: 31: 737-741.
73. Derici, U, y A El Nahas. «Vascular calcifications in uremia: old concepts and new insights.» *Semin Dial*, 2006: 19: 60-68.
74. Descamps-Latscha, B, et al. «Balance between IL-1 beta, TNF-alpha, and their specific inhibitors in chronic renal failure and maintenance dialysis. Relationships with activation markers of T cells, B cells, and monocytes.» *J Immunol*, 1995: 154: 882-892.
75. Dinarello, CA. «Biologic basis for interleukin-1 in disease.» *Blood*, 1996: 87: 2095-2147.
76. Dinarello, CA. «Cytokines and biocompatibility.» *Blood Purif*, 1990: 8: 208-213.
77. Dinarello, CA. «The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1.» *N Engl J Med*, 2000: 343: 732-734.
78. Dixit, VM, et al. «Tumor necrosis factor-alpha induction of novel gene products in human endothelial cells including a macrophage-specific chemotaxin.» *J Biol Chem*, 1990: 265: 2973-2978.
79. Dobnig, H, et al. «Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels with all-cause and cardiovascular mortality.» *Arch Intern Med*, 2008: 168: 1340-1349.
80. Doherty, TM, et al. «Calcification in atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads.» *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003: 100: 11201-11206.
81. Ducy, P. «Cbfa1: A molecular switch in osteoblast biology.» *Dev Dyn*, 2000: 219: 461-471.
82. Ducy, P, R Zhang, V Geoffroy, A Ridall, y G Karsenty. «Osf2/Cbfa1: A transcriptional activator of osteoblast differentiation.» *Cell*, 1997: 89: 747-754.

83. Dulce, H. «On the biochemistry of ossification. 3. Mineral content, ground substance composition, and enzymic activities in callus tissue and in rachitic bones of rats.» *Z Physiol Chem*, 1960: 320: 1-10.
84. Dusso, A. «Vitamin D receptor: Mechanisms for vitamin D resistance in renal failure.» *Kidney Int Suppl*, 2003: 85: S6-S9.
85. Dusso, A, AJ Brown, y E Slatopolsky. «Vitamin D.» *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005: 289: F8-F28.
86. Dusso, A, EA Gonzalez, y KJ Martin. «Vitamin D in chronic kidney disease.» *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2011: 25: 647-655.

87. **E**dmonds, ME, N Morrison, JW Laws, y PJ Watkins. «Medial arterial calcification and diabetic neuropathy.» *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1982: 284: 928-930.
88. Equils, O, et al. «1,25-dihydroxyvitamin D inhibits lipopolysaccharide-induced immune activation in human endothelial cells.» *Clin Exp Immunol*, 2006: 143: 58-64.
89. Esteller, A, y M Cordero. *Fundamentos de Fisiopatología 2ª ed.* España: MacGraw Hill-Interamericana, 2002.

90. **F**aruqi, RM, y PE DiCorleto. «Mechanisms of monocyte recruitment and accumulation.» *Br Heart J*, 1993: 69: S19-S29.
91. Fichtlscherer, S, G Rosenberger, DH Walter, S Breuer, S Dimmeler, y AM Zeiher. «Elevates C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease.» *Circulation*, 2000: 102: 1000-1006.
92. Fielding, J, y JJ Maloney. «Calciferol, streptomycin, and para-aminosalicylic acid in pulmonary tuberculosis.» *Lancet*, 1951: 2: 614-617.
93. Finch, JL, AJ Brown, y E Slatopolsky. «Differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and 19-nor-1,25-dihydroxyvitamin D₂ on calcium and phosphorus resorption in bone.» *J Am Soc Nephrol*, 1999: 10: 980-985.

94. Fleisch, H, D Schibler, J Maerki, y I Frossard. «Inhibition of aortic calcification by means of pyrophosphate and polyphosphates.» *nature*, 1965: 207: 1300-1301.
95. Fleisch, H, R Russell, y F Straumann. «Effect of pyrophosphate on hydroxylapatite and its implications in calcium homeostasis.» *Nature*, 1966: 212: 901-903.
96. Fleisch, H, y S Bisaz. «Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor.» *Am J Physiol*, 1962: 203: 671-675.
97. Franceschi, RT, y G Xiao. «Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: Responsiveness to multiple signal transduction pathways.» *J Cell Biochem*, 2003: 88: 446-454.
98. Fritsche, J, K Mondal, A Ehrnsperger, R Andreesen, y M Kreutz. «Regulation of 25-hydroxyvitamin D3 - 1alpha-hydroxylase and production of 1alpha-25-dihydroxyvitamin D3 by human dendritic cells.» *Blood*, 2003: 102: 3314-3316.
99. Fukui, N, Y Zhu, W Maloney, J Clohisv, y L Sandell. «Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes.» *J Bone Joint Surg Am*, 2003: 85: 59-66.

100. **G**alis, ZS, M Muszynski, GK Sukhova, E Simon-Morrissey, y P Libby. «Enhanced expression of vascular matrix metalloproteinases induced in vitro by cytokines and in regions of human atherosclerotic lesions.» *Ann N Y Acad Sci*, 1995: 748: 501-507.
101. Gallieni, M, et al. «Kinetics of monocyte 1 alpha-hydroxylase in renal failure.» *Am J Physiol*, 1995: 268: F 746-F753.
102. Ganji, V, X Zhang, N Shaikh, y V Tangpricha. «Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with prevalence of metabolic syndrome and various cardiometabolic risk factors in US children and adolescents based on assay-adjusted serum 25-hydroxyvitamin D data from NHANES 2001-2006.» *Am J Clin Nutr*, 2011: 94: 225-233.
103. Ganong, WF. *Review of Medical Physiology, 19th ed.* Norwalk, CT: Appleton & Lange, 1999.

104. Gao, D, P Trayhurn, y C Bing. «1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits the cytokine-induced secretion of MCP-1 and reduces monocyte recruitment by human preadipocytes.» *Int J Obes (Lond)*, 2012: DOI: 10.1038/ijo.2012.53.
105. Garcia del Moral, R. *Laboratorio de anatomía patológica*. España: Interamericana McGraw-Hill, 1993.
106. Geissmann, F, S Jung, y DR Littman. «Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties.» *Immunity*, 2003: 19: 71-82.
107. Gerard, C, y BJ Rollins. «Chemokines and disease.» *Nat Immunol*, 2001: 2: 108-115.
108. Gerszten, RE, et al. «MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions.» *Nature*, 1999: 398: 718-723.
109. Gery, I, y BH Waksman. «Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. II. The cellular source of potentiating mediator(s).» *J Exp Med*, 1972: 136: 143-155.
110. Giachelli, C. «Vascular calcifications mechanisms.» *J Am Soc Nephrol*, 2004: 15: 2959-2964.
111. Giachelli, C, M Speer, X Li, R Rajachar, y H Yang. «Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin.» *Circ Res*, 2005: 96: 717-722.
112. Gilbert, L, et al. «Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha.» *J Biol Chem*, 2002: 277: 2695-2701.
113. Giulietti, A, E van Etten, L Overbergh, K Stoffels, R Bouillon, y C Mathieu. «Monocytes from type 2 diabetic patients have a pro-inflammatory profile - 1,25-dihydroxyvitamin D3 works as anti-inflammatory.» *Diabetes Res Clin Pract*, 2007: 77: 47-57.
114. Glorieux, GL, et al. «In vitro study of the potential role of guanidines in leukocyte functions related to atherogenesis and infection.» *Kidney Int*, 2004: 65: 2184-2192.
115. Goldman, L, y D Ausiello. *Cecil Medicine 23rd ed*. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2007.

116. Golub, E. «Role of matrix vesicles in biomineralization.» *Biochim Biophys Acta*, 2009: 1790: 1592-1598.
117. Goodman, W. «Vascular calcification in chronic renal failure.» *Lancet*, 2001: 358: 1115-1116.
118. Graciolli, F, et al. «Phosphorus overload and PTH induce aortic expression of Runx2 in experimental uraemia.» *Nephrol Dial Transplant*, 2009: 24: 1416-1421.
119. Gravallesse, E. «Osteopontin: A bridge between bone and the immune system.» *J Clin Invest*, 2003: 112: 147-149.
120. Greenberg, CS, DE Hammerschmidt, PR Craddock, y HS Jacob. «Atheroma cholesterol activates complement and aggregates granulocytes: Possible role in ischemic manifestations of atherosclerosis.» *Trans Assoc Am Physicians*, 1979: 92: 130-135.
121. Grell, M, et al. «The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor.» *Cell*, 1995: 83: 793-802.
122. Gu, L, et al. «Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice.» *Mol Cell*, 1998: 2: 275-281.
123. Guerin, AP, GM London, SJ Marchais, y F Metivier. «Arterial stiffening and vascular calcification in end-stage renal disease.» *Nephrol Dial Transplant*, 2000: 15: 1014-1021.
124. Gupta, S, AM Pablo, X Jiang, N Wang, AR Tall, y C Schindler. «IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice.» *J Clin Invest*, 1997: 99: 2752-2761.
125. Gurlek, A, MR Pittelkow, y R Kumar. «Modulation of growth factor/cytokine synthesis and signaling by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D (3): Implications in cell growth and differentiation.» *Endocr Rev*, 2002: 23: 763-786.

126. **H**ajjar, DP, y ME Haberland. «Lipoprotein trafficking in vascular cells. Molecular Trojan horses and cellular saboteurs.» *J Biol Chem*, 1997: 272: 22975-22978.

127. Hansson, GK. «Cell-mediated immunity in atherosclerosis.» *Curr Opin Lipidol*, 1997; 8: 301-311.
128. Haroon, M, y O FitzGerald. «Vitamin D and its emerging role in immunopathology.» *Clin Rheumatol*, 2012; 31: 199-202.
129. Haussler, MR, et al. «The nuclear vitamin D receptor: Biological and molecular regulatory properties revealed.» *J Bone Miner Res*, 1998; 13: 325-349.
130. Heiss, A, et al. «Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles.» *J Biol Chem*, 2003; 278: 1333-1334.
131. Hesse, L, et al. «Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization.» *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002; 99: 9445-9449.
132. Holick, MF. «Vitamin D deficiency.» *N Engl J Med*, 2007; 357: 266-281.
133. Holliday, LS, SL Gluck, E Slatopolsky, y AJ Brown. «1,25-dihydroxy-19-nor-vitamin D (2), a vitamin D analog with reduced bone resorbing activity in vitro.» *J Am Soc Nephrol*, 2000; 11: 1857-1864.
134. Horiuchi, T, H Mitoma, S Harashima, H Tsukamoto, y T Shimoda. «Transmembrane TNF-alpha: Structure, function and interaction with anti-TNF agents.» *Rheumatology*, 2010; 49: 1215-1228.
135. Hruska, K, S Mathew, y G Saab. «Bone morphogenetic proteins in vascular calcification.» *Circ Res*, 2005; 97: 105-114.
136. Hruska, KA, S Mathew, R Lund, P Qiu, y R Pratt. «Hiperphosphatemia of chronic kidney disease.» *Kidney Int*, 2008; 74: 148-157.
137. Hu, MC, et al. «Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule.» *Faseb J*, 2010; 24: 3438-3450.
138. Huising, MO, Stet RJ, HF Savelkoul, y BM Verburg-van Kemenade. «The molecular evolution of the interleukin-1 family off cytokines; IL-18 in teleost fish.» *Dev Comp Immunol*, 2004; 28: 395-413.
139. Hunt, J, et al. «Bone formation in carotid plaques: a clinicopathological study.» *Stroke*, 2002; 33: 1214-1219.
140. Hyppönen, E, D Berry, M Cortina-Borja, y C Power. «25-hydroxyvitamin D and pre-clinical alterations in inflammatory and

hemostatic markers: A cross sectional analysis in the 1958 British Birth Cohort.» *PloS One*, 2010: 5: e10801.

141. **I**bels, L, A Alfrey, W Huffer, P Craswell, J Anderson, y R Weil. «Arterial calcification and pathology in uremic patients undergoing dialysis.» *Am J Med*, 1979: 66: 790-796.
142. Inanir, A, K Ozoran, H Tutkak, y B Mermerci. «The effects of calcitriol therapy on serum interleukin-1, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha concentrations in post-menopausal patients with osteoporosis.» *J Int Med Res*, 2004: 32: 570-582.
143. Isakova, T, et al. «Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease.» *Kidney Int*, 2011: 79: 1370-1378.
144. Ito, Y. «Oncogenic potential of the RUNX gene family: Overview.» *Oncogene*, 2004: 23: 4198-4208.

145. **J**ablonski, KL, M Chonchol, GL Pierce, AE Walker, y DR Seals. «25-hydroxyvitamin D deficiency is associated with inflammation-linked vascular endothelial dysfunction in middle-aged and older adults.» *Hypertension*, 2011: 57: 63-69.
146. Jacob, MP. «Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions.» *Biomed Pharmacother*, 2003: 57: 195-202.
147. Janzen, J, y PN Vuong. «Arterial calcifications: Morphological aspects and their pathological implications.» *Z Kardiol*, 2001: 90(Suppl3): 6-11.
148. Jonasson, L, J Holm, O Skalli, G Bondjers, y GK Hansson. «Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque.» *Atherosclerosis*, 1986: 6: 131-138.
149. Jones, SA, S Horiuchi, N Topley, N Yamamoto, y GM Fuller. «The soluble interleukin 6 receptor: Mechanisms of production and implications in disease.» *FASEB J*, 2001: 15: 43-58.
150. Jono, S, A Shioi, Y Ikari, y Y Nishizawa. «Vascular calcification in chronic kidney disease.» *J Bone Miner Metab*, 2006: 24: 176-181.

151. Jono, S, Y Nishizawa, A Shioi, y H Morii. «1,25-dihydroxyvitamin D3 increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide.» *Circulation*, 1998: 98: 1302-1306.
152. Jono, S, et al. «Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification.» *Circ Res*, 2000: 87: E10-E17.
153. Jorde, R, E Haug, Y Figenschau, y JB Hansen. «Serum levels of vitamin D and haemostatic factors in healthy subjects: The Tromso study.» *Acta Haemat*, 2007: 117: 91-97.
154. Joris, I, E Stetz, y G Majno. «Lymphocytes and monocytes in the aortic intima - an electron-microscopic study in the rat.» *Atherosclerosis*, 1979: 34: 221-231.

155. **K**ang, S, S Yi, CE Griffiths, L Fancher, TA Hamilton, y JH Choi. «Calcipotriene-induced improvement in psoriasis is associated with reduced interleukin-8 and increased interleukin-10 levels within lesions.» *Br J Dermatol*, 1998: 138: 77-83.
156. Kato, A, T Takita, Y Maruyama, y A Hishida. «Chlamydial infection and progression of carotid atherosclerosis in patients on regular haemodialysis.» *Nephrol Dial Transplant*, 2004: 19: 2539-2546.
157. Katzung, BG. *Basic and Clinical Pharmacology, 7th ed.* Norwalk, CN: Appleton & Lange, 1998.
158. Kestenbaum, B. «Phosphate metabolism in the setting of chronic kidney disease: significance and recommendations for treatment.» *Semin Dial*, 2007: 20: 286-294.
159. Ketteler, M, et al. «Association of low fetuin-A (AHSG) concentration in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: A cross-sectional study.» *Lancet*, 2003: 361: 827-833.
160. Kirii, H, et al. «Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice.» *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003: 23: 656-660.
161. Knight, EL, et al. «Kidney dysfunction, inflammation, and coronary events: A prospective study.» *J Am Soc Nephrol*, 2004: 15: 1897-1903.

162. Koenig, KG, JS Lindberg, JE Zerwekh, PK Padalino, HM Cushner, y JB Copley. «Free and total 1,25-dihydroxyvitamin D levels in subjects with renal disease.» *Kidney Int*, 1992: 41: 161-165.
163. Koh, N, et al. «Severely reduced production of klotho in human chronic renal failure kidney.» *Biochem Biophys Res Commun*, 2001: 280: 1015-1020.
164. Komori, T, et al. «Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts.» *Cell*, 1997: 89: 755-764.
165. Kowalski, J, et al. «Levels of sICAM-1, sVCAM-1 and MCP-1 in patients with hyperlipoproteinemia IIa and IIb.» *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2001: 39: 48-52.
166. Kriegler, M, C Perez, K DeFay, I Albert, y SD Lu. «A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic.» *Cell*, 1988: 53: 45-53.

167. **L**ee, JS, DM Basalyga, A Simionescu, JC Isenburg, DT Simionescu, y NR Vyavahare. «Elastin calcification in the rat subdermal model is accompanied by up-regulation of degradative and osteogenic cellular responses.» *Am J Pathol*, 2006: 168: 490-498.
168. Lee, M, et al. «BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-beta1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression.» *J Biol Chem*, 2003: 278: 34387-34394.
169. Lehto, S, L Niskanen, M Suhonen, T Ronnema, y M Laakso. «Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus.» *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996: 16: 978-983.
170. Lemire, JM, JS Adams, R Sakai, y SC Jordan. «1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells.» *J Clin Invest*, 1984: 74: 657-661.
171. Lemire, JM, y DC Archer. «1,25-dihydroxyvitamin D3 prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis.» *J Clin Invest*, 1991: 87: 1103-1107.

172. Levin, A, et al. «Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease.» *Kidney Int*, 2007: 71: 31-38.
173. Li, X, H Yang, y C Giachelli. «BMP-2 promotes phosphate uptake, phenotypic modulation, and calcification of human vascular smooth muscle cells.» *Atherosclerosis*, 2008: 199: 271-277.
174. Li, X, H Yang, y C Giachelli. «Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter pit-1 in vascular smooth muscle cell calcification.» *Circ Res*, 2006: 98: 905-912.
175. Li, X, et al. «IKKalpha, IKKbeta, and NEMO/IKKgamma are each required for the NF-kappa B-mediated inflammatory response program.» *J Biol Chem*, 2002: 277: 45129-45140.
176. Libby, P. «Inflammation in atherosclerosis.» *Nature*, 2002: 420: 868-874.
177. Libby, P, G Sukhova, RT Lee, y ZS Galis. «Cytokines regulate vascular functions related to stability of the atherosclerotic plaque.» *J Cardiovasc Pharmacol*, 1995: 25: S9-S12.
178. Lin, R, y JH White. «The pleiotropic actions of vitamin D.» *Bioessays*, 2004: 26: 21-28.
179. Lind, L, et al. «Hypocalcemia and parathyroid hormone secretion in critically ill patients.» *Crit Care Med*, 2000: 28: 93-99.
180. Lindner, A, B Charra, DJ Sherrard, y BH Scribner. «Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis.» *N Engl J Med*, 1974: 290: 697-701.
181. Liu, PT, et al. «Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response.» *Science*, 2006: 311: 1770-1773.
182. Liu, W, et al. «Regulation of gp330/megalin expression by vitamins A and D.» *Eur J Clin Invest*, 1998: 28: 100-107.
183. Locksley, RM, N Killeen, y MJ Lenardo. «The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology.» *Cell*, 2001: 104: 487-501.
184. Loetscher, P, M Seitz, M Baggiolini, y B Moser. «Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes.» *J Exp Med*, 1996: 184: 569-577.

185. Lomashvili, K, P Garg, S Narisawa, J Millan, y W O'Neill.
«Upregulation of alkaline phosphatase and pyrophosphate hydrolysis:
Potential mechanisms for uremic vascular calcification.» *Kidney Int*,
2008: 73: 1024-1030.
186. Lomashvili, K, P Garg, y WC O'Neill. «Chemical and hormonal
determinants of vascular calcification in vitro.» *Kidney Int*, 2006: 69:
1464-1470.
187. Lomashvili, K, S Cobbs, R Hennigar, K Hardcastle, y W O'Neill.
«Phosphate-induced vascular calcification: Role of pyrophosphate and
osteopontin.» *J Am Soc Nephrol*, 2004: 15: 1392-1401.
188. Lomedico, PT, et al. «Cloning and expression of murine interleukin-1
cDNA in Escherichia coli.» *Nature*, 1984: 312: 458-462.
189. Lopez, I, et al. «Calcimimetic R-568 decreases extraosseous
calcifications in uremic rats treated with calcitriol.» *J Am Soc Nephrol*,
2006: 17: 795-804.
190. Luettiq, B, T Decker, y ML Lohmann-Matthes. «Evidence for te
existence of two forms of membrane tumor necrosis factor: An integral
protein and a molecule attached to its receptor.» *J Immunol*, 1989: 143:
4034-4038.
191. Lusic, A. «Atherosclerosis.» *Nature*, 2000: 407: 233-241.
192. Luster, AD. «Chemokines-chemotactic cytokines that mediate
inflammation.» *N Engl J Med*, 1998: 338: 436-445.

193. **M**acEwan, DJ. «TNF ligands and receptors - a matter of life and
death.» *Br J Pharmacol*, 2002: 135: 855-875.
194. Maeda, S, M Hayashi, S Komiya, T Imamura, y K Miyazono.
«Endogenous TGF-beta signaling suppresses maturation of osteoblastic
mesenchymal cells.» *EMBO J*, 2004: 23: 552-563.
195. Mantovani, A, M Locati, A Vecchi, S Sozzani, y P Allavena. «Decoy
receptors: A strategy to regulate inflammatory cytokines and
chemokines.» *Trends Immunol*, 2001: 22: 328-336.
196. March, CJ, et al. «Cloning, sequence and expression of two distinct
human interleukin-1 complementary DNAs.» *Nature*, 1985: 315: 641-
647.

197. Marchais, SJ, AP Guerin, y GM London. «Arterial calcinosis. chronic renal failure and calcium antagonism.» *Drugs 44 Suppl*, 1992: 1: 119-122.
198. Martin, KJ, et al. «Paricalcitol dosing according to body weight or severity of hyperparathyroidism: A double-blind, multicenter, randomized study.» *Am J Kidney Dis*, 2001: 38: S57-S63.
199. Marui, N, et al. «Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through and antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells.» *J Clin Invest*, 1993: 92: 1866-1874.
200. Mason, J, AR Mason, y MJ Cork. «Topical preparations for the treatment of psoriasis: A systemic review.» *Br J Dermatol*, 2002: 146: 351-364.
201. Mathieu, C, y L Adorini. «The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D3 analogs as immunomodulatory agents.» *Trends Mol Med*, 2002: 8: 174-179.
202. Matin, KJ, y EA Gonzalez. «Metabolic bone disease in chronic kidney disease.» *J Am Soc Nephrol*, 2007: 18: 875-885.
203. Matsui, T, et al. «1,25-dihydroxyvitamin D3-regulated expression of genes involved in human T-lymphocyte proliferation and differentiation.» *Cancer Res*, 1986: 46: 5827-5831.
204. McCullough, PA, KM Chinnaiyan, V Agrawal, E Danielewicz, y GS Abela. «Amplification of atherosclerotic calcification and Monckeberg's sclerosis: a spectrum of the same disease process.» *Adv Chronic Kidney Dis*, 2008: 15: 396-412.
205. Mease, PJ. «Tumor necrosis factor (TNF) in psoriatic arthritis: Pathophysiology and treatment with TNF inhibitors.» *Ann Rheum Dis*, 2002: 61: 298-304.
206. Mecham, RP, TJ Broekelmann, CJ Fliszar, SD Shapiro, HG Welgus, y RM Senior. «Elastin degradation by matrix metalloproteinases: Cleavage site specificity and mechanisms of elastolysis.» *J Biol Chem*, 1997: 272: 18071-18076.
207. Mellon, WS, y HF Deluca. «An equilibrium and kinetic study of 1,25-dihydroxyvitamin D3 binding to chicken intestinal cytosol employing

- high specific activity 1,25-dehydroxy(3H-26,27) vitamin D3.» *Arch Biochem Biophys*, 1979: 197: 90-95.
208. Metha, A, B Yang, S Khan, JB Hendricks, C Stephen, y JL Metha. «Oxidized low density lipoproteins facilitate leukocyte adhesion to aortic intima without affecting endothelium-dependent relaxation: Role of P-selectin.» *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995: 15: 2076-2083.
209. Meuwese, CL, et al. «Trimestral variations of C-reactive protein, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha are similarly associated with survival in haemodialysis patients.» *Nephrol Dial Transplant*, 2011: 26: 1313-1318.
210. Michel, G, A Gailis, B Jarzebska-Deussen, A Muschen, A Mirmohammadsadegh, y T Ruzicka. «1,25-(OH)₂-vitamin D3 and calcipotriol induce IL-10 receptor gene expression in human epidermal cells.» *Inflamm Res*, 1997: 46: 32-34.
211. Micheletti, R, G Fishbein, J Currier, y M Fishbein. «Monckeberg sclerosis revisited: a clarification of the histologic definition of monckeberg sclerosis.» *Arch Pathol Lab Med*, 2008: 132: 43-47.
212. Mizobuchi, M, D Towler, y E Slatopolsky. «Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease.» *J Am Soc Nephrol*, 2009: 20: 1453-1464.
213. Moe, S, et al. «Role of calcification inhibitors in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease.» *Kidney Int*, 2005: 67: 2295-2304.
214. Moe, SM, D Duan, BP Doehle, KD O'Neill, y NX Chen. «Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels.» *Kidney Int*, 2003: 63: 1003-1011.
215. Moe, SM, et al. «Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins.» *Kidney Int*, 2002: 61: 638-647.
216. Moncek, F, G Aguilera, y D Jezova. «Insufficient activation of adrenocortical but not adrenomedullary hormones during stress in rats subjected to repeated immune challenge.» *J Neuroimmunol*, 2003: 142: 86-92.

217. Montes de Oca, A, et al. «High-phosphate-induced calcification is related to SM22a promoter methylation in vascular smooth muscle cells.» *J Bone Miner Res*, 2010: 25: 1996-2005.
218. Mora, JR, M Iwata, y UH von Andrian. «Vitamin effects on the immune system: Vitamins A and D take centre stage.» *Nat Rev Immunol*, 2008: 8: 685-698.
219. Muller, K, y K Bendtzen. «1,25-dihydroxyvitamin D3 as a natural regulator of human immune functions.» *J Invest Dermatol Symp Proc*, 1996: 1: 68-71.
220. Mundlos, S, et al. «Mutations involving the transcription factor Cbfa1 cause cleidocranial dysplasia.» *Cell*, 1997: 89: 773-779.
221. Murer, H, N Hernando, I Forster, y J Biber. «Regulation of Na/Pi transporter in the proximal tubule.» *Annu rev Physiol*, 2003: 65: 531-542.
222. **N**adra, I, et al. «Proinflammatory activation of macrophages by basic calcium phosphate crystals via protein kinase C and MAP kinase pathways: A vicious cycle of inflammation and arterial calcification?» *Circ Res*, 2005: 96: 1248-1256.
223. Nakamura, T, Y Mimura, K Uno, y M Yamakawa. «Parathyroid hormone activity increases during endotoxemia in conscious rats.» *Horm Metab Res*, 1998: 30: 88-92.
224. Nakanishi, I, et al. «Interleukin-8 in chronic failure and dialysis patients.» *Nephrolo Dial Transplant*, 1994: 9: 1434-1442.
225. Nakashima, K, et al. «The novel zincfinger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation.» *Cell*, 2002: 108: 17-29.
226. Naumovic, RT, LD Djukanovic, ZD Ramic, y VZ Ostric. «Relationship between IL-1beta and TNFalpha production by PBMC and clinical features of hemodialysis patients .» *Ren Fail*, 2000: 22: 195-204.
227. Nelken, NA, SR Coughlin, D Gordon, y JN Wilcox. «Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques.» *J Clin Invest*, 1991: 88: 1121-1127.

228. Ngo, DT, AL Sverdlov, JJ McNeil, y JD Horowitz. «Does vitamin D modulate asymmetric dimethylarginine and C-reactive protein concentrations?» *Am J Med*, 2010; 123: 335-341.
229. Niessner, A, et al. «Polymorphic membrane protein (PMP) 20 and PMP 21 of *Chlamydia pneumoniae* induce proinflammatory mediators in human endothelial cells in vitro by activation of the nuclear factor-kappa B pathway.» *J Infect Dis*, 2003; 188: 108-113.
230. Nishizawa, Y, H Morii, Y Ogura, y HF DeLuca. «Clinical trial of 26,26,26,27,27,27-hexafluoro-1,25-dihydroxyvitamin D3 in uremic patients on hemodialysis: Preliminary report.» *Contrib Nephrol*, 1991; 90: 96-2003.
231. Nogueras, S, et al. «Coupling of endothelial injury and repair: an analysis using an in vivo experimental model.» *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008; 294: H708-H713.
232. Noonan, W, et al. «Differential effects of vitamin D receptor activators on aortic calcification and pulse wave velocity in uraemic rats.» *Nephrol Dial Transplant*, 2008; 23: 3824-3830.
233. Norman, AW, J Roth, y L Orci. «The vitamin-D endocrine system-steroid-metabolism, hormone receptor, and biological response (calcium-binding proteins).» *Endocr Rev*, 1982; 3: 331-366.
234. Nykjaer, A, et al. «An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3.» *Cell*, 1999; 96: 507-515.

235. **O**'Brien, E, et al. «Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle, and endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques.» *Arterioscler Thromb*, 1994; 14: 1648-1656.
236. Oberg, BP, et al. «Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease.» *Kidney Int*, 2004; 65:1009-1016.
237. Odamaki, M, T Shibata, T Takita, y H Kumagai. «Serum fetuin-A and aortic calcification in hemodialysis patients.» *Kidney Int*, 2005; 68: 2915-2916.

238. Olson, TS, y K Ley. «Chemokines and chemokines receptors in leukocyte trafficking.» *Am J Physiol (Regul Integr Comp Physiol)*, 2002: 283: R7-R28.
239. Otto, F, et al. «Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development.» *Cell*, 1997: 89: 765-771.
240. Owens, G, M Kumar, y B Wamhoff. «Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease.» *Physiol Rev*, 2004: 84: 767-801.
241. **P**arhami, F, et al. «Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients.» *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997: 17: 680-687.
242. Pecoits-Filho, R, B Lindholm, y P Stenvinkel. «The malnutrition, inflammation, and atherosclerosis (MIA) syndrome - the heart of the matter.» *Nephrol Dial Transplant*, 2002: 17: 17: 28-31.
243. Pecoits-Filho, R, et al. «Association between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients.» *Am J Kidney Dis*, 2003: 41: 1212-1218.
244. Penna, G, y L Adorini. «1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation.» *J Immunol*, 2000: 164: 2405-2411.
245. Pennica, D, et al. «Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin.» *Nature*, 1984: 312: 724-729.
246. Perez, C, I Albert, K DeFary, N Zachariades, L Gooding, y M Kriegler. «A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact.» *Cell*, 1990: 63: 251-258.
247. Perez, RV, et al. «Pretransplant systemic inflammation and acute rejection after renal transplantation.» *Transplantation*, 2000: 69: 869-874.

248. Peterson, CA, y ME Heffernan. «Serum tumor necrosis factor-alpha concentrations are negatively correlated with serum 25(OH)D concentrations in healthy women.» *J Inflamm (Lond)*, 2008: 24: 5-10.
249. Pocok, G, y C Richards. *Fisiología humana: la base de la medicina, 2ª Edición*. España: Elsevier, 2005.
250. Poole, JC, y HW Florey. «Changes in the endothelium of the aorta and the behaviour of macrophages in experimental atheroma of rabbits.» *J Pathol Bacteriol*, 1958: 75: 245-251.
251. Prakash, M, S Kale, I Ghosh, GC Kundu, y K Datta. «Hyaluronan-binding protein 1 (HABP/p32/gC1qR) induces melanoma cell migration and tumor growth by NF-kappa B dependent MMP-2 activation through integrin alpha(v)beta(3) interaction.» *Cell Signal*, 2011: 23: 1563-1577.
252. Price, P, G Thomas, A Pardini, W Figueira, J Caputo, y M Williamson. «Discovery of a high molecular weight complex of calcium, phosphate, fetuin, and matrix gamma-carboxyglutamic acid protein in the serum of etidronate-treated rats.» *J Biol Chem*, 2002: 277: 3926-3934.
253. Price, P, T Nguyen, y M Williamson. «Biochemical characterization of the serum fetuin-mineral complex.» *J Biol Chem*, 2003: 278: 22153-22160.
254. Price, PA, SA Faus, y MK Williamson. «Warfarin-induced artery calcification is accelerated by growth and vitamin D.» *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000: 20: 317-327.
255. Provvedini, DM, CD Tsoukas, LJ Deftos, y SC Manolagas. «1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes.» *Science*, 1983: 221: 1181-1183.
256. **Q**uesada, JM. «Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral. Capítulo 6: Vitamina D.» 2004.
257. **R**einhold, F, K Hultenby, A Oldberg, y D Heinegard. «Osteopontin - a possible anchor of osteoclasts to bone.» *Proc Natl Acad Sci*, 1990: 87: 4473-4475.

258. Renkema, KY, RT Alexander, RJ Bindels, y JG Hoenderop. «Calcium and phosphate homeostasis: concerted interplay of new regulators.» *Ann Med*, 2008; 40: 82-91.
259. Rensen, S, P Doevendans, y GJ van Eys. «Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity.» *Neth Heart J*, 2007; 15: 100-108.
260. Reynolds, J, et al. «Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD.» *J Am Soc Nephrol*, 2004; 15: 2857-2867.
261. Ridker, PM, y P Haughe. «Prospective studies of C-reactive protein as a risk factor for cardiovascular disease.» *J Investig Med*, 1998; 46: 391-395.
262. Rifas, L. «T-cell cytokine induction of BMP-2 regulates human mesenchymal stromal cell differentiation and mineralization.» *J Cell Biochem*, 2006; 98: 706-714.
263. Rittling, S, et al. «Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro.» *J Bone Miner Res*, 1998; 13: 1101-1111.
264. Ross, R. «The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s.» *Nature*, 1993; 362: 801-809.
265. Russell, R, y H Fleisch. «Pyrophosphate, phosphonates and pyrophosphatases in the regulation of calcification and calcium homeostasis.» *Proc R Soc Med*, 1970; 63: 876.
266. Rutsch, F, et al. «PC-1 nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in idiopathic infantile arterial calcification.» *Am J Pathol*, 2001; 158: 543-554.

267. **S**adeghi, K, et al. «Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns.» *Eur J Immunol*, 2006; 36: 361-370.

268. Schafer, C, et al. «The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification.» *J Clin Invest*, 2003: 112: 357-366.
269. Schibler, D, R Russell, y H Fleisch. «Inhibition by pyrophosphate and polyphosphate of aortic calcification induced by vitamin D3 in rats.» *Clin Sci*, 1968: 35: 363-372.
270. Schiffrin, E, M Lipman, y J Mann. «Chronic kidney disease: Effects on the cardiovascular system.» *Circulation*, 2007: 116: 85-89.
271. Schleithoff, SS, A Zittermann, G Tenderich, HK Berthold, P Stehle, y R Koerfer. «Vitamin D supplementation improves cytokines profiles in patients with congestive heart failure: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial.» *Am J Clin Nutr*, 2006: 83: 754-759.
272. Schlieper, G, R Westenfeld, V Brandenburg, y M Ketteler. «Inhibitors of calcification in blood and urine.» *Semin Dial*, 2007: 20: 113-121.
273. Schluesener, H, y R Meyerman. «Immunolocalization of BMP-6, a novel TGF-beta-related cytokine, in normal and atherosclerotic smooth muscle cells.» *Atherosclerosis*, 1995: 113: 153-156.
274. Schoppet, M, C Shroff, L Hofbauer, y C Shanahan. «Exploring the biology of vascular calcification in chronic kidney disease: What's circulating?» *Kidney Int*, 2008: 73: 384-390.
275. Schwartz, CJ, AJ Valente, EA Sprague, JL Kelley, y RM Nerem. «The pathogenesis of atherosclerosis: An overview.» *Clin Cardiol*, 1991: 14: 11-16.
276. Schwarz, U, et al. «Morphology of coronary atherosclerotic lesions in patients with end-stage renal failure.» *Nephrol Dial Transplant*, 2000: 15: 218-223.
277. Shanahan, C. «Vascular calcification.» *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2005: 14: 361-367.
278. Shanahan, C, N Cary, J Salisbury, D Proudfoot, P Weissberg, y M Edmonds. «Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification.» *Circulation*, 1999: 100: 2168-2176.

279. Sharma, R, et al. «Elevated circulating levels of inflammatory cytokines and bacterial endotoxin in adults with congenital heart disease.» *Am J Cardiol*, 2003: 92: 188-193.
280. Sherratt, MJ, et al. «Fibrillin-rich microfibrils of the extracellular matrix: ultrastructure and assembly.» *Micron*, 2001: 32: 185-200.
281. Shin, V, A Zebboudj, y K Bostrom. «Endothelial cells modulate osteogenesis in calcifying vascular cells.» *J Vasc Res*, 2004: 41: 193-201.
282. Shioi, A, et al. «Induction of bone-type alkaline phosphatase in human vascular smooth muscle cells: roles of tumor necrosis factor alpha and oncostatin M derived from macrophages.» *Cir Res*, 2002: 91: 9-16.
283. Sigmundsdottir, H, et al. «DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to program T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27.» *Nat Immunol*, 2007: 8: 285-293.
284. Slatopolsky, E, J Finch, C Ritter, y F Takahashi. «Effects of 19-nor-1,25(OH)2D2, a new analogue of calcitriol, on secondary hyperparathyroidism in uremic rats.» *Am J Kidney Dis*, 1998: 32: S40-S47.
285. Sozzani, S, et al. «Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines.» *J Immunol*, 1997: 159: 1993-2000.
286. Speer, MY, y C Giachelli. «Regulation of cardiovascular calcification.» *Cardiovasc Pathol*, 2004: 13: 63-70.
287. Stary, HC. «Natural history of calcium deposits in atherosclerosis progression and regression.» *Z Kardiol 89 Suppl*, 2000: 2: 28-35.
288. Steitz, S, et al. «Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification.» *Am J Pathol*, 2002: 161: 2035-2046.
289. Steitz, S, et al. «Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers.» *Circ Res*, 2001: 89: 1147-1154.
290. Stenvinkel, P. «Inflammation in end-stage renal disease: The hidden enemy.» *Nephrology (Carlton)*, 2006: 11: 36-41.
291. Stenvinkel, P, O Heimbürger, y T Jogestrand. «Elevated interleukin-6 predicts progressive carotid atherosclerosis in dialysis patients:

- Association to Chlamydia pneumoniae seropositivity.» *Am J Kidney Dis*, 2002: 39: 274-282.
292. Stenvinkel, P, P Barany, O Heimbürger, R Pecoits-Filho, y B Lindholm. «Mortality, malnutrition, and atherosclerosis in ESRD: What is the role of interleukin-6?» *Kidney Int Suppl*, 2002: 80: 103-108.
293. Stenvinkel, P, et al. «IL-10, IL-6, and TNF- α : Central factors in the altered cytokine network of uremia- The good, the bad, and the ugly.» *Kidney Int*, 2005: 67: 1216-1233.
294. Stratford, N, K Britten, y P Gallagher. «Inflammatory infiltrates in human coronary atherosclerosis.» *Atherosclerosis*, 1986: 59: 271-276.
295. Suliman, ME, y P Stenvinkel. «Contribution of inflammation to vascular disease in chronic kidney disease patients.» *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 2008: 19: 329-345.
296. Suzuki, Y, T Ichiyama, A Ohsaki, S Hasegawa, M Shiraishi, y S Furukawa. «Anti-inflammatory effect of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3) in human coronary arterial endothelial cells: Implication for the treatment of Kawasaki disease.» *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2009: 113: 134-138.
297. **T**adic, T, et al. «Overexpression of Dlx5 in chicken calvarial cells accelerates osteoblastic differentiation.» *J Bone Miner Res*, 2002: 17: 1008-1014.
298. Taga, T, et al. «Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130.» *Cell*, 1989: 58: 573-581.
299. Takahashi, F, JL Finch, M Denda, AS Dusso, AJ Brown, y E Slatopolsky. «A new analog of 1,25(OH)D₃, 19-nor-1,25(OH)₂D₂, suppresses serum PTH and parathyroid gland growth in uremic rats without elevation of intestinal vitamin D receptor content.» *Am J Kidney Dis*, 1997: 30: 105-112.
300. Takahashi, T, M Kubota, T Nakamura, I Ebihara, y H Koide. «Interleukin-6 gene expression in peripheral blood mononuclear cells from patients undergoing hemodialysis or continuous ambulatory peritoneal dialysis.» *Ren Fail*, 2000: 22: 345-354.

301. Takemoto, F, et al. «Gene expression of vitamin D hydroxylase and megalin in the remnant kidney of nephrectomized rats.» *Kidney Int*, 2003: 64: 414-420.
302. Tallon, S, et al. «Relative effects of PTH and dietary phosphorus on calcitriol production in normal and azotemic rats.» *Kidney Int*, 1996: 49: 1441-1446.
303. Tanaka, T, et al. «Runx2 represses myocardin-mediated differentiation and facilitates osteogenic conversion of vascular smooth muscle cells.» *Mol Cell Biol*, 2008: 28: 1147-1160.
304. Tintut, Y, J Patel, F Parhami, y LL Demer. «Tumor necrosis factor-alpha promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway.» *Circulation*, 2000: 102: 2636-2642.
305. Tintut, Y, J Patel, M Territo, T Saini, F Parhami, y LL Demer. «Monocyte/macrophage regulation of vascular calcification in vitro.» *Circulation*, 2002: 105: 650-655.
306. Tintut, Y, et al. «Multilineage potential of cells from the artery wall.» *Circulation*, 2003: 108: 2505-2510.
307. Tipping, PG, y WW Hancock. «Production of tumor necrosis factor and interleukin-1 by macrophages from human atheromatous plaques.» *Am J Pathol*, 1993: 142: 1721-1728.
308. Tobler, A, J Gasson, H Reichel, AW Norman, y HP Koeffler. «Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Sensitive and receptor-mediated regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in normal peripheral blood lymphocytes.» *J Clin Invest*, 1987: 79: 1700-1705.
309. Tonelli, M, F Sacks, M Pfeffer, G Jhangri, y G Curhan. «Biomarkers of inflammation and progression of chronic kidney disease.» *Kidney Int*, 2005: 68: 237-245.
310. Toribio, RE, CW Kohn, J Hardy, y TJ Rosol. «Alterations in serum parathyroid hormone and electrolyte concentrations and urinary excretions of electrolytes in horses with induced endotoxemia.» *J Vet Intern Med*, 2005: 19: 223-231.
311. Townsend, K, KN Evans, MJ Campbell, KW Colston, JS Adams, y M Hewison. «Biological actions of extra-renal 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase and implications for chemoprevention and treatment.» *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005: 97: 103-109.

312. Townsend, MJ, PG Fallon, DJ Matthews, HE Jolin, y ANJ McKenzie. «T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses.» *J Exp Med*, 2000: 191: 1069-1075.
313. Tripepi, G, F Mallamaci, y C Zoccali. «Inflammation markers, adhesion molecules, all-cause and cardiovascular mortality in patients with ESRD: Searching for the best risk marker by multivariate modeling.» *Am Soc Nephrol*, 2005: 16: 83-88.
314. Tyson, KL, JL Reynolds, R McNair, Q Zhang, PL Weissberg, y CM Shanahan. «Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification.» *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003: 23: 489-494.
315. **U**yemura, K, et al. «Cross-regulatory roles of interleukin (IL)-12 and IL-10 in atherosclerosis.» *J Clin Invest*, 1996: 97: 2130-2138.
316. **V**an der Wal, AC, PK Das, AJ Tigges, y AE Becker. «Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions.» *Am J Pathol*, 1992: 141: 1427-1433.
317. van Etten, E, y C Mathieu. «Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: Basic concepts.» *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005: 97: 93-101.
318. Vandenabeele, P, W Declercq, R Beyaert, y W Fiers. «Two tumor necrosis factor receptors: structure and function.» *Trends Cell Biol*, 1995: 5: 392-399.
319. Veldman, CM, MT Cantorna, y HF DeLuca. «Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in the immune system.» *Arch Biochem Biophys*, 2000: 374: 334-338.
320. Vilarrasa, N, et al. «Is plasma 25(OH)D related to adipokines, inflammatory cytokines and insulin resistance in both a healthy and morbidly obese population?» *Endocrine*, 2010: 38: 235-242.

321. Villa-Bellosta, R, M Levi, y V Sorribas. «Vascular smooth muscle cell calcification and SLC20 inorganic phosphate transporters Effects of PDGF, TNF-alpha, and Pi.» *Pflugers Arch*, 2009: 458: 1151-1161.
322. Villa-Bellosta, R, y V Sorribas. «Phosphonoformic acid prevents vascular smooth muscle cell calcification by inhibiting calcium-phosphate deposition.» *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009: 29: 761-766.
323. Villa-Bellosta, R, YE Bogaert, M Levi, y V Sorribas. «Characterization of phosphate transport in rat vascular smooth muscle cells. Implications for vascular calcification.» *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007: 27: 1030-1036.
324. von der Thusen, JH, J Kuiper, TJ van Berkel, y EA Biessen. «Interleukins in atherosclerosis: Molecular pathways and therapeutic potential.» *Pharmacol Rev*, 2003: 55: 133-166.
325. **W**aehre, T, et al. «Increased expression of interleukin-1 in coronary artery disease with downregulatory effects of HMG-CoA reductase inhibitors.» *Circulation*, 2004: 109: 1966-1972.
326. Wang, N, et al. «Radial artery calcification in end-stage renal disease patients is associated with deposition of osteopontin and diminished expression of alpha-smooth muscle actin.» *Nephrology (Carlton)*, 2008: 13: 367-375.
327. Wang, Z, y WH Newman. «Smooth muscle cell migration stimulated by interleukin 6 is associated with cytoskeletal reorganization.» *J Surg Res*, 2003: 111: 261-266.
328. Welch, TR, LW Blystone, y WH Bergstrom. «Nonparathyroid hormone mediated calcium resorption in a rat model of immune glomerulonephritis.» *J Lab Clin Med*, 2005: 146: 174-178.
329. Wetmore, J, A Hung, D Lovett, S Sen, O Quershy, y K Johansen. «Interleukin-1 gene cluster polymorphisms predict risk of ESRD.» *Kidney Int*, 2005: 68: 278-284.
330. Williams, CJB. «Cod-liver oil in phthisis.» *Lond J Med*, 1849: 1: 1-18.

331. **Y**ang, H, G Curinga, y C Giachelli. «Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro.» *Kidney Int* , 2004: 66: 2293-2299.
332. Yao, S, V Prpic, F Pan, y GE Wise. «TNF-alpha upregulates expression of BMP-2 and BMP-3 genes in the rat dental follicle- Implications for tooth eruption.» *Connect Tissue Res*, 2010: 51: 59-66.
333. Yee, YK, SR Chintalacheruvu, J Lu, y S Nagpal. «Vitamin D receptor modulators for inflammation and cancer.» *Mini Rev Med Chem*, 2005: 5: 761-778.
334. Yu, Z, K Seya, K Daitoku, S Motomura, I Fukuda, y K Furukawa. «Tumor necrosis factor alpha accelerates the calcification of human aortic valve interstitial cells obtained from patients with calcific aortic valve stenosis via the BMP2-Dlx5 pathway.» *J Pharmacol Exp Ther*, 2011: 337: 16-23.
335. **Z**ehnder, D, et al. «Reduction of the vitamin D hormonal system in kidney disease is associated with increased renal inflammation.» *Kidney Int*, 2008: 74: 1343-1353.
336. Zhang, H, et al. «Analysis of SM22a deficient mice reveals unanticipated insights into smooth muscle cell differentiation and function.» *Mol Cell Biol*, 2001: 21: 1336-1344.
337. Zhang, Y, et al. «Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1.» *J Immunol*, 2012: 188: 2127-2135.
338. Zimmermann, J, S Herrlinger, A Pruy, T Metzger, y C Wanner. «Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients.» *Kidney Int*, 1999: 55: 648-658.
339. Zittermann, A, JF Gummert, y J Borgermann. «Vitamin D deficiency and mortality.» *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2009: 12: 634-639.
340. Zoccali, C, et al. «Chlamydia pneumoniae, overall and cardiovascular mortality in end-stage renal disease (ESRD).» *Kidney Int*, 2003: 64: 579-584.

