

Nuevos avances en la fisiopatología de las alteraciones del metabolismo mineral

Y. Almadén¹, M. Rodríguez¹, A. Canalejo²

¹ Unidad de Investigación. Servicio de Nefrología. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.

² Departamento de Biología Ambiental y Salud Pública. Facultad de Ciencias Experimentales. Córdoba

Nefrología 2009;29(Sup. Ext. 5):33-40.

RESUMEN

La homeostasia ión-mineral está estrechamente controlada por numerosos factores endocrinos que coordinadamente ejercen efectos sobre diferentes órganos diana, como el intestino, el riñón, el hueso y las glándulas paratiroides para mantener el balance fisiológico del fósforo y el calcio. Los estudios experimentales más recientes relacionados con la fisiopatología de las alteraciones del metabolismo mineral se han centrado principalmente en tres líneas: a) el hiperparatiroidismo secundario, proporcionando nuevos datos sobre los mecanismos involucrados en la regulación de la secreción de hormona paratiroidea (PTH) y el desarrollo de la hiperplasia de las glándulas paratiroides; b) el papel del eje FGF23-klotho, tanto en la reabsorción renal de fósforo como en la función paratiroidea y la formación del hueso, lo que lo convierte en un regulador integral de la homeostasia tanto del fósforo como del calcio, y c) las calcificaciones vasculares asociadas a la insuficiencia renal, en las que se evalúa la implicación directa del fósforo en el proceso de transformación osteoblástica de las células vasculares de músculo liso y la importancia de la apoptosis y del receptor de calcio.

En esta revisión se resumen algunas de las aportaciones más interesantes presentadas en el último año en relación con estos aspectos.

Palabras clave: Metabolismo mineral. Hiperparatiroidismo secundario. FGF23. Klotho. Calcificaciones vasculares.

SUMMARY

Ion-mineral homeostasis is tightly governed by many endocrine factors which co-ordinately exert their effects on different target organs such as intestine, kidney, bone and parathyroid glands to maintain the physiological balance of phosphorus and calcium. Recent experimental studies on the pathophysiology of the alterations of mineral metabolism have focused mainly in three lines: a) the secondary hyperparathyroidism, showing new data on the mechanisms involved in the regulation of the PTH secretion and the development of the parathyroid hyperplasia; b) the role of the FGF23-klotho axis, not only in the phosphorus re-absorption in the kidney, but also in the parathyroid function and bone formation, which leads it to be considered as a regulator that integrates both phosphorus and calcium homeostasia, and c) the vascular calcifications secondary to renal insufficiency, in which the key role of phosphorus in the osteoblastic-like differentiation of the vascular smooth muscle cells and the involvement of the apoptosis and the calcium-sensing receptor are being unveiling. This review briefly summarizes a number of interesting studies on these topics reported in the last year.

Key words: Mineral metabolism. Secondary hyperparathyroidism. FGF23. Klotho. Vascular calcifications.

INTRODUCCIÓN

La homeostasia ión-mineral está estrechamente controlada por numerosos factores endocrinos que coordinadamente

ejercen efectos sobre diferentes órganos diana, como el intestino, el riñón, el hueso y las glándulas paratiroides para mantener el balance fisiológico del fósforo (P) y del calcio (Ca). Si bien la hiperfosfatemia es conocida desde hace décadas como un importante factor etiopatogénico de las alteraciones del metabolismo mineral, en los últimos años ha cobrado un considerable protagonismo. Y ello es debido a que ha dejado de considerarse solamente como una toxina urémica, con

Correspondencia: Yolanda Almadén Peña
Unidad de Investigación.
Hospital Reina Sofía. Córdoba.

efectos deletéreos sobre numerosas funciones fisiológicas de los enfermos con insuficiencia renal, para convertirse, *per se*, en un factor de riesgo de morbilidad y mortalidad no sólo de estos enfermos, sino de la población general. Todo ello ha propiciado una acelerada actividad experimental y clínica que ha desembocado en un conocimiento más profundo, a nivel celular y molecular, de algunos aspectos relacionados con el metabolismo mineral, como el hiperparatiroidismo (HPT) secundario, el descubrimiento de las fosfatonas y el papel del eje FGF23-*klotho* y el desarrollo de las calcificaciones vasculares (CV). A continuación se resumen algunas de las aportaciones más interesantes presentadas en el último año en relación con estos aspectos.

HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO

En los pacientes urémicos existen una serie de factores relacionados con las alteraciones del metabolismo mineral, la retención de fósforo, la deficiencia de calcitriol y la tendencia a la hipocalcemia, que son responsables del desarrollo del HPT secundario. Éste se caracteriza por un aumento de los niveles séricos de PTH e hiperplasia de las glándulas paratiroides (GP), en las que la expresión de los receptores de calcio (RCa) y de la vitamina D (VDR) se encuentra reducida¹.

El abordaje experimental extensivo realizado en los últimos 15 años en este campo ha permitido el desarrollo de estrategias terapéuticas muy efectivas para el control del HPT. No obstante, aún persiste un interés evidente por descifrar los mecanismos fisiopatológicos del HPT secundario. Principalmente, los relacionados con la regulación de la secreción de la PTH y de la expresión de los RCa y VDR (dado su papel en la eficiencia de los tratamientos terapéuticos), los que conducen a la inducción y desarrollo de la hiperplasia de las GP (con vistas a su posible prevención y/o regresión), y el papel del eje FGF23-*klotho* en la regulación de la función paratiroidea, de plena actualidad.

En un trabajo presentado en la reunión de la ASN 2008, Néchama et al.² abordaron diversos experimentos para caracterizar el efecto de la prolil-isomerasa Pin1, que se une a AUF1 disminuyendo su capacidad de estabilizar el ARNmPTH y, por tanto, determina una reducción en los niveles de PTH. Así, se muestra que ratones Pin1^{-/-} presentan niveles elevados de PTH sin cambios en el Ca y el P, y que el silenciamiento de Pin1 mediante siRNA aumenta la expresión génica de la PTH. Además, en extractos de GP de ratas con HPT secundario experimental, los niveles de Pin1 están reducidos, lo que sugiere que Pin1 determina los niveles basales de expresión génica y secreción de la PTH y su regulación en el HPT secundario. Asimismo, en otro estudio³ el mismo grupo evaluó el efecto del silenciamiento específico de los VDR en las glándulas paratiroides sobre la regulación de la PTH. Para

ello, generaron ratones KO GP-VDR^{-/-} en los que se observó una reducción de la expresión de los VDR de las GP, un aumento en los niveles de PTH (sin cambios en el Ca o el P), un incremento de la resorción ósea y un aumento de la PTH basal y desplazamiento hacia la izquierda del *set point*.

Por otro lado, Arcidiacono et al.⁴ profundizaron en el estudio del papel del sistema autocrino del factor de crecimiento tumoral y su receptor (TGF- α /EGFR) en las células paratiroides descrito previamente. La expresión elevada del factor transformador de crecimiento alfa (TGF- α) reguló al alza su expresión y la de su receptor, siendo un paso clave en la inducción de la hiperplasia paratiroidea y la reducción de los niveles de VDR en un modelo de ratas urémicas. En un estudio posterior⁵, analizaron el papel de la proteína activadora 2 α (AP2), un inductor de la transcripción de TGF- α , y que, a su vez, resultó ser regulada al alza de forma TGF- α /EGFR-dependiente, ampliando un ciclo de retroalimentación que determina la severidad de la hiperplasia en el HPT secundario. Este mismo grupo⁶ evaluó la implicación de las alteraciones epigenéticas asociadas a la uremia en la resistencia a la vitamina D en las GP: reducción de la expresión del VDR y, por tanto, de otros genes regulados por CTR/VDR. Para ello, analizaron la desacetilación de las histonas utilizando un inhibidor de la enzima histona-desacetilasa (Trichostatin A: TSA). En cultivos primarios de células paratiroides hiperplásicas humanas (pacientes con HPT secundario), el tratamiento combinado con TSA + CTR resultó en un aumento de la expresión de VDR, CaSR, p21 y p27 (a nivel de proteína). *In vivo*, en ratas urémicas (5/6Nx), la combinación de TSA + CTR durante 2 semanas fue capaz de reducir el peso de las GP (en un 50%), la PTH (en un 60%) y el contenido del calcio aórtico (en un 90%), en comparación con el vehículo o por separado. La eficacia en la reversión de la resistencia a la vitamina D obtenida con TSA lleva a los autores a considerar su potencial terapéutico en el tratamiento del HPT secundario.

Uno de los aspectos más controvertidos en relación a la hiperplasia paratiroidea es su posible control, preventivo y/o terapéutico, mediante el uso de activadores del VDR (vitamina D y derivados). En un estudio publicado este año, Taniguchi et al.⁷ abordan la prevención de la hiperplasia paratiroidea en estadios tempranos de la insuficiencia renal (IR) mediante el tratamiento con calcitriol (CTR). Para ello, se administraron a pacientes en hemodiálisis con hiperparatiroidismo moderado dosis diarias de CTR iv. u oral durante 12 meses. En ambos grupos se obtuvieron valores semejantes de reducción de la PTH y de hipercalcemia, sin cambios en el P, pero solamente el CTR iv. previno el incremento en el volumen glandular (ultrasonografía) y mantuvo estables los marcadores del metabolismo óseo. La reducción del tamaño de las GP hiperplásicas debe ocurrir mediante la inducción de la apoptosis. Algunos estudios previos describieron la inducción de apoptosis mediante la inyección directa de vitamina D o sus deri-

vados⁸, pero otros ofrecieron resultados contrarios⁹. Shiizaki et al.¹⁰ abordaron la posible regresión de la hiperplasia paratiroidea una vez establecida en un modelo de ratas urémicas (5/6 Nx + HPD, 12 semanas) mediante dos inyecciones consecutivas directas en las GP con CTR o sus análogos maxacalcitol, paracalcitol y doxercalciferol. Todos los tratamientos indujeron apoptosis, por lo que podrían ser efectivos en el tratamiento del HPT secundario.

El estudio de los mecanismos de acción de los agentes terapéuticos del HPT secundario constituye otra fuente de conocimiento básico acerca de la función paratiroidea. Estudios previos han mostrado que los CM presentan un efecto inhibitor del desarrollo de la hiperplasia de las GP¹¹. Además, son capaces de regular al alza la expresión de los RCa y VDR¹²; sin embargo, aún no está claro si este efecto es directo o una consecuencia del control de la proliferación celular. En un estudio de nuestro grupo¹³, se observó que el tratamiento de ratas urémicas con el CM AMG641 a corto plazo estimuló directamente la expresión de los RCa y VDR antes de controlar la proliferación celular de las GP.

EL EJE FGF23-KLOTHO

Históricamente la homeostasia sistémica del P y del Ca se ha considerado desde la perspectiva del eje PTH/Vit D. Sin embargo, en los últimos años se ha identificado un grupo de hormonas denominadas fosfatonas, involucradas en la regulación del balance de P¹⁴. La más estudiada es el FGF23, que se produce en el hueso y que tiene al riñón como su principal diana¹⁵. En respuesta a niveles elevados de P, el FGF23 reduce la reabsorción renal del P (disminuyendo la expresión del transportador NPT-2a a nivel del túbulo contorneado proximal, TCP), favoreciendo su excreción¹⁶. Además, la vitamina D estimula la producción de FGF23, el cual, mediante un mecanismo de retroalimentación negativa, inhibe la síntesis de vitamina D a nivel renal¹⁷. Asimismo, actúa sobre las glándulas paratiroides inhibiendo la secreción de PTH¹⁸. El efecto del FGF23 sobre las células diana tiene lugar a través de su unión específica con un receptor (FGFR) y de *klotho*, un cofactor esencial para la unión del FGF23 al receptor¹⁹. Los órganos diana del FGF23 están, por tanto, teóricamente definidos por la coexpresión de la forma de membrana *klotho* y del FGFR (1, 3 y 4).

Además de su papel como mediador del efecto del FGF23, *klotho* tiene otras funciones específicas e independientes de FGF23. A nivel del túbulo contorneado proximal, la producción de *klotho* es inducida en respuesta a un descenso en los niveles de calcio para mediar un rápido reclutamiento a la membrana celular de la bomba Na⁺, K⁺-ATPasa²⁰. El gradiente de Na⁺ creado permite un cotransporte de Ca mediante un antiporte Na⁺/Ca²⁺. A nivel del túbulo contorneado distal, re-

gula la absorción de calcio aumentando la expresión de los canales TRPV5. Además, en las GP regula la secreción de PTH mediante el mantenimiento de un gradiente electroquímico análogo al descrito anteriormente²¹. *Klotho* facilita el reclutamiento de la bomba Na⁺,K⁺-ATPasa en la membrana de la célula paratiroidea, favoreciendo la liberación de la PTH.

Si bien es conocido que el FGF23 regula la expresión del NPT-2a en el TCP, el segmento tubular que responde específicamente al FGF23 y el receptor o receptores fisiológicamente relevantes aún están por aclarar. En un estudio presentado en la ASN, Gattineni et al.²² detectaron en el TCP la expresión del FGF 1, 3 y 4. Además, estudiaron la homeostasia del P en varias líneas de ratones KO de los FGFR (R1^{-/-}, R3^{-/-} y R4^{-/-}). En condiciones basales, los niveles de P y de expresión renal del NPT-2a fueron normales, lo que sugiere la existencia de algún tipo de mecanismo compensador. Sin embargo, el tratamiento de estos ratones con FGF23 determinó que sólo en los ratones R3^{-/-} se observara una reducción del P sérico y del NPT-2a, pero no en los R1^{-/-} y R4^{-/-}, lo que sugiere que FGFR 1 y 4 estarían implicados en la regulación por FGF23 de la reabsorción de P en el TCP.

En otro interesante estudio, Liu et al.²³ localizaron el FGFR3 y el NPT-2a, pero no *klotho*, en el TCP, mientras que en el túbulo contorneado distal (TCD) localizaron los FGFR 1, 3 y 4, así como *klotho* y TRPV5. La inyección con FGF23 indujo una respuesta de translocación nuclear de Egr1 (un ensayo de respuesta funcional del FGFR) en el TCD, pero no en el TCP. Asimismo, la deficiencia de FGFR3 y FGFR4 en ratones *Hyp* no los rescató de la hipofosfatemia dependiente de FGF23. Esto demuestra que éstos no son los receptores funcionales de FGF23, por lo que su efecto tendría lugar a través del FGFR1:*klotho* en el TCD. Puesto que el NPT-2a se encuentra en el TCP, estos autores proponen la existencia de un nuevo mecanismo de retroalimentación (*feedback*) TCD-TCP que incluiría un factor paracrino dependiente de FGF23. Por otro lado, Tatsumi et al.²⁴, mediante el estudio de la actividad transcripcional de un gen reportero conjugado con la región promotora del NaPi-2c en una línea celular de TCP, hallaron que la expresión de este transportador es regulada al alza por la vitamina D en humanos (presentan VDRE en la región promotora del gen), pero no en ratones.

Es conocido que la reabsorción renal de P tiene lugar en el TCP vía NPT-2 α y NPT-2c, cuya abundancia es regulada por factores circulantes y por el P de la dieta. No obstante, en ratones KO de éstos, se observó que aún se mantiene cierta capacidad de reabsorción, lo que sugiere la participación de otro tipo de transportador. Posibles candidatos son el PiT-1 y PiT-2, de expresión ubicua, incluido el riñón. Ravera et al.²⁵ han evaluado la expresión de éstos ante diferentes condiciones de P en la dieta. El cambio de una dieta de alto P a otra de bajo P

produjo un aumento (a las 8 h) de la expresión de NPT-2a y PiT-2, mientras que el cambio de dieta de bajo P a la de alto P indujo un rápido descenso (a las 2 h) de NPT-2a, pero más lento (a las 8 h) del PiT-2. En ambos casos, PiT-1 no se modificó. Por tanto, la expresión de PiT-2, que es regulada por el P de la dieta, aparece como un candidato potencial para mediar la reabsorción de P bajo condiciones de privación aguda de P.

Durante el último año, algunos estudios también han abordado el análisis funcional de la propia molécula de FGF23. Yamazi et al.²⁶ analizaron el mecanismo de acción de FGF23 mediante el uso de anticuerpos monoclonales anti-FGF23 capaces de neutralizar su efecto, *in vivo* e *in vitro*, uniéndose diferencialmente a la región N-terminal (anticuerpo FN1) o C-terminal (anticuerpo FC1). Los resultados demostraron que estas regiones son responsables de la unión de FGF23 al FGFR y *klotho*, respectivamente y, por tanto, de su actividad. Por su parte, Hu et al.²⁷ evaluaron la actividad de diferentes péptidos recombinantes derivados del FGF23. La región C-t de unión al complejo *klotho*/FGFR (aa 179-251, si bien se pudo refinar hasta aa180-200), funcionó como un antagonista de FGF23. Así, en experimentos *in vivo* en los que se inyectaban diferentes fragmentos de FGF23, FGF23 28-251 funcionó como agonista e indujo hipofosfatemia y redujo la expresión de NPT2a y NPT2c, mientras que FGF23 179-251 provocó hiperfosfatemia y un aumento de la expresión de estos transportadores. Para demostrar que se trataba de efectos directos sobre el epitelio, se analizó *in vitro* la captación de P por una línea celular derivada del TCP; sólo los péptidos C-t, que por sí mismos no alteraban la captación de P, impedían el efecto inhibitorio del FGF23 sobre la captación de P. Esta capacidad de los fragmentos C-t de actuar como antagonistas de FGF23, y producir retención de P, ofrece un potencial terapéutico.

Se conoce que niveles elevados de FGF23 dan lugar al desarrollo de raquitismo y osteomalacia. Sin embargo, aún no está claro si el FGF23 podría tener un papel local y directo en la formación del hueso, donde se produce. En este sentido, Sitara et al.²⁸ han estudiado ratones KO dobles mutantes FGF23^{-/-}/NPT-2a^{-/-}, encontrando que en éstos la hiperfosfatemia propia de los animales FGF23^{-/-} fue revertida a hipofosfatemia; sin embargo, las alteraciones esqueléticas aún se mantenían, lo que implica que la diferenciación condrocítica y la mineralización ósea aparecen reguladas directamente por FGF23 de forma independiente de la homeostasia del P. En otro estudio, Wang et al.²⁹ sobreexpresaron FGF23 humano durante el desarrollo osteoblástico en cultivos de células calvarias de ratas fetales y durante la formación de hueso en cultivos de hueso parietal. Los resultados sugieren que la sobreexpresión de FGF23 es capaz de inhibir tanto la diferenciación osteoblástica como la mineralización de la

matriz, independientemente de sus efectos sistémicos sobre la homeostasia del P.

Como ya se indicó anteriormente, el posible papel del eje FGF23-*klotho* en la función paratiroidea es uno de los aspectos más novedosos y que abre nuevas expectativas relacionadas con las fosfatoninas. Dado que ya se ha descrito la participación de *klotho* y la bomba Na⁺, K⁺-ATPasa en la secreción de PTH regulada por calcio²⁰. Hofman-Bang et al.³⁰ han estudiado su expresión en condiciones urémicas en un modelo de insuficiencia renal en ratas (5/6Nx + dieta de alto P). A las 8 semanas, estos animales (con hipocalcemia e hiperfosfatemia) tenían niveles elevados de expresión de PTH, *klotho* y Na⁺, K⁺-ATPasa, y niveles reducidos de VDR y RCa. Ello sugiere que el aumento de la actividad de *klotho* y Na⁺, K⁺-ATPasa podría constituir un mecanismo inductor del aumento de la PTH en la uremia. Por otro lado, Brownstein et al.³¹ han descrito en un paciente un síndrome que incluía, de forma simultánea, raquitismo hipofosfatémico, hiperparatiroidismo (hiperplasia GP) y otras anomalías óseas. El análisis molecular determinó que la causa era una mutación (translocación) que implica un aumento importante de los niveles plasmáticos de α -*klotho* que, inesperadamente, se acompañó de niveles de FGF23 circulante también elevados. Ello sugiere que los niveles elevados de α -*klotho* mimetizan la respuesta normal a la hiperfosfatemia, así como una implicación de α -*klotho* en la regulación de la función y masa paratiroidea.

LAS CALCIFICACIONES VASCULARES

Numerosas alteraciones del metabolismo mineral en los pacientes urémicos favorecen el desarrollo de calcificaciones vasculares (CV). Entre ellas cabe destacar la hiperfosfatemia, aumento del producto calcio x fósforo, uso de captadores de fósforo que contienen calcio y el tratamiento del hiperparatiroidismo con dosis excesivas de vitamina D. Por ello, el control del hiperparatiroidismo sin producir calcificaciones vasculares ha sido y sigue siendo un reto para los nefrólogos.

Durante muchos años se consideró que las calcificaciones vasculares eran el resultado de un proceso pasivo de la deposición de sales, consecuencia de la sobresaturación por aumento de las concentraciones de calcio y fósforo. Sin embargo, en la actualidad se sabe que la calcificación vascular es un proceso activo regulado a nivel celular y por ciertos componentes del plasma³². Existen proteínas que inhiben la calcificación vascular, como osteopontina (OPN), *matrix Gla-protein* (MGP), fetuina, osteoprotegerina (OPG), etc.; y otras que favorecen las calcificaciones, como la fosfatasa alcalina (PA), osteocalcina (OC), osteonectina (ON), *bone matrix protein 2a* (BMP 2a), etc. Es evidente que en enfermos renales los mecanismos de inhibición de la calcificación son superados por aquellos que promueven la calcificación. El proceso de calci-

ficación organizada de la pared vascular («osificación») requiere: 1) pérdida de inhibidores de la CV; 2) «diferenciación osteoblástica» de las células de músculo liso de la pared vascular (VSMC); 3) liberación de núcleos de mineralización derivados fundamentalmente del remodelado óseo, y 4) la producción de *debris* y cuerpos apoptóticos derivados del proceso de muerte de células de la pared vascular³³.

Sin duda, éste es el campo relacionado con el metabolismo mineral que más atención ha concentrado en los últimos años, generando una ingente cantidad de información, desde el nivel molecular al clínico que, como las piezas de un complejo rompecabezas habrá que ir encajando y que desembocará en el establecimiento de nuevas dianas y armas terapéuticas.

Uno de los aspectos que más atención recibe es el estudio de los procesos que determinan la transformación osteoblástica de las VSMC, especialmente los mecanismos moleculares involucrados en el papel del P como desencadenante de este proceso. En las VSMC, los niveles elevados de P favorecen la entrada de P activando el transportador Pit-1³⁴. Los niveles elevados de Ca extracelular también estimulan la síntesis de ARNmPit-1³⁵. El incremento en el P intracelular da lugar, por un lado, a la activación de factores propios de diferenciación osteoblástica y, por otro, a un incremento en la carga de P en las vesículas de la matriz. Ambas situaciones favorecen la mineralización ósea en la matriz extracelular. Además, los niveles elevados de P y Ca extracelulares, vía termodinámica, contribuyen al desarrollo de las CV.

En el último año diversos estudios han abordado este tema. Así, en cultivos primarios de VSMC derivadas de aortas humanas ateroscleróticas, Mathews et al.³⁶ describen una expresión elevada de genes relacionados con la activación osteoblástica, como BMP-2 y RUNX2 (Cbf1a). Sin embargo, en los cultivos solamente se producía calcificación en presencia de niveles elevados de P (y no en su ausencia) mediante un mecanismo dependiente de la activación de otro factor transcripcional osteoblástico: osterix. La inhibición de osterix mediante tecnología siRNA, evitaba la mineralización *in vitro*. *In vivo*, en un modelo de CV asociadas a CDK (ratones ateroscleróticos LDLR^{-/-} con dietas de alto contenido en grasas), las CV solamente se producían una vez inducida la disfunción renal y desarrollada la hiperfosfatemia, lo que provocaba la activación de osterix. Resulta interesante destacar que el tratamiento con un quelante oral de P (sevelamer) revertió la CV, llevando la expresión de RUNX2 y osterix aórticos a niveles inferiores a los encontrados en las aortas de ratones *sham* controles. Asimismo, Li et al.³⁷, estudiaron a fondo los mecanismos que median el efecto procalcificante de BMP-2 en cultivos de VSMC humanas. BMP-2 no fue capaz de inducir calcificación en condiciones normales de P, pero sí aumentó la

calcificación inducida por alto P, lo que tiene lugar a través de un aumento en la expresión de RUNX2 y Pit-1 (con el consiguiente aumento de la captación de P) y una reducción de la de SM22 α .

En una serie de interesantes estudios realizados en pacientes pediátricos en prediálisis y diálisis, Shroff et al.³⁸ hallaron que en prediálisis ya existe una carga elevada de Ca en los vasos, como en el grupo de diálisis, pero solamente en este último se observó afectación vascular y CV, que se acompañaban de la expresión de marcadores de transformación osteoblástica, como elevada actividad fosfatasa alcalina, RUNX2 y osterix, y de la inducción de apoptosis. En otro estudio³⁹, este mismo grupo analizó *in vitro* la mayor susceptibilidad de las arterias de estos pacientes a sufrir CV. En cultivos de anillos vasculares expuestos a condiciones calcificantes por alto P o Ca + P, hallaron que la carga de calcio en los anillos de los enfermos en prediálisis y hemodiálisis está aumentada respecto a la de los controles, y que ello se acompañó de una inducción de apoptosis (más acusada en el grupo de diálisis). Asimismo, la incubación con ZVAD, un inhibidor de las caspasas, redujo la apoptosis e inhibió la CV, lo que refuerza la idea de que la inducción de la apoptosis de las VSMC y la generación asociada de vesículas de membrana es un paso clave en el inicio de las CV asociadas a la diálisis.

La TNAP (fosfatasa alcalina no específica de tejido) es una enzima procalcificante que hidroliza (elimina) el pirofosfato, un potente inhibidor de las CV. En aortas de ratas urémicas Lomashvili KA et al.⁴⁰ observaron niveles incrementados de la actividad TNAP. Asimismo, en cultivos de anillos de aorta, el tratamiento con levamisol, inhibidor no específico de la actividad fosfatasa alcalina, redujo la hidrólisis del pirofosfato, como también ocurría en ratones TNAP^{-/-}. Por el contrario, la actividad TNAP y la hidrólisis de pirofosfato se encontró estimulada en anillos de aorta de animales urémicos, así como en anillos de animales normales incubados con plasma de ratas urémicas. Estos resultados sugieren la existencia de un factor circulante asociado a la uremia capaz de regular el desarrollo de las CV a través de la modulación de la actividad TNAP, la cual aparece como potencial diana terapéutica.

Los estudios experimentales sobre el tratamiento de las CV (que se tratan de forma más explícita en otro capítulo de este suplemento) también proporcionan una valiosa información sobre los mecanismos involucrados en este proceso. Resulta especialmente interesante apuntar que, si bien precisamente algunos agentes utilizados en el tratamiento del HPT secundario como el calcitriol aparecen como factores promotores de las CV (algunos análogos como el paricalcitol y oxacalcitol parecen menos dañinos), otros como los calcimiméticos (CM) y algunos captadores de Pofrecen protección frente a las CV.

En este sentido, nuestro grupo⁴¹ ha encontrado que en un modelo de CV inducidas en ratas urémicas tratadas con CTR, el tratamiento con captadores de P como sevelamer (Renagel[®]) o carbonato de lantano (Fosrenol[®]) redujo significativamente el desarrollo de las CV y la mortalidad (con igual eficacia). Asimismo, numerosos trabajos presentados en este último año muestran alentadores resultados obtenidos con los calcimiméticos. A este respecto, Mendoza et al.⁴² observaron que la activación del RCa de las VSMC en cultivo con el CM 641 aumentó los niveles de MGP (proteína inhibidora de la calcificación) y redujo los niveles de calcificación. En este mismo sentido, Kawata et al.⁴³ estudiaron el efecto del tratamiento con el CM en un modelo de ratas urémicas alimentadas con lactosa (para acelerar el proceso de la CV). Estas ratas desarrollaron calcificación de los arcos aórticos, lo que se acompañaba de un aumento en la expresión de marcadores de diferenciación osteoblástica como OC, OPN y RUNX2. El tratamiento con el CM inhibió la CV y sus marcadores, mediante la reducción de los niveles de PTH, Ca, P y CaxP, asignando un papel preponderante en este efecto a la reducción de la PTH.

Por otro lado, Koleganova et al.⁴⁴ compararon el efecto del CM y CTR en las CV en un modelo de ratas urémicas. El tratamiento con CTR estimuló la proliferación celular en la íntima y media y produjo un engrosamiento de la pared aórtica y el desarrollo de CV, así como un aumento en la expresión de marcadores de la CV como cbaf1, osteonectina, BMP-2, Pit1 y una reducción en la de los marcadores preventivos de CV como MGP, OPN y OPG. El tratamiento con CM tuvo un efecto contrario, reduciendo las CV. Además, los niveles de RCa resultaron estimulados por el CM, pero no por el CTR, mientras que la expresión del VDR sí resultó estimulada tanto por el CM como por el CTR. En definitiva, el CTR estimuló la CV mientras que el CM indujo mecanismos de defensa frente a las CV.

A pesar de resultados como los descritos anteriormente, algunos trabajos apuntan la posibilidad de considerar el uso combinado de CM y derivados de la vitamina D. Así, López et al.⁴⁵ observaron que en ratas urémicas el tratamiento con CM 641 resultó efectivo en la corrección del HPT secunda-

rio sin inducir CV, a diferencia de las ratas tratadas con CTR o paricalcitol (PC). Sin embargo, el cotratamiento con CM y CTR o PC redujo los niveles de CV; el tratamiento combinado CM-PC demostró los mejores resultados de reducción de la PTH y mortalidad sin inducción de CV.

CONCLUSIONES

Los resultados experimentales más recientes relacionados con la fisiopatología de las alteraciones del metabolismo mineral proporcionan nuevos conocimientos sobre los mecanismos involucrados en la regulación de la secreción de PTH y la hiperplasia de las GP (papel del TGF- α , desacetilación de las histonas, Pin 1, etc.), así como del efecto terapéutico de los calcimiméticos y los derivados de la vitamina D (incluida su inyección directa en las GP hiperplásicas). Por otro lado, el estudio del mecanismo de acción de FGF23-*klotho* en la función renal conduce al conocimiento básico de la fisiología del transporte renal de P (receptores de los TCP y TCD, así como la posible existencia de factores paracrinós, entre éstos, nuevos transportadores, etc.). Además, su papel se amplía desde un factor fosfatúrico hasta un regulador directo de la función paratiroidea y la formación del hueso, constituyéndose así en un regulador integral de la homeostasia tanto del P como del Ca; vislumbrándose a la vez como futura diana y agente terapéutico. Asimismo, respecto a las CV asociadas a la insuficiencia renal, se continúa estudiando la implicación directa del P en el proceso de transformación osteoblástica de las VSMC, se describen nuevos factores de transcripción maestros, la implicación de factores circulantes asociados a la uremia, la importancia de la apoptosis y la implicación del RCa (especialmente importante, dado que en el arsenal terapéutico los calcimiméticos ocupan una posición relevante).

Sin duda, los futuros avances experimentales sobre el eje riñón-hueso-glándulas paratiroides permitirán la comprensión de los procesos fisiopatológicos relacionados con las alteraciones del metabolismo mineral y el desarrollo de estrategias terapéuticas más eficaces.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dusso AS, Sato T, Arcidiacono MV, Álvarez-Hernández D, Yang J, González-Suárez I, et al. Pathogenic mechanisms for parathyroid hyperplasia. *Kidney Int Suppl* 2006;(102):S8-11.
2. Nechama M, Akiyama H, Uchida T, Silver J, Naveh-Many T. The Prolyl Isomerase Pin1 Determines PTH Expression In Vitro, in Pin1 Knock out Mice and in Secondary Hyperparathyroidism. *ASN* 2008;19(11):SA-FC386 (86A).
3. Silver J, Meier T, Levi R, Lieben L, Libutti SK, Carmeliet G, et al. Parathyroid-Specific Knock-Out of the Vitamin D Receptor Leads to a Phenotype Resembling Hyperparathyroidism. *ASN* 2008;19(11):SA-FC384 (86A).
4. Arcidiacono MV, Sato T, Álvarez-Hernández D, Yang J, Tokumoto M, González-Suárez I, et al. EGFR activation increases parathyroid hyperplasia and calcitriol resistance in kidney disease. *J Am Soc*

- Nephrol 2008;19(2):310-20.
5. Arcidiacono MV, Cozzolino M, Spiegel N, Tokumoto M, Yang J, Lu Y, et al. Activator protein 2alpha mediates parathyroid TGF-alpha self-induction in secondary hyperparathyroidism. *J Am Soc Nephrol* 2008;19(10):1919-28.
 6. Tokumoto M, Arcidiacono MV, Slatopolsky E, Dusso A. Histone-Deacetylase Inhibition Effectively Reverses the Resistance to 1, 25-Dihydroxyvitamin D Suppression of Parathyroid Hyperplasia in Experimental Kidney Disease. *ASN* 2008;19(11):SA-FC387 (86A).
 7. Taniguchi M, Tokumoto M, Tsuruya K, Hirakata H, Lida M. Intravenous calcitriol therapy in an early stage prevents parathyroid gland growth. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23(11):3662-9.
 8. Fukagawa M, Okazaki R, Takano K, Kaname S, Ogata E, Kitaoka M, et al. Regression of parathyroid hyperplasia by calcitriol-pulse therapy in patients on long-term dialysis. *N Engl J Med* 1990;323:421-2.
 9. Quarles LD, Yohay DA, Carroll BA, Spritzer CE, Minda SA, Bartholomay D, Lobaugh BA. Prospective trial of pulse oral versus intravenous calcitriol treatment of hyperparathyroidism in ESRD. *Kidney Int* 1994;45:1710-21.
 10. Shiizaki K, Hatamura I, Negi S, Sakaguchi T, Saji F, Imazeki I, et al. Highly concentrated calcitriol and its analogues induce apoptosis of parathyroid cells and regression of the hyperplastic gland—study in rats. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23(5):1529-36.
 11. Wada M, Furuya Y, SaKiyama J, Kobayashi N, Miyata S, Ishii H, Nagano N. The calcimimetic compound NPS R-568 suppresses parathyroid cell proliferation in rats with renal insufficiency. Control of parathyroid cell growth via a calcium receptor. *J Clin Invest* 1997;12:2977-83.
 12. Rodríguez ME, Almadén Y, Cañadillas S, Canalejo A, Siendones E, López I, et al. The calcimimetic R-568 increases vitamin D receptor expression in rat parathyroid glands. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292(5):F1390-5.
 13. Mendoza FJ, López I, Canalejo R, Almadén Y, Martín D, Aguilera-Tejero E, Rodríguez M. Direct upregulation of parathyroid Calcium-Sensing Receptor and Vitamin D Receptor by calcimimetics in uremic rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;296(3):F605-F613.
 14. Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, et al. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:6500-5.
 15. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, et al. Targeted ablation of FGF23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest* 2004;113:561-8.
 16. Shimada T, Urakawa I, Yamazaki Y, Hasegawa H, Hino R, Yoneya T, et al. FGF-23 transgenic mice demonstrate hypophosphatemic rickets with reduced expression of sodium phosphate cotransporter type IIa. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:409-14.
 17. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, et al. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res* 2004;19(11):429-35.
 18. Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, Goetz R, Kuro-o M, Mohammadi M, et al. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest* 2007;117:400-8.
 19. Urakawa I, Yamazaki T, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, et al. *Klotho* converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* 2006;444:770-4.
 20. Nabeshima Y, Imura H. α -Klotho: a regulator that integrates calcium homeostasis. *Am J Nephrol* 2008;28:455-64.
 21. Brown EM, Watson EJ, Thatcher JG, Koletsky R, Dawson-Hughes BF, Posillico JT, Shoback DM. Ouabain and low extracellular potassium inhibit PTH secretion from bovine parathyroid cells by a mechanism that does not involve increases in the cytosolic calcium concentration. *Metabolism* 1987;36:36-42.
 22. Gattineni J, Vangipuram D, Mohammadi M, Robinson M, Bates C, Baum M. Fibroblast Growth Factor-23: A Hormone in Search of Its Proximal Tubule Receptor. *ASN* 2008;19(11):SA-FC380(85A).
 23. Liu S, Tang W, Vierthaler L, Quarles LD. Evidence for a Distal-to-Proximal Tubule Feedback Mechanism Mediating Phosphaturic Effects of FGF23. *ASN* 2008;19(11):SA-FC381(85A).
 24. Tatsumi S, Fukushima Y, Shimamura S, Ito M, Segawa H, Miyamoto K. 1,25 (OH)₂ Vitamin D₃ Modulates the Expression of the Human Type IIc Sodium-Dependent Phosphate Cotransporter (NaPi-IIc) Gene in Renal and Osteoblast Cells. *ASN* 2008;19(11):F-PO1804(516A).
 25. Ravera S, Villa-Bellosta R, Sorribas V, Levi M, Murer H, Forster IC, Biber J. Expression and Dietary Regulation of PiT-1/2 in Rat Kidney. *ASN* 2008;19(11):SA-FC344(78A).
 26. Yamazaki Y, Tamada T, Kasai N, Urakawa I, Aono Y, Hasegawa H, et al. Anti-FGF23 neutralizing antibodies show the physiological role and structural features of FGF23. *J Bone Miner Res* 2008;23(9):1509-18.
 27. Hu M, Shi M, Goetz R, Moosa M, Kuro-o M, Moe O. C-Terminal Fragment of Fibroblast Growth Factor (FGF) 23 Inhibits Renal Phosphate (Pi) Excretion as an FGF23 Antagonist by Displacing FGF23 from Its Receptor. *ASN* 2008;19(11):SA-FC345(78A).
 28. Sitara D, Kim S, Razzaque MS, Bergwitz C, Taguchi T, Schüler C, et al. Genetic evidence of serum phosphate-independent functions of FGF-23 on bone. *PLoS Genet* 2008;4(8):e1000154.
 29. Wang H, Yoshiko Y, Yamamoto R, Minamizaki T, Kozai K, Tanne K, et al. Overexpression of fibroblast growth factor 23 suppresses osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *J Bone Miner Res*. 2008;23(6):939-48.
 30. Hofman-Bang J, Olgaard K, Lewin E. Enhanced Expression of *Klotho* and the Na⁺/K⁺-ATPase in the Parathyroid Glands of Uremic Hyperphosphatemic Rats. *ASN* 2008;19(11):SA-FC383(86A).
 31. Brownstein CA, Adler F, Nelson-Williams C, Iijima J, Li P, Imura A, et al. A translocation causing increased alpha-*klotho* level results in hypophosphatemic rickets and hyperparathyroidism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(9):3455-60.
 32. Moe SM, Chen NX. Mechanisms of vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:213-6.
 33. Schoppet M, Shroff RC, Hofbauer LC, Shanahan CM. Exploring the biology of vascular calcification in chronic kidney disease: what's circulating?. *Kidney Int* 2008;73:384-90.
 34. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, et al. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 2000;E10-E17.
 35. Yang H, Curinga G, Giachelli CM. Elevated extracellular calcium

- levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro. *Kidney Int.* 2004;66(6):2293-9.
36. Mathew S, Tustison KS, Sugatani T, Chaudhary LR, Rifas L, Hruska KA. The mechanism of phosphorus as a cardiovascular risk factor in CKD. *J Am Soc Nephrol* 2008;19(6):1092-105.
37. Li X, Yang HY, Giachelli CM. BMP-2 promotes phosphate uptake, phenotypic modulation, and calcification of human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2008; 199(2):271-7.
38. Shroff RC, McNair R, Figg N, Skepper JN, Schurgers L, Gupta A, et al. Dialysis accelerates medial vascular calcification in part by triggering smooth muscle cell apoptosis. *Circulation* 2008;21;118(17):1748-57.
39. Shroff R, McNair R, Figg N, Skepper J, Deanfield J, Rees L, Shanahan C. Arteries from Paediatric Dialysis Patients Show an Increased Susceptibility to Mineral Ion Induced Apoptosis and Oxidative Stress Leading to Accelerated Vesicle-Mediated Calcification. *ASN* 2008;19(11):F-PO1818 (519A).
40. Lomashvili KA, Garg P, Narisawa S, Millán JL, O'Neill WC. Upregulation of alkaline phosphatase and pyrophosphate hydrolysis: potential mechanism for uremic vascular calcification. *Kidney Int* 2008;73(9):989-91.
41. Rodríguez M, Guerrero F, López I, Aguilera-Tejero E, Mendoza F. Lanthanum carbonate and sevelamer hydrochloride prevent vascular calcification in uremic rats. *ASN* 2008;19(11):TH-PO247 (164A).
42. Mendoza FJ, López I, Guerrero F, Henley CM, Rodríguez M, Aguilera-Tejero E. Calcium-Sensing Receptor Activation Increases Matrix-Gla (MGP) Expression in the Aortic Wall of Uremic Rats. *ASN* 2008;19(11):F-PO1814 (518A).
43. Kawata T, Nagano N, Obi M, Miyata S, Koyama C, Kobayashi N, et al. Cinacalcet suppresses calcification of the aorta and heart in uremic rats. *Kidney Int* 2008; 74(10):1270-7.
44. Koleganova N, Piecha G, Ritz E, Schmitt CP, Gross ML. A calcimimetic (R-568), but not calcitriol, prevents vascular remodeling in uremia. *Kidney Int* 2009;75(1):60-71.
45. López I, Mendoza FJ, Aguilera-Tejero E, Pérez J, Guerrero F, Martín D, Rodríguez M. The effect of calcitriol, paricalcitol, and a calcimimetic on extraosseous calcifications in uremic rats. *Kidney Int* 2008;73(3):300-7.