



Universidad de Oviedo

PROGRAMA DE DOCTORADO: CIENCIAS DE LA SALUD

Efectos del paricalcitol y calcitriol en hiperparatiroidismo secundario en ratas jóvenes con fallo renal

Natalia Mejía Gaviria



Universidad de Oviedo

PROGRAMA DE DOCTORADO: CIENCIAS DE LA SALUD

Efectos del paricalcitol y calcitriol en hiperparatiroidismo secundario en ratas jóvenes con fallo renal

Natalia Mejía Gaviria



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Efectos de paricalcitol y calcitriol en hiperparatiroidismo secundario en ratas jóvenes con fallo renal crónico	Inglés: Effects of paricalcitol and calcitriol in secondary hyperparathyroidism in young rats with chronic renal failure.
2.- Autor	
Nombre: Natalia Mejía Gaviria	DNI/Pasaporte/NIE: [REDACTED]
Programa de Doctorado: Ciencias de la Salud	
Órgano responsable: Comisión Académica del Programa de Doctorado Ciencias de la Salud	

RESUMEN (en español)

Introducción

En individuos con función renal normal, los niveles séricos de fósforo (P) y calcio (Ca) son mantenidos en rangos normales gracias a la interacción de un complejo sistema hormonal que involucra el intestino, el riñón y el hueso. En la enfermedad renal crónica (ERC) la incapacidad para mantener el balance de esta interacción resulta en enfermedad mineral y ósea asociada a ERC o CKD-MBD por sus siglas en inglés (chronic kidney disease-mineral bone disorder. La CKD-MBD incluye trastornos del Ca y P séricos, hiperparatiroidismo secundario (HPTs), alteraciones óseas y calcificación de tejidos blandos. Esta última es la causa de hasta el 50% de las muertes por enfermedad cardiovascular (ECV) en pacientes en hemodiálisis (2) resultando en la primera causa de mortalidad en ERC estadio 5 (1). La ECV es la segunda causa de muerte y una de las principales contribuyentes a la disminución de la esperanza de vida en niños con ERC(75). A pesar de la etiología multifactorial de la ECV, se ha resaltado el papel patogénico de la administración de dosis altas de calcitriol o 1,25 (OH)₂ vitamina D₃ y al uso de captadores de P basados en sales de Ca para el control del HPTs [3]. En un medio urémico, tanto la hiperfosforemia propia de la ERC como la hipercalcemia favorecida por el tratamiento, actúan sinérgicamente induciendo proliferación y transformación de las células del músculo liso vascular hacia un fenotipo osteoblástico (2,4 y 5).

La activación selectiva del receptor de la vitamina D (VDR), busca frenar el HPTs minimizando el efecto hipercalcémico e hiperfosforémico de los activadores no selectivos como el calcitriol, aumentando la ventana terapéutica en pacientes con riesgo de ECV. El paricalcitol, es un activador selectivo del VDR que ha demostrado disminuir la transformación de las células del músculo liso vascular. Estos efectos están fundamentados en una menor afinidad por la proteína circulante unida a la vitamina D (VDBP) lo que hace que se depure más fácilmente y en la conformación espacial de la molécula que se traduce en efectos selectivos en la transcripción del ADN con una acción terapéutica mas específica. Un efecto pleitrópico conferido del tratamiento con vitamina D es la reducción en la lesión podocitaria observada en algunas glomerulopatías con disminución de la proteinuria y menos glomeruloesclerosis.



Justificación. En este trabajo se plantea la premisa de que el paricalcitol disminuirá los niveles circulantes de hormona paratiroidea (PTH) con un menor impacto sobre los niveles de Ca y P séricos que el calcitriol. Este menor efecto hipercalcémico e hiperfosforémico disminuirá el riesgo de calcificación en tejidos blandos y en el endotelio vascular, al tiempo que el control del HPTs mejorará la mineralización ósea y el remodelado del hueso y, por ende, en individuos jóvenes el crecimiento corporal. Adicionalmente, y debido a su probable efecto regenerador sobre las lesiones glomérulo-tubulares, el tratamiento con paricalcitol favorecerá una acción renoprotectora.

Objetivos. Conocer los efectos de la administración de paricalcitol en un modelo de rata joven con marcado HPTs inducido por fallo renal crónico y dieta alta en P. Los objetivos específicos incluyen: Conocer los efectos del paricalcitol sobre el valor sérico de PTH y el metabolismo mineral, sobre el daño renal mediante la determinación de la proteinuria, depuración de creatinina e histología renal, la calcificación en tejidos blandos mediante la cuantificación por microCT de depósitos de calcio en aorta, el crecimiento corporal, al estructura metabolismo de los huesos largos y finalmente comparar los efectos anteriores con los obtenidos tras la administración de calcitriol.

Materiales y Métodos. Se utilizó un protocolo animal con ratas Sprague-Dawley hembras que durante 32 días recibieron pienso estándar (0,6% de P y 0,7% de Ca) y agua suplementada con P a una concentración de 0,25%. Diez días después de una nefrectomía quirúrgica 5/6, se obtuvo una muestra de sangre para análisis bioquímico/hormonal y se inició administración de medicamento o vehículo por sonda gástrica tres veces por semana hasta el final del experimento. Las ratas se clasificaron en tres grupos homogéneos: Nx: Fallo renal crónico inducido por nefrectomía 5/6 + vehículo (Suero Salino al 0,9% 0,2 ml) (n=8), NxP: Fallo renal crónico inducido por nefrectomía 5/6 + paricalcitol (1 µg) (n=7), NxC: Fallo renal crónico inducido por nefrectomía 5/6 + calcitriol (0,25 µg) (n=8). El día 30 se recogieron muestras de orina y heces en jaulas metabólicas. Tras el sacrificio se obtuvieron muestras de sangre, tibias, aorta y el remanente quirúrgico del riñón izquierdo. Las variables analizadas incluyeron ganancia de peso, longitud, eficacia de la alimentación, bioquímica en sangre, orina y heces (nitrógeno ureico, creatinina, calcio y fósforo), PTH, hematoxilina-eosina (HxE), ácido peryódico de Schiff (PAS) contrastado con hematoxilina y Von-Kossa (VK) contrastado con HxE en tejido renal, microescáner de tejido aórtico, microescáner de tibias, e histología ósea para análisis de la mineralización con tinción de Von Kossa y La actividad de los osteoclastos/condroclastos mediante la actividad enzimática de la fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP) con posterior cuantificación con el software Osteo®.

Resultados. La validación del modelo experimental se basó en la disminución de los niveles de PTH en los dos grupos tratados. Hubo diferencias entre los grupos Nx y NxP (7854 ± 841 vs. 3373 ± 741, p≤0,05) aunque no sucedió lo mismo con el grupo tratado con paricalcitol aunque sí mostró una reducción (4871 ± 1163). Respecto al Ca, P y producto CaxP no hubo diferencias significativas entre los grupos tratados y el control. En el balance de calcio hubo una mayor excreción urinaria de calcio en ambos grupos tratados pero significativa en NxP frente a Nx (3,8 ± 0,4 vs. 2,1 ± 0,2, p≤0,01). En relación con el P, el grupo tratado con calcitriol tuvo menor excreción urinaria (p 0,013) NxP. La absorción neta de P y el balance de este elemento fue menor en el grupo NxP, así como la reabsorción tubular de fosfatos fue menor en NxP. La ingesta acumulada



fueron menor en NxP frente al grupo Nx. La eficacia en la alimentación fue menor en el grupo NxC. No hubo diferencias en la ganancia de peso ni en el incremento en longitud hocico-cola. Respecto a la proteinuria, los tres grupos presentaron proteinuria masiva mientras que la depuración de creatinina en el grupo NxC fue mayor comparada con los otros dos grupos (19.0 ± 1.6 vs. 0.9 ± 16.2 vs. 27.5 ± 2.8 , $p \leq 0.05$). La valoración histológica renal mostró alteraciones de ERC de estadio avanzado sin diferencias estadísticas, entre los grupos. En la tinción con VK para calcificación renal reveló la presencia de áreas calcificadas en de predominio tubulointerstitial en el grupo NxP. La calcificación aórtica por microCT mostró un mayor porcentaje de calcificaciones en el grupo NxP que en los otros grupos (0.51 ± 0.18 vs. 16.50 ± 6.67 vs. 10.95 ± 6.74 $p \leq 0.05$). En el análisis de resorción ósea por de TRAP, la esponjosa primaria mostró un aumento en el número de osteoclastos activos en relación al volumen óseo en el caso de los grupos Nx y NxP. El tratamiento con calcitriol no modificó este índice. En el análisis de la mineralización reveló un aumento en la mineralización trabecular en los grupos Nx y NxP frente al control ($p \leq 0.05$). El calcitriol disminuyó la altura del frente de mineralización aunque no consiguió normalizarlo. En la morfometría y microarquitectura ósea, la densidad mineral de la esponjosa primaria fue menor en los tres grupos de ratas urémicas comparada con los valores controles de referencia mientras que el porcentaje de volumen óseo, el número de trabéculas, y su separación fueron diferentes en los grupos tratados con respecto al Nx y a los valores normales de referencia. En la esponjosa secundaria, el tratamiento con calcitriol ejerció efecto adicional al producido por el fallo renal crónico haciendo al hueso aún más distinto del control sano. Esto ocurrió para todos los parámetros cuantificados a excepción de la separación entre las trabéculas. En el Hueso Cortical tanto el grosor de la zona cortical como la densidad del tejido mineral estuvieron disminuidos en el grupo Nx, mientras que la porosidad aumentó. Ninguno de los dos tratamientos modificó estos valores.

Conclusiones. El protocolo descrito produce un modelo experimental de marcado HPTs inducido por fallo renal y dieta alta en Pen ratas jóvenes en fase de rápido crecimiento corporal. Respecto al tratamiento con paricalcitol se concluye que mejora el HPTs sin provocar hipercalcemia ni hiperfosforemia, no ejerce efecto protector sobre el daño renal, resulta en una masiva calcificación u osificación de las paredes de la aorta, no tiene efecto sobre el crecimiento corporal, no mejora la estructura del hueso valorada por histomorfometría y microCT, y finalmente no es superior al tratamiento con calcitriol.

RESUMEN (en Inglés)

Introduction. In individuals with normal renal function, serum phosphorus (P) and serum calcium (Ca) are maintained in normal range by the interaction of a complex hormonal system that involves the intestine, kidney and bone. In renal impairment, the inability to maintain this balance results in chronic kidney disease-mineral bone disorder or CKD-MBD, which includes disorders of Ca, P, secondary hyperparathyroidism (SHPT), bone disorder and soft tissue calcifications. The latter is the cause of up to 50% of deaths from cardiovascular disease (CVD) in patients undergoing hemodialysis resulting in the first cause of mortality in end stage renal disease. CVD is the second leading cause of death and one of the major contributors to the decline in life expectancy in children with CKD. Despite the multifactorial etiology



of CVD, it is highlighted the pathogenic role of high doses of calcitriol or 1,25(OH)₂-vitamin D₃ and the use of calcium-based phosphate binders to control SHPT. Both, uremic state and hyperphosphatemia seen in CKD and hypercalcemia favored by the treatment, act synergistically to induce proliferation and transformation of vascular smooth muscle cells toward an osteoblastic phenotype.

A selective activation of the vitamin D receptor (VDR) is used to reduce the hiperphosphatemic and hypercalcemic effect of non-selective activators such as calcitriol, increasing the therapeutic window in patients at risk of CVD. Paricalcitol, a selective VDR activator has been proved to decrease the transformation of vascular smooth muscle cells. These effects are based on a lower affinity for circulating protein bound to vitamin D (VDBP) and a spatial conformation of the molecule that results in selective effects with higher therapeutic specificity. A pleiotropic effect of selective activators of VDR is a reduction in proteinuria in some glomerular diseases with less podocyte injury.

In this paper the premise that paricalcitol decrease parathyroid hormone (PTH) with less effect on serum Ca and P than calcitriol, arises. This reduced hypercalcemic and hyperphosphatemic effect may decrease the risk of calcification in soft tissues and vascular endothelium, while control of SHPT could improve bone mineralization and bone remodeling and hence, body growth in young individuals. Additionally, due to their probable regenerative effect on glomerular tubular lesions, treatment with paricalcitol may act as a protective agent. The aim of this study is to assess the effects of paricalcitol in a young rat model with severe SHPT under a high-phosphorus diet. Other objectives include: understanding the effects of paricalcitol on serum PTH and mineral metabolism, on kidney damage determined by proteinuria, creatinine clearance and renal histology, on calcification in soft tissues by quantification by microCT, on body growth, on metabolism structure of long bones and finally to compare the above effects with calcitriol.

Materials and methods. Female Sprague-Dawley rats were feed with standard food (P 0.6% and Ca 0.7%) and supplemented with P 0.25% in water during 32 days. Ten days after a surgical 5/6 nephrectomy 5/6, a blood sample was obtained for biochemical/hormonal analysis and administration of drug or vehicle was initiated by gavage three times a week until the end of the experiment. The rats were divided into three homogeneous groups: Nx: chronic renal failure induced by 5/6 nephrectomy + vehicle (0.9% saline 0.2 ml) (n = 8), NxP: chronic renal failure induced by nephrectomy 5 / 6 + paricalcitol (1 ug) (n = 7), NXC: chronic renal failure induced by 5/6 nephrectomy + calcitriol (0.25 g) (n = 8). On day 30, samples of urine and feces were collected in metabolic cages. Following sacrifice, blood, aorta, tibiae and remaining left kidney were obtained. The variables analyzed included weight gain, length, feed efficiency, blood, urine and feces biochemistry (BUN, creatinine, calcium and phosphorus), PTH, renal histology with hematoxylin-eosin (HXE), periodic acid-Schiff (PAS) and Von-Kossa (VK), aortic and osseous MicroCT and bone histology for analysis of mineralization and osteoclastic activity.

Results. Validation of the experimental model was based on the decrease in PTH levels in both treatment groups. There were differences between Nx and NXC groups (7854 ± 841 vs. 3373 ± 741 , $p \leq 0.05$) but not so with NxP group although it showed a reduction (4871 ± 1163). Regarding Ca, P and Ca x P product no significant differences were seen between treated and control group. Calcium balance showed an increased in urinary



excretion in both treated groups (3.8 ± 0.4 vs. 2.1 ± 0.2 , $p \leq 0.01$). Regarding P, the group treated with calcitriol had lower urinary P excretion ($p = 0.013$). Net absorption of P and P balance was lower in NxP group and tubular reabsorption of phosphate was lower in NXC. The cumulative intake was lower in Nx group while feed efficiency was lower in the NXC group. There were no differences in weight gain or snout-tail length, between groups. All groups had massive proteinuria but creatinine clearance was higher in NXC compared to the other two groups (19.0 ± 1.6 vs. 0.9 ± 16.2 vs. 27.5 ± 2.8 , $p \leq 0.05$). Histological samples showed chronic abnormalities of advanced stage without statistical differences between groups. Von Kossa's staining in renal tissue revealed the presence of calcified areas of tubulointerstitial dominance in NxP group. Aortic calcification assessed by microCT showed a higher percentage of calcifications in the NxP group compared to other groups (0.51 ± 0.18 vs. 16.50 ± 6.67 vs. 10.95 ± 6.74 , $p \leq 0.05$). Bone resorption by TRAP, primary spongiosa showed an increase in the number of active osteoclasts in Nx and NxP groups. Treatment with calcitriol did not change this index. Mineralization analysis revealed an increase in trabecular mineralization in Nx and NxP groups versus control ($p \leq 0.05$). Bone morphometry and microarchitecture showed low mineral density of primary spongiosa in all groups compared to reference values while the percentage of bone volume, trabecular number, and trabecular separation were different in the treated groups compared to Nx and reference ranges. In the secondary spongiosa, treatment with calcitriol exerted some effect. This was true for all parameters except for the separation between the trabeculae. In the cortical bone, cortical mineral density was diminished in Nx group and the porosity increased. Neither treatment paricalcitol nor calcitriol modified these values.

Conclusions. This experimental protocol described a severe SHPT induced by renal failure and high-P diet in young rats undergoing rapid body growth. Treatment with paricalcitol improved SHPT without causing hypercalcemia or hyperphosphatemia, but do not exerted protective effect on kidney damage, resulted in a massive calcification of the aorta, had no effect on body growth, do not improved bone structure and finally, is not superior to calcitriol.

"I have not failed. I've just found 10000 ways that won't work." - Thomas A. Edison

A Fernando, gracias por todo
A Vanessa y Helena, por todo y más
A Juan Carlos, por ser *hogar*
A mi madre, por el amor
A Suñe, por el empujón final
A Kike, Flor Ángel, Roci, Julián, Óscar y Tere,
por tocar los instrumentos al compás de este sueño.

a. ÍNDICE

b. ÍNDICE DE TABLAS

c. ÍNDICE DE FIGURAS

ABREVIATURAS	xx
1. INTRODUCCIÓN	1.
1.1 Conceptos generales de CKD – MBD	1.
1.1.1 Definición.....	1.
1.1.2 Homeostasis del calcio y fósforo.....	2.
1.2 Alteraciones del metabolismo mineral en enfermedad renal crónica	3.
1.2.1 Retención de fósforo.....	3.
1.2.2 Paratohormona e hiperparatiroidismo secundario.....	4.
1.2.3 Factor de crecimiento fibroblástico 23 y Klotho.....	5.
1.2.4 Deficiencia de calcio y disminución de la síntesis de calcitriol.....	6.
1.3 Alteraciones óseas en CKD-MBD	7.
1.4 Calcificación vascular	9.
1.5 Activadores del receptor de vitamina D (AVDR)	12.
2. HIPÓTESIS	14.
3. OBJETIVOS	15.
3.1. Objetivo general.....	15.
3.2. Objetivos específicos.....	15.
4. MATERIAL Y MÉTODOS	16.
4.1. Animales y condiciones generales.....	16.
4.2. Grupos experimentales.....	16.
4.3. Protocolo experimental.....	16.
4.4. Técnicas quirúrgicas.....	18.
4.4.1. Inducción del fallo renal crónico mediante nefrectomía.....	18.
4.4.2. Extracción de sangre de vena cava craneal.....	19.
4.5. Valoración del crecimiento y la nutrición.....	19.
4.6. Técnicas de laboratorio.....	19.
4.6.1. Bioquímica en sangre, orina y heces.....	19.
4.6.2. ELISA PTH.....	20.

4.6.3. Procesado y tinción de los riñones.....	20.
4.6.4. Procesado de las aortas.....	21.
4.6.4.1. MicroCT aórtico.....	22.
4.6.5. Estudio del hueso.....	22.
4.6.5.1. Procesado de las tibias.....	22.
4.6.5.2. Análisis de la mineralización.....	23.
4.6.5.3. Análisis de la resorción ósea.....	24.
4.7. Análisis tridimensional y microarquitectura.....	24.
4.8. Análisis estadístico.....	26.
5. RESULTADOS.....	27.
5.1. Bioquímica sanguínea.....	27.
5.1.1. PTH.....	27.
5.1.2. Calcio y Fósforo.....	27.
5.1.2.1. Balance externo de calcio y fósforo.....	28.
5.2. Crecimiento corporal.....	30.
5.3. Daño renal.....	30.
5.3.1. Función renal.....	30.
5.3.2. Histología renal.....	31.
5.4. Calcificación en tejidos blandos.....	32.
5.4.1. Calcificación renal.....	32.
5.4.2. Calcificación vascular aórtica.....	33.
5.5. Estructura y metabolismo de los huesos largos y del cartílago de crecimiento.....	34.
5.5.1. Resorción ósea.....	34.
5.5.2. Mineralización.....	35.
5.5.3. Morfometría y microarquitectura ósea.....	35.
5.5.3.1. Espongiosa primaria.....	35.
5.5.3.2. Espongiosa secundaria.....	36.
5.5.3.3. Hueso cortical.....	37.

6. DISCUSIÓN	40.
6.1. El modelo experimental.....	40.
6.2. Hiperparatiroidismo secundario.....	41.
6.3. Balance mineral.....	43.
6.4. Crecimiento corporal.....	44.
6.5. Función e histología renal.....	44.
6.6. Calcificación en tejidos blandos.....	46.
6.7. Metabolismo óseo.....	47.
7. CONCLUSIONES	49.
8. REFERENCIAS	50-65.
9. FINANCIACIÓN Y DIFUSIÓN	66.
9.1. Financiación.....	66.
9.2. Difusión.....	66.
10. ANEXOS	67.
Anexo 1. Datos Bioquímica Sanguínea.....	67.
Anexo 2. Datos hormona paratiroidea.....	68.
Anexo 3. Datos peso.....	69.
Anexo 4. Datos longitud.....	70.
Anexo 5. Datos alimentación.....	71.
Anexo 6. Datos ingesta de líquidos.....	72.
Anexo 7. Datos calcio orina.....	73.
Anexo 8. Datos balance de fósforo.....	74.
Anexo 9. Datos proteinuria y depuración de creatinina.....	75.
Anexo 10. Datos heces.....	76.
Anexo 11. Datos histología renal.....	77.
Anexo 12. Datos TRAP hueso.....	78.
Anexo 13. Datos Von Kossa hueso.....	79.
Anexo 14. Datos CTscan aortas.....	80-81.

b. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Secuencia de eventos bioquímicos en diferentes estadios de ERC.....	7.
Figura 2. Alteraciones óseas y su relación con calcificación vascular en la ERC.....	12.

Figura 3. Protocolo Experimental.....	18.
Figura 4. Efecto del paricalcitol y calcitriol sobre los niveles séricos PTH en los grupos Nx, NxP y NxC.....	27.
Figura 5. Balance de calcio (Ca) y fósforo (P) en los tres grupos.....	29.
Figuras 6. Imágenes representativas de la histología renal en los grupos Nx, NxP y NxC con tinciones HxE y PA.....	32.
Figuras 7. Imágenes representativas de histología renal en los grupos Nx, NxP y NxC con tinción de Von Kossa contrastada con HxE.....	33.
Figuras 8. Reconstrucción tridimensional de las calcificaciones aórticas en los grupos Nx, NxP y NxC.....	33.
Figuras 9. Actividad osteoclástica por TRAP de la placa de crecimiento de los grupos control, Nx, NxP y NxC.....	34.
Figuras 10. Altura de la mineralización de la placa de crecimiento de los grupos control, Nx, NxP y NxC con tinción de VK.....	35.
Figuras 11. Reconstrucción tridimensional de imágenes representativas por microCT de tibias de un control sano, Nx, NxP y NxC, planos frontal y lateral.....	37-38.
Figuras 12. Reconstrucción tridimensional de imágenes por microCT de poros en corte transversal de hueso cortical de grupos Nx, NxP y NxC.....	39.

c. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Intervención terapéutica.....	17.
Tabla 2. Índice histológico para valoración del daño y calcificación renal en tinción de HxE, PAS y VK.....	21.
Tabla 3. Referencias de MicroCT aórtico en ratas sanas.....	22.
Tabla 4. Parámetros morfométricos y umbrales óseos utilizados en el microCT.....	25.
Tabla 5. Referencias de mineralización tibial en MicroCT en ratas sanas.....	26.
Tabla 6. Niveles séricos de calcio, fósforo y producto calcio x fósforo (CaxP) de los animales Nx, NxP y NxC.....	28.
Tabla 7. Ingesta, excreción y absorción neta de calcio (Ca).....	28.
Tabla 8. Ingesta, excreción y absorción neta de fósforo (P).....	29.
Tabla 9. Crecimiento y nutrición de los animales Nx, NxP y NxC.....	30.

Tabla 10. Diuresis, proteinuria, creatinina sérica y depuración de creatinina en grupos Nx, NxP y NxC.....	31.
Tabla 11. Valoración histológica del daño renal con tinción de HxE y ácido PAS contrastado con hematoxilina.....	31.
Tabla 12. Valoración histológica de la calcificación en tejido renal con tinción de Von Kossa.....	32.
Tabla 13. Actividad osteoclástica en los grupos Nx, NxP y NxC cuantificada con Osteo®.....	34.
Tabla 14. Densidad mineral ósea y características de la esponjosa primaria analizadas con microCT.....	36.
Tabla 15. Densidad mineral ósea y características de la esponjosa secundaria analizadas con microCT.....	36.
Tabla 16. Volumen óseo, grosor, porosidad y densidad del tejido mineral en el hueso cortical analizadas con microCT.....	37.

ABREVIATURAS

ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AVDR	Activador(es) del receptor de vitamina D
BMD	<i>Bone mineral density</i> - Densidad mineral ósea
BUN	Nitrógeno ureico en sangre
Ca	Calcio
CV	Calcificación vascular
CaSR	Receptor sensor de calcio
CaxP	Producto calcio-fósforo
CKD-MBD	<i>Chronic kidney disease - Mineral bone disorder</i>
Cr	Creatinina
CrU	Creatinuria en muestra aislada de orina
EEM	Error estándar de la media
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligada a enzima
ERC	Enfermedad renal crónica
FGF23	Factor de crecimiento fibroblástico 23
FGFR–	Receptor del factor de crecimiento fibroblástico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HNO ₃	Ácido nítrico
GHr	Hormona de crecimiento recombinante
HPTs	Hiperparatiroidismo secundario
HxE	Hematoxilina – Eosina
IP	Intraperitoneal
MicroCT	Microescáner
MLV	Músculo liso vascular
MMA	Metilmetacrilato
NaPi 2a	Cotransportador de sodio-fosfato inorgánico tipo 2a
Nx	Fallo renal crónico inducido por nefrectomía 5/6.
NxC	Fallo renal crónico inducido por nefrectomía 5/6 + calcitriol
NxP	Fallo renal crónico inducido por nefrectomía 5/6 + paricalcitol
OR	Osteodistrofia renal

P	Fósforo
PAS	Ácido peryódico de Schiff
PFA	Paraformaldehído
PiT-1	Transportador de fosfato dependiente de sodio
ProtU	Proteinuria muestra aislada de orina
PTH	Hormona paratiroidea
PTHR	Receptor de la hormona paratiroidea
Runx2	Factor Runt-relacionado r
RXR	Receptor retinoide X
sFRP-4	Proteína rizo-relacionada secretoria tipo 4
TFG	Tasa de filtrado glomerular
TRAP	Fosfatasa ácida resistente al tartrato
TRPV5	<i>Transient receptor potential cation channel subfamily V member 5</i> - Canal de calcio
VDBP	Proteína circulante transportadora de vitamina D
VDR	Receptor de vitamina D
VDRE	Elemento de respuesta a vitamina D
VK	Tinción de Von-Kossa

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Conceptos generales sobre CKD-MBD

1.1.1 Definición

La disminución progresiva de la función glomerular de la enfermedad renal crónica (ERC) está asociada a la incapacidad para mantener la homeostasis mineral resultando en lo que hoy se conoce como enfermedad mineral y ósea asociada a ERC o CKD-MBD por sus siglas en inglés (*chronic kidney disease-mineral bone disorder*), desplazando el concepto original y restrictivo de osteodistrofia renal (OR). La CKD-MBD es una condición sistémica que se manifiesta con una o la combinación de alguna de las siguientes alteraciones^(1,2) : 1) trastornos en el calcio (Ca), fósforo (P), hormona paratiroidea (PTH) o metabolismo de la vitamina D, 2) anormalidades de la estructura y remodelado óseos (recambio óseo anormal, mineralización, volumen, crecimiento lineal, o resistencia), y 3) calcificación vascular y/o de cualquier tejido blando⁽³⁾ . La fisiopatología de la CKD-MBD involucra, además, al factor de crecimiento fibroblástico FGF23, Klotho y la vía de señalización Wnt-b-catenina. La evidencia actual asocia las alteraciones del metabolismo óseo con la enfermedad cardiovascular⁽⁴⁾, causando un impacto negativo significativo en la morbilidad y mortalidad de los pacientes con ERC⁽⁵⁾. En pediatría, las alteraciones de la CKD-MBD comienzan a observarse con una velocidad de filtración glomerular menor de 89 ml/min/1,73m². Dadas las fases de crecimiento infantil, este proceso es muy dinámico y por esto requiere de evaluación constante para realizar las adaptaciones terapéuticas necesarias.

1.1.2 Homeostasis del calcio y fósforo

En individuos con función renal normal, los niveles séricos de P y Ca son mantenidos en rangos normales gracias a la interacción de un complejo sistema hormonal que involucra el intestino, el riñón y el hueso. Respecto al Ca, el sistema comprende las hormonas reguladoras y sus receptores: PTH y el receptor (PTHrP)₍₆₎, la 1,25 dihidroxivitamina D y su receptor (VDR)₍₇₎, así como el calcio sérico y el receptor sensor de Ca (CaSR)₍₈₎. La respuesta fisiológica a la hipocalcemia es el aumento en la síntesis y liberación de PTH. Los niveles aumentados de PTH circulante restablecen los valores de calcio mediante varios mecanismos: a) resorción ósea, b) reabsorción tubular de Ca a través del canal TRPV5₍₉₎ y c) activación de la síntesis de 1,25 dihidroxivitamina D₃ lo que aumenta la absorción intestinal de Ca. El *feedback* negativo bloquea la transcripción de PTH directamente y aumenta la expresión del CaSR lo que ejerce un efecto indirecto en su liberación. El CaSR se expresa primordialmente en las células de las glándulas paratiroides pero también en intestino, tiroides, riñón, cerebro, epidermis, estomago, páncreas, hígado y médula ósea. Su activación moviliza el Ca al espacio intracelular y disminuye la secreción de PTH, mientras que su inactivación reduce el calcio dentro de la célula e incrementa la PTH a través de señales intracelulares. En el caso de un ascenso del nivel de calcio, todas estas acciones ocurren al contrario y la respuesta hormonal induciría una reducción sérica de éste, manteniendo el rango fisiológico en límites muy estrechos. Aunque en la homeostasis del fósforo también intervienen la absorción intestinal, la excreción renal y el remodelado óseo, existen diferencias como la velocidad a la que ocurre la respuesta fisiológica a variaciones en el nivel sérico, siendo más lenta en los casos de hipo o hiperfosforemia. Aunque aún se desconoce el receptor que detecta el nivel de P, su homeostasis está regulada por su concentración sérica y la secreción de FGF23 del hueso. Una disminución de la concentración del P, disminuye la secreción de FGF23 lo que lleva a la activación de los transportadores tubulares de sodio-fosfato NaPi2a para aumentar así su reabsorción y al mismo tiempo incrementar la secreción renal de 1,25 dihidroxivitamina D favoreciendo la reabsorción intestinal. La elevación del P induce la secreción de FGF23 lo que restaura el nivel sérico mediante la disminución de la reabsorción tubular y la disminución de la absorción intestinal mediante la inhibición de la secreción de 1,25-

dihidroxitamina D. Tanto el FGF23 como la PTH ejercen la misma acción sobre la reabsorción tubular de P pero tienen efectos opuestos en la secreción renal de 1,25-dihidroxitamina D.

1.2 Alteraciones del metabolismo mineral en la enfermedad renal crónica

1.2.1 Retención de fósforo

Hasta hace unos años se postulaba que la retención extracelular de fósforo debido a la disminución de la tasa de filtración glomerular⁽¹⁰⁾, acompañada de la disminución del calcio iónico plasmático, era los eventos desencadenantes en la patogénesis del hiperparatiroidismo secundario (HPTs) visto en los pacientes con ERC. Los niveles de hormonas fosfáticas como el FGF23 y otras fosfatoninas aumentan en respuesta a la retención de fósforo sérico^(11,12). Este incremento precede al de la PTH, manteniendo la fosforemia en rango normal gracias a una elevada excreción tubular, componente que predomina cuando el filtrado glomerular supera los 50-60 ml/min/1,73 m² (ERC estadios I - III)⁽¹¹⁾. Para disminuir la hiperfosforemia, el FGF23 disminuye los niveles circulantes de 1,25-dihidroxitamina D inhibiendo la absorción de P y Ca intestinal. La sobreexpresión de la PTH inducida por la hipocalcemia, estimula la resorción ósea en el intento de restablecer el Ca sérico pero al hacerlo aumenta el P sérico elevando el producto Ca x P. Cuando la función renal se reduce a menos de 30 ml/min/1,73 m² (ERC estadio IV) se observa una regulación a la baja de Klotho tanto en la glándula paratiroides como en el riñón, lo que resulta en la pérdida urinaria de FGF23. Con esto se logra disminuir la producción de PTH y la reabsorción tubular de fosfato⁽¹³⁾. En la ERC estadio V, algunas nefronas residuales intentarán sin éxito eliminar el fosfato lo que resulta en hiperfosforemia e hiperparatiroidismo secundario (HPTs). No obstante, esta hipótesis se ha hecho menos atractiva ya que se demostró que el P sérico puede no elevarse en estadios leves de ERC^(11,14) sino que incluso está ligeramente disminuido en algunos casos⁽¹⁵⁾. El concepto actual, postula que estas anomalías serían transitorias y se alcanzaría un nuevo estado donde el Ca y el P se normalizan en respuesta al aumento de la secreción de PTH y el

consecuente aumento de la excreción tubular de fosfato. Pese a los nuevos hallazgos y la dificultad en establecer la secuencia de eventos en estadios tempranos de la ERC, es claro que en fases avanzadas el P alto, independiente de los niveles de PTH, genera un impacto negativo sobre la calcificación vascular y en la estructura ósea⁽¹⁶⁻¹⁹⁾. Estudios clínicos han identificado al P como el mayor predictor de aparición de eventos cardiovasculares y de mortalidad asociada a calcificación vascular (CV)^(20,21).

1.2.2 Paratohormona e hiperparatiroidismo secundario

En la patogénesis del HPTs se ven involucrados varios factores entre ellos la elevación extracelular de P, la disminución del Ca ionizado y los niveles bajos de 1,25-dihidroxitamina D. Paralelo a esto, la elevación en la expresión de FGF23 inhibe la hidroxilasa residual renal lo que exacerba la deficiencia de 1,25-dihidroxitamina D, empeorando el HPTs. Las consecuencias clínicas de este proceso son el incremento en la síntesis y secreción de PTH y el aumento de la masa de la glándula paratiroides en su mayor parte por hiperplasia por proliferación celular, y en menor grado por aumento del tamaño celular o hipertrofia⁽²²⁾. Inicialmente comienza con hiperplasia policlonal difusa para evolucionar a una hiperplasia monoclonal nodular⁽²³⁾ regulada en gran parte por la vía de señalización del CaSR, aunque no está claro si la disminución en la expresión del CaSR y del VDR precede a la hiperplasia o es una consecuencia de la proliferación^(24,25). Debido a la producción limitada y su rápida degradación en la circulación, la expresión génica de la PTH es fundamental para su regulación. Así como la 1,25-dihidroxitamina D interviene en la síntesis de PTH de forma transcripcional, los niveles séricos de Ca y P lo hacen por mecanismos post-transcripcionales regulando factores citosólicos para mantener un balance entre la degradación y la protección. Los niveles anormales de Ca y P presentes en la ERC, fortalecen la unión de las proteínas citosólicas paratiroides a la secuencia terminal de 60 nucleótidos de la región 3'-UTR del ARNm de la PTH, aumentando la estabilidad, incrementando la vida media de la PTH y contribuyendo al HPTs⁽²⁶⁾.

1.2.3 Factor de crecimiento fibroblástico 23 y Klotho

El FGF23 es una fosfatonina producida por los osteocitos y osteoblastos, y el mayor determinante en el metabolismo del fósforo. Aunque su función fisiológica no está completamente caracterizada, se piensa que su acción primordial es la de disminuir el P sérico mediante la reducción en la reabsorción tubular de fosfatos. Adicionalmente, y en contraste con la PTH, FGF23 reduce la síntesis renal de 1,25-dihidroxitamina D. Para la activación de los receptores de FGF23, el FGFR-1 y FGFR-3 de las células de epitelio tubular es necesaria la presencia de Klotho que actúa como un correceptor y que confiere selectividad al FGF por el FGF23₍₂₇₎. Klotho se expresa predominantemente en las células tubulares renales como una proteína transmembrana donde no solo ejerce como correceptor sino que adicionalmente tiene un efecto estimulante en la actividad del TRPV5₍₂₇₎. La unión del FGF23 al complejo Klotho/FGFR-1 suprime la reabsorción tubular de fósforo y la síntesis renal de calcitriol. No obstante, Klotho ejerce otra acción independiente actuando como enzima paracrina o autocrina en el borde luminal de la célula tubular regulando los canales iónicos, entre ellos el cotrasportador NaPi2a aumentando la fosfaturia de forma directa₍₂₈₎. El estímulo para la secreción de FGF23 en estadios tempranos de fallo renal no es claro aún, y hay evidencia de que otros factores diferentes a las fosfatoninas pueden influir en la excreción renal de fosfatos₍₂₉₎. El FGF23 aumenta antes que la PTH, así como la expresión en riñón, los niveles séricos y la excreción urinaria de Klotho disminuyen progresivamente _(30,31). Modelos murinos de deleciones de Klotho ($_/_$) o FGF23 ($_/_$) desarrollan hiperfosforemia, calcificación vascular y osteopenia, lo que recuerda el fenotipo de enfermedad mineral y ósea vista en la enfermedad renal ₍₃₂₎.

En la ERC, la producción de FGF23 en el hueso está estimulada directa o indirectamente por el fosfato, el calcitriol, el calcio, la PTH y Klotho. El efecto directo de la PTH sobre la producción de FGF23 ocurre mediante la estimulación del receptor -1 de la PTH (PTH-R1)₍₃₃₎ y el núcleo huérfano del receptor Nurr1₍₃₄₎, mientras que el efecto indirecto ocurre mediante la síntesis de 1,25-dihidroxitamina D₍₃₅₎. Por otra parte FGF23 inhibe la síntesis de PTH y su secreción, aunque en ERC este efecto está parcialmente abolido por la reducción de Klotho y de la expresión de FGF-R1 en tejido paratiroideo ₍₃₆₋₃₈₎. Si bien el aumento de los niveles circulantes de FGF23 en la ERC ejercen una acción

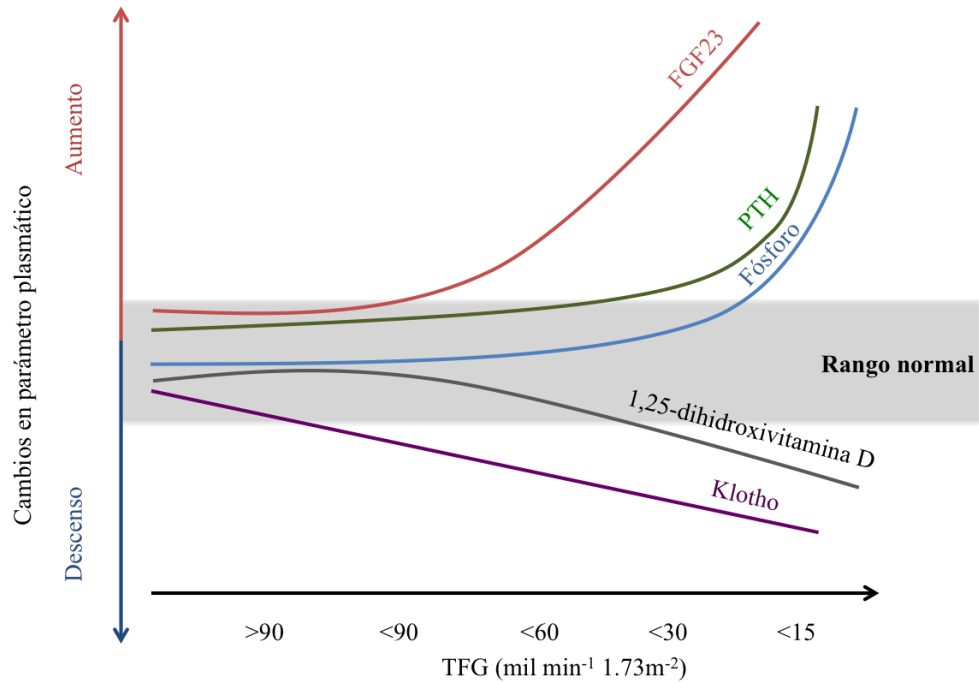
inhibitoria sobre la paratiroides, la elevación mantenida de FGF23 contribuye a la progresión de HPTs mediante la reducción de la síntesis renal de calcitriol y la subsiguiente disminución de la absorción intestinal de calcio y fósforo.

1.2.4 Deficiencia de calcio y disminución de la síntesis de calcitriol

En estadios tempranos de ERC ya existen alteraciones del calcio sérico debido al balance negativo por ingesta deficiente de calcio, a la disminución de la absorción intestinal, a la resistencia esquelética a la acción de la PTH₍₃₉₎ y a una expresión reducida del CaSR en la célula paratiroidea. Sumado a estas situaciones, el aumento inicial en la 1,25-dihidroxitamina D como respuesta a la hipocalcemia, no tiene el efecto inhibitorio de PTH esperado debido a una alta concentración de calreticulina que dificulta la unión de la 1,25-dihidroxitamina D a su receptor, dando como resultado una transcripción persistente del gen de la PTH_(40,41). Esta acción es directa e independiente de los valores séricos de Ca o P, lo que explica que haya pacientes con ERC moderada con calcemia normal, pero con hiperparatiroidismo secundario₍₄₂₎ pero también explica el motivo por el cual la hipocalcemia produce aumento en la expresión del gen de la PTH a pesar de niveles de calcitriol altos, y esto último es relevante para explicar la resistencia del HPTs al tratamiento con calcitriol en este grupo particular de pacientes. Por el contrario, la PTH estimula la actividad de la 1 α hidroxivitamina D hidroxilasa aunque con cierta resistencia. El balance final entre la actividad estimuladora de la PTH e inhibitoria del FGF23 sobre el calcitriol, se verá determinado por otros factores como hiperfosforemia, acidosis metabólica y toxinas urémicas. Otra hipótesis que contribuye al entendimiento de la deficiencia de calcitriol en ERC, pero hasta el momento comprobada solo en modelos animales, se basa en la observación de que con tasas de filtración bajas hay una disminución de la disponibilidad luminal del complejo de calcidiol unido a su proteína transportadora (calcidiol-DBP) requerido como sustrato para la síntesis de éste₍₄₃₎. La concentración de calcidiol plasmático está disminuida en la mayoría de los pacientes con ERC_(44,45). por múltiples motivos como baja exposición a la luz solar, ancianos, pigmentación cutánea, administración de

medicamentos antiepilépticos, aumento de la excreción urinaria y/o pérdida peritoneal del complejo calcidiol-VDBP (Figura 1).

Figura 1. Secuencia de eventos bioquímicos en diferentes estadios de ERC.



Tomado y traducido de (46).

1.3 Alteraciones óseas en CKD-MBD

A pesar de la acción pobre que ejerce la PTH sobre el riñón en la ERC avanzada, la actividad sobre el hueso se mantiene parcialmente. Esta resistencia es secundaria a la represión del PTH-R1, la expresión reducida del factor de diferenciación osteoblástica y a los niveles aumentados de osteoprotegerina o factor inhibidor de osteoclastogénesis⁽⁴⁷⁾ y es en definitiva el mayor determinante de la aparición de OR. La OR se refiere exclusivamente a la patología esquelética cuyo diagnóstico de confirmación se realiza por biopsia ósea y sus resultados histomorfométricos se expresan como parámetros de recambio óseo, mineralización y volumen⁽²⁾. La OR se clasifica según el tipo de remodelado óseo en: a) de remodelado bajo como la osteomalacia y la enfermedad ósea adinámica o b) de

remodelado alto como la osteítis fibrosa quística que es la lesión típicamente asociada al HPTs grave. No es infrecuente ver superposición de diferentes formas de enfermedad mineral ósea en un mismo paciente con ERC, condición denominada OR mixta. La afectación del metabolismo mineral en el paciente renal se inicia con una tendencia a la hipocalcemia, normo o hipofosforemia de consumo y disminución de 1,25-dihidroxivitamina D plasmática. Paralelamente hay un aumento progresivo del FGF23 y la PTH con una disminución progresiva de Klotho_(11,48) y el desarrollo de OR. La osteopatía se caracteriza por un estado inicial de enfermedad ósea adinámica seguido por osteítis fibrosa o enfermedad ósea mixta₍₂₂₎. El bajo recambio óseo de las fases iniciales de la enfermedad renal pueden deberse a condiciones inhibitorias del remodelado como resistencia a la PTH, disminución de los niveles de calcitriol, hormonas sexuales disminuidas, diabetes, y toxinas urémicas, lo que lleva a represión de la vía Wnt- β -catenina y al aumento de expresión de los antagonistas de Wnt como esclerotina, Dickkopf-1 y la proteína rizo-relacionada secretoria tipo 4 (sFRP4)_(49,50). El desarrollo de enfermedad ósea de recambio alto viene posteriormente cuando los niveles de PTH logran sobrepasar el umbral de resistencia periférica y abolir otros factores inhibitorios. Es preciso señalar que la mayor parte de las alteraciones del metabolismo mineral y óseo descritas en la ERC hacen referencia a estudios en adultos, lo que hay que tener presente a la hora de extrapolar estos hallazgos a población pediátrica. En los niños es excepcional la realización de biopsias de hueso en el seguimiento clínico de los pacientes con ERC y, por otra parte, el crecimiento endocondral del esqueleto, responsable del crecimiento en talla, sigue unos mecanismos de regulación específicos y diferentes al resto del hueso.

El hueso tiene una interacción compleja con el sistema vascular; la evidencia actual sugiere que la incidencia y progresión de la calcificación vascular están inversamente relacionadas a la masa ósea y directamente en relación con la pérdida de la mineralización. Es conocida la asociación entre baja densidad mineral ósea y calcificación aórtica en pacientes con osteoporosis_(51,52). En los pacientes con ERC y remodelado óseo bajo, el hueso no tiene la capacidad para tamponar los metabolitos minerales como el Ca y el P lo que promueve la calcificación y la rigidez de la pared vascular, especialmente en las

arterias coronarias⁽⁵³⁾. Por el contrario pero con idénticas consecuencias, en el recambio óseo alto se liberan grandes cantidades de P del hueso destruyendo la función esquelética⁽⁵⁴⁾.

1.4 Calcificación vascular

El proceso de CV reside en la transformación fenotípica de las células del músculo liso vascular (MLV) en células con propiedades funcionales de osteoblastos. Esta transformación es la respuesta a un desbalance entre factores promotores e inhibidores de calcificación. En términos histológicos, la calcificación se inicia con la precipitación directa del Ca y P en el endotelio. Adicionalmente a esta fase mineral, se desencadenan procesos celulares que incluyen entre otros, apoptosis, diferenciación osteocondrogénica y degradación de la elastina. De estos, el más relevante es la apoptosis; los cuerpos apoptóticos de las células del MLV juegan el papel de estructuras nucleares de matriz celular para el inicio de la calcificación^(55,56). Sobre esta matriz ocurre la diferenciación osteocondrogénica de las células del MLV con aparición de vesículas de apatita y colágeno calcificante, que promueven la síntesis de proteínas de metabolismo óseo como la fosfatasa alcalina, osteocalcina y osteopontina⁽⁵⁷⁾. Adicionalmente a la formación de proteínas osteogénicas, se describen factores de transcripción relacionados con el desarrollo óseo normal como el factor Runt-relacionado r (Runx2)⁽⁵⁸⁾ y el Msh homeobox 2^(59,60). El papel sinérgico de los niveles séricos elevados de P en la aceleración de este proceso ha sido confirmado en estudios experimentales debido a la activación de la vía WNT/ β -catenina mediante la regulación transcripcional del transportador de fosfato dependiente de sodio o PiT-1⁽⁶¹⁻⁶⁵⁾. Otro factor calcificante en la uremia y secundario a la acumulación de toxinas como el indoxil sulfato, es la silenciamiento del gen *klotho* por hipermetilación⁽⁶⁶⁾. El gen *klotho* codifica su proteína de membrana predominantemente para el riñón aunque también se expresa en otros órganos endocrinos como la glándula paratiroides y la pituitaria. El dominio extracelular de *Klotho* es escindido por las proteasas ADAM 10 y ADAM 17 y secretado en diferentes fluidos extracelulares como la orina. Con la reducción de *Klotho* renal observada en la ERC, la transducción de la señal del FGF23 a las células tubulares no ocurre, situación que se ha relacionado con la patogénesis del endurecimiento de la pared arterial y la CV^(30, 31, 67) (Figura 2.).

Existen dos patrones de CV, uno con placas y lesiones oclusivas sobre la capa íntima arterial asociado a inflamación, y el segundo que afecta la capa media vascular, caracterizado por el depósito difuso de minerales en las fibras elásticas. Este último constituye la forma más prevalente de esclerosis vascular en la ERC. El depósito de Ca en la capa íntima resulta en una lesión circunferencial que produce cambios oclusivos que llevan a infarto del miocardio o isquemia distal en las arterias periféricas, mientras que la lesión medial disminuye la distensibilidad de los vasos, aumenta la presión arterial y produce hipertrofia del ventrículo izquierdo⁽⁶⁸⁾. La calcifilaxis o arteriopatía urémica calcificante ocurre en las pequeñas arteriolas de la piel u otros tejidos blandos que conducen a la isquemia y ulceración y se asocia a una tasa alta de mortalidad⁽⁶⁹⁾. Estos procesos pueden coexistir en pacientes con factores de riesgo tradicionales como edad avanzada, hipertensión arterial, diabetes o dislipidemia^(54,70).

Los niños con ERC tienen una prevalencia alta de factores de riesgo cardiovascular tradicionales, siendo los más relevantes la hipertensión arterial, hiperlipidemia, obesidad y metabolismo anormal de la glucosa^(71,72). A estos factores, se añaden tanto en niños como adultos con ERC, factores de riesgo no tradicionales como el producto Ca x P aumentado, HPTs, administración de sales de calcio, inflamación, desnutrición y estrés oxidativo⁽³⁾. El exceso de PTH es capaz de causar disfunción cardiovascular con hipertrofia ventricular izquierda como se ha visto en pacientes con hiperparatiroidismo primario⁽⁷³⁾ y secundario⁽⁷⁴⁾. Una revisión sistemática de la asociación entre los marcadores de alteraciones del metabolismo mineral y mortalidad por enfermedad cardiovascular (ECV) en pacientes en diálisis demostró mayor riesgo relacionado con niveles elevados de fósforo, seguido por Ca y PTH⁽⁷⁵⁾. Estudios en niños y adultos jóvenes han encontrado esta misma asociación entre el HPTs y calcificación coronaria⁽⁷⁶⁻⁷⁸⁾, calcificación femoral⁽⁷⁹⁾ y aumento del espesor de la intima – media carotídea^(75, 80-82), rigidez aortica y anomalías estructurales cardíacas^(77,82).

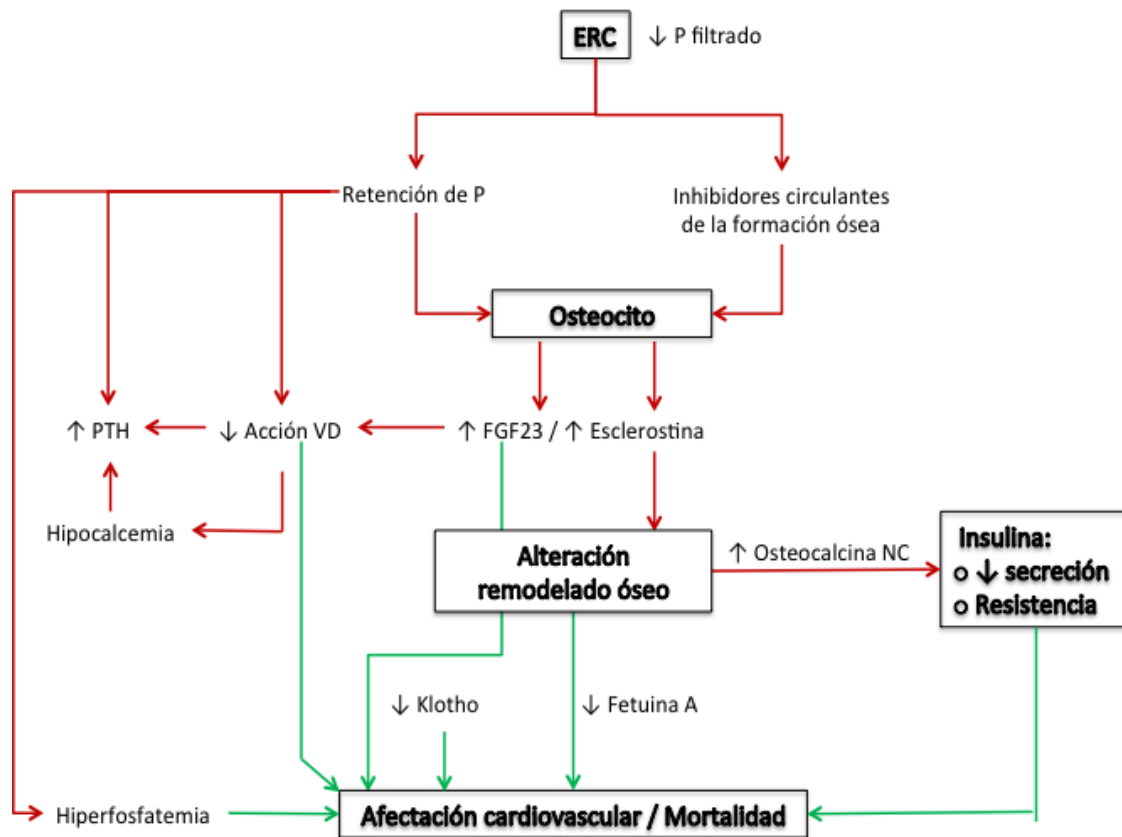
El rol del P en el desarrollo de calcificación vascular ha sido resaltado ya que tiene la capacidad de inducir la sobreexpresión de factores osteogénicos⁽⁸³⁾ produciendo mineralización de la matriz extracelular y cambiando el fenotipo celular al de una célula

ostecondrogénica⁽⁸⁴⁾. En modelos animales, una dieta alta en P es suficiente para suprimir la acción de la PTH en el riñón debido a la represión del ARNm del PTHR⁽⁸⁵⁾. En ratas adultas, los niveles de PTH y de FGF23 son estimulados con dietas ricas en P^(86,87) y con la administración exógena de 1,25-dihidroxitamina D⁽⁸⁸⁾, efecto que es superior al observado en animales urémicos con dieta normal, y que puede ser revertido al normalizar el contenido de P dietético⁽⁸⁹⁾. En humanos una carga oral de P aumenta la PTH independientemente de los niveles de Ca sérico pero la ingesta a corto plazo no altera la concentración de FGF23⁽⁹⁰⁾. Desde el punto de vista clínico, la hiperfosforemia se ha correlacionado con mortalidad en pacientes con ERC terminal⁽⁹¹⁾ así como con un riesgo elevado de mortalidad cardiovascular en la población general⁽⁹²⁾. Un meta-análisis reciente encontró asociación directa entre el riesgo de morir de 18% por cada 1 mg/dl de incremento de P sérico. Por el contrario, la asociación entre la calcemia y la PTH con los desenlaces cardiovasculares fue poco consistente⁽⁹³⁾.

Por otra parte, el tratamiento tradicional del HPTs en ERC con análogos de la vitamina D, aumenta la absorción intestinal de Ca y P resultando en un producto Ca x P mayor, lo que se ha asociado con una pobre supervivencia en pacientes en hemodiálisis y diálisis peritoneal^(5,94). Tanto los niveles altos como bajos de 1,25-dihidroxitamina D se asocian a calcificación de grandes arterias y aumento del grosor de la intima media carotídea, situación mediada por la homeostasis del Ca-P y la inflamación⁽⁹⁵⁾. Se ha descrito una asociación fuerte entre la dosis de vitamina D y marcadores biológicos de enfermedad CV como la disminución en la elasticidad arterial, calcificaciones coronarias y cambios en la morfología del ventrículo izquierdo en adultos jóvenes⁽⁹⁶⁾. El exceso de Ca proveniente de los captadores de P y activadores del VDR (AVDR) puede empeorar las calcificaciones vasculares e inducir depósitos extraesqueléticos de Ca⁽⁹⁷⁾ por lo que se hace necesario encontrar un balance fino entre la deficiencia de 1,25-dihidroxitamina D y su toxicidad. En la población pediátrica, la ECV es la segunda causa de muerte después de las infecciones y en conjunto, son los principales contribuyentes a la disminución de la esperanza de vida en niños con ERC⁽⁷⁵⁾. Las admisiones por ECV en niños con ERC terminal se han notificado en 324 -334 por 1.000 pacientes/años durante el primer año de terapia de reemplazo renal. Más aun, la tasa de mortalidad cardiovascular ha aumentado de

27 a 34% en los últimos 20 años y continúa sorprendentemente alta en pacientes trasplantados comparada con la población pediátrica general⁽⁷¹⁾.

Figura 2. Alteraciones óseas y su relación con calcificación vascular en la ERC



1.5 Activadores del receptor de vitamina D (AVDR)

Los AVDR se unen al receptor, trasponiendo al núcleo celular donde se heterodimerizan con un receptor retinoide (RXR). Este complejo se une al elemento de respuesta de la vitamina D (VDRE) en los genes diana, activando o inhibiendo la transcripción⁽⁹⁸⁾. Además del calcitriol, que es la vitamina D activa en su forma natural, existen análogos sintéticos de la vitamina D₂ y D₃ como el alfacalcidol, el doxercalciferol, el maxacalcitol y el paricalcitol. Estos dos últimos tienen una menor afinidad por la proteína circulante unida a la vitamina D (VDBP) lo que hace que se depuren más

fácilmente y que su potencial efecto tóxico por la elevación del Ca y el P, disminuya⁽⁹⁹⁾. Adicionalmente, la conformación espacial de la molécula tiene efectos selectivos en la transcripción del ADN siendo más específicos en su acción terapéutica. Respecto a la calcificación vascular se ha demostrado que el paricalcitol, a diferencia del calcitriol, previene la activación de la vía Wnt/ β -catenina inducida por P y no aumenta la expresión del factor de transcripción RunX2, disminuyendo la transformación de las células del MLV en osteocitos^(100,101). Aunque el efecto del paricalcitol sobre la PTH es entre tres y cuatro veces menor que el calcitriol, lo es también sobre los niveles séricos de Ca y P aumentando la ventana terapéutica en pacientes con riesgo de CV. Cuando se comparó con calcitriol, el paricalcitol tuvo una ventaja mayor sobre la supervivencia en una cohorte de pacientes en hemodiálisis⁽¹⁰²⁾. Existen muy pocas publicaciones sobre el tratamiento con paricalcitol en población pediátrica^(103,104), limitándose a estudios en un corto número de pacientes en hemodiálisis y con un diseño no muy riguroso.

Otro efecto potencial del tratamiento con vitamina D es la reducción en la lesión podocitaria observada en algunas glomerulopatías. Kuhlmann y cols. describieron la disminución de la lesión y detención de la hipertrofia podocitarias en ratas con nefrectomía parcial y tratamiento con calcitriol comparadas con ratas *sham* y ratas nefrectomizadas con placebo, lo que se tradujo en menor proteinuria y menor glomeruloesclerosis⁽¹⁰⁵⁾. Dos estudios posteriores en humanos con ERC estadios 3 y 4 quienes recibieron paricalcitol demostraron una reducción en la proteinuria frente a los que tomaron placebo^(106,107). Un estudio pequeño en pacientes con nefropatía IgA reveló mayor disminución de la proteinuria con la administración de calcitriol comparado con placebo⁽¹⁰⁸⁾.

2 HIPÓTESIS

En base a los datos publicados en la literatura sobre el proceso de activación selectiva del VDR y su empleo en el control del HPTs en el fallo renal crónico, se plantea la premisa de que el paricalcitol disminuirá los niveles circulantes de PTH con un menor impacto sobre los niveles de calcio y fósforo séricos que el calcitriol. Este menor efecto hipercalcémico e hiperfosforémico disminuirá el riesgo de calcificación en tejidos blandos y en el endotelio vascular, al tiempo que el control del hiperparatiroidismo mejorará la mineralización ósea y el remodelado del hueso y, por ende, en individuos jóvenes el crecimiento corporal. Adicionalmente, y debido a su probable efecto regenerador sobre las lesiones glomérulo-tubulares, el tratamiento con paricalcitol favorecerá una acción renoprotectora.

El planteamiento anterior podrá comprobarse utilizando un modelo experimental de HPTs en el que ratas urémicas prepuberales tratadas con paricalcitol se compararán con otras a las que se administrará calcitriol y con ratas urémica sin tratar, bajo una dieta alta en fósforo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general.

Conocer los efectos de la administración de paricalcitol en un modelo de rata joven con marcado hiperparatiroidismo inducido por fallo renal crónico y dieta alta en fósforo.

3.2 Objetivos específicos.

Conocer los efectos de la administración de paricalcitol sobre:

3.2.1 Concentraciones séricas de PTH y variables relacionadas con el metabolismo mineral.

3.2.2 Daño renal mediante determinación de la proteinuria y de la depuración de creatinina y valoración de la histología renal.

3.2.3 Calcificación en tejidos blandos:

3.2.3.1 En el riñón, mediante la cuantificación de depósitos de calcio en muestras histológicas.

3.2.3.2 En la aorta, mediante el análisis morfométrico por microCT del grado de calcificación vascular.

3.2.4 Crecimiento corporal mediante el análisis de la ganancia ponderal, eficacia de la alimentación y la longitud.

3.2.5 Estructura y metabolismo de los huesos largos.

3.2.6 Comparar los efectos anteriores con los obtenidos tras la administración de calcitriol.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Animales y condiciones generales

El manejo de los animales se ajustó a lo dispuesto en la normativa legal vigente, en particular al Real Decreto 1201/2005 sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Los protocolos fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Oviedo.

Ratas hembra Sprague-Dawley recién destetadas (Harlan, Ibérica), alojadas en jaulas individuales en el bioterio de la Universidad de Oviedo a una temperatura ambiente constante de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas (8 am-8 pm), entraron en protocolo tras un periodo de aclimatación de tres días con pienso estándar (dieta 2014S, Harlan Ibérica S.A., Barcelona) y agua corriente *ad libitum*. Los animales se clasificaron en grupos homogéneos según el peso en el día 10 del protocolo con el fin de partir de una uniformidad muestral.

4.2 Grupos experimentales

1. Nx: Fallo renal crónico inducido por nefrectomía 5/6 + vehículo (n=8).
2. NxP: Fallo renal crónico inducido por nefrectomía 5/6 + paricalcitol (n=7).
3. NxC: Fallo renal crónico inducido por nefrectomía 5/6 + calcitriol (n=8).

4.3 Protocolo experimental

El protocolo experimental se llevó a cabo en 32 días (Figura 3.) durante los cuales los animales recibieron pienso estándar que contiene 0,6% de fósforo y 0,7% de calcio (dieta 2014S, Harlan Ibérica S.A., Barcelona) y agua suplementada con fosfato de sodio monobásico anhidro (Sigma-Aldrich, St.Louis) a una concentración de 0,25% (500 mg/100 ml de agua).

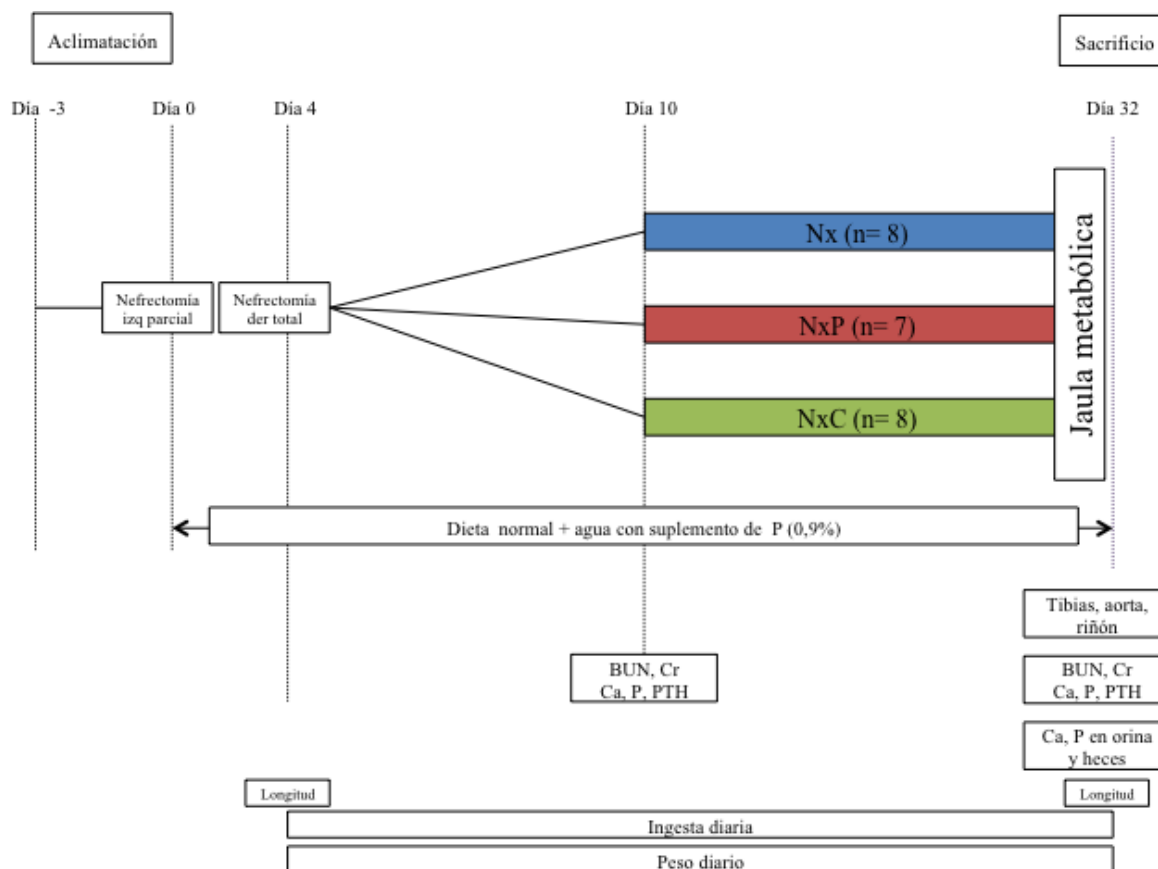
Tabla 1. Intervención terapéutica

Grupo	Dosis, vía e intervalo de administración de medicamentos
Nx	Suero Salino al 0,9% (Baxter S.L., Valencia) 0,2 ml por sonda gástrica c/lunes, miércoles y viernes.
NxP	Paricalcitol (Zemplar® Abbott Laboratories, S.A., Madrid) 1 µg en 0,2 ml de suero salino por sonda gástrica c/lunes, miércoles y viernes.
NxC	Calcitriol (Rocaltrol® Roche Farma, S.A., Madrid) 0,25 µg en 0,2 ml de suero salino por sonda gástrica c/lunes, miércoles y viernes.

Nx: Nefrectomizados 5/6. NxP: Nefrectomizados 5/6 + Paricalcitol. NxC: Nefrectomizados 5/6 + Calcitriol.

En el día 0 se realizó nefrectomía izquierda 2/3 a todos los individuos y en el día 4 se completó la inducción del fallo renal con nefrectomía total derecha. El día 10 de protocolo, se obtuvo una muestra de sangre de la vena cava craneal para análisis bioquímico y hormonal. Inmediatamente se clasificaron por peso similar en tres grupos y a partir de ahí se inició la administración de medicamento o vehículo por sonda gástrica cada lunes, miércoles y viernes hasta el final del experimento (Tabla 1). El día 30 del protocolo los animales se trasladaron a jaulas metabólicas individuales durante 48 horas y se recogieron muestras de orina y heces para su posterior análisis bioquímico. Se sacrificaron mediante exanguinación a través de la aorta abdominal bajo anestesia general con ketamina (4 mg/100g de peso, Ketolar®, Pfizer, Madrid) y tiopental sódico intraperitoneales (1,25 mg/100g de peso, Pentotal®, Abbott Laboratories, S.A., Madrid) e inmediatamente se obtuvieron muestras de sangre, ambas tibias, aorta (porciones abdominal y torácica) y el remanente quirúrgico del riñón izquierdo.

Figura 3. Protocolo Experimental



BUN: Nitrógeno ureico, Cr: Creatinina sérica, Ca: Calcio sérico, P: Fósforo sérico, PTH: Hormona paratiroidea

4.4 Técnicas quirúrgicas

4.4.1 Inducción del fallo renal crónico mediante nefrectomía

La inducción del fallo renal crónico se realizó mediante la exéresis en dos tiempos quirúrgicos de aproximadamente 5/6 de la masa renal, según la técnica descrita por Morrison⁽¹⁰⁹⁾, y modificada posteriormente por nuestro grupo⁽¹¹⁰⁾. Bajo anestesia general inhalada con isoflurano (0,25-2,0%, IsoFlo®, Abbott Laboratories Ltd, Berkshire) se incidió sobre la zona lumbar izquierda exponiendo el riñón, decapsulándolo y cortando los

polos renales superior e inferior. Haciendo hemostasia por presión durante unos minutos, la incisión se cerró por planos con sutura absorbible y se unió la piel con grapas. Al cuarto día se repitió el mismo abordaje en el riñón derecho, se decapsuló y se realizó nefrectomía total, previa ligadura doble del pedículo renal. Al término de cada incisión se administró buprenorfina subcutánea (0,03 mg, Buprex®, Schering-Plough, S.A., Madrid) como paliativo del dolor.

4.4.2 Extracción de sangre de vena cava craneal

La extracción de sangre *in vivo* durante el protocolo para determinación de bioquímica y hormonas fue realizada mediante punción de la vena cava craneal. Previa anestesia general inhalatoria, se colocó al animal en posición dorsal localizando el borde superior de la costilla derecha a 2-3 mm del borde esternal. Se introdujo una jeringa de 1 ml con aguja 25G en un ángulo de 30 grados respecto a la mesa y orientada hacia el acetábulo de la extremidad opuesta. Se empujó suavemente entre 5 a 8 mm hasta obtener 0,3 ml de sangre, luego se presionó la zona de punción para hemostasia.

4.5 Valoración del crecimiento y la nutrición

A partir del día 4 y hasta el día del sacrificio se cuantificó diariamente el peso de los animales con una balanza electrónica programada para pesar animales, con precisión de 0,01 g (OHAUS® GT 2100 Florham Park, New Jersey). La longitud de los animales desde el hocico hasta la punta de la cola se determinó con una regla el día 4 y el día del sacrificio, aprovechando la anestesia general. El estado nutricional de los distintos grupos se cuantificó mediante la ganancia de peso e ingesta mientras que la eficacia de la alimentación se calculó dividiendo estos dos últimos factores entre sí.

4.6 Técnicas de laboratorio

4.6.1 Bioquímica en sangre, orina y heces

La sangre extraída el día 10 de protocolo y al sacrificio se centrifugó a 5.000 r.p.m. a 4°C para separar el plasma, que se almacenó a – 20°C hasta la determinación de los

niveles de nitrógeno ureico (BUN), creatinina, calcio total y fósforo en un analizador Kodak Ektachem® DT60 (Kodak, Rochester). La orina de 48 horas recolectada en las cajas metabólicas se dividió en dos partes: una para determinación de creatinina y urea, y otra, a la que se añadió 2 gotas de ácido clorhídrico 1N, para determinar calcio y fósforo. Las heces de 24 horas se liofilizaron para eliminar la humedad, luego se llevó a cabo una digestión por microondas con una mezcla de HNO₃ 1:1 y H₂O₂. La medición de calcio y fósforo se realizó mediante análisis elemental inorgánico con el ICP-MS Element2® (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham) en la unidad de Espectrometría de Masas de la Universidad de Oviedo.

4.6.2 ELISA PTH

La determinación de PTH intacta en suero se llevó a cabo mediante el método de ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) utilizando un anticuerpo específico para rata (Rat Intact PTH ELISA Kit®, Immotopics, Inc., San Clemente).

4.6.3 Procesado y tinción de los riñones

El remanente de tejido renal izquierdo se fijó en PFA al 4% y posteriormente fue incluido en parafina. Las secciones fueron cortadas a 5 µm para su análisis histológico con tres tinciones: hematoxilina-eosina (HxE), ácido peryódico de Schiff (PAS) contrastado con hematoxilina y Von-Kossa (VK) contrastado con HxE. Las dos primeras se utilizaron para evaluar la morfología celular y arquitectura del glomérulo, los túbulos, el intersticio y las arterias mientras que la tinción de Von Kossa se utilizó para resaltar las áreas calcificadas. Se obtuvieron imágenes de todos los campos de cada sección y de todos los animales a 40x. La valoración del daño renal se hizo de forma descriptiva por dos observadores independientes y desconocedores de a qué grupo pertenecían las muestras que estaban valorando, según los índices descritos en la Tabla 2.

Tabla 2. Índice histológico para valoración del daño y calcificación renal en tinción de HxE, PAS y VK.

		Parámetro	Puntuación
HxE y PAS	Glomérulos	Normal	0
		Proliferación mesangial	1
		Aumento del espacio de Bowman	2
		Fibrosis	3
	Túbulos	Normal	0
		Alteración de la arquitectura	1
		Vacuolización	2
		Atrofia	3
	Intersticio	Normal	0
		Infiltrado	1
		Fibrosis	2
	Arterias	Normales	0
Hiperplasia leve		1	
Hiperplasia moderada		2	
Hiperplasia grave		3	
Von Kossa	Calcificación tubular	Número total de calcificaciones en el túbulo por corte histológico	
	Calcificación arteriolar	Número total de calcificaciones arteriales por corte histológico	
	Calcificación intersticial	Número total de calcificaciones intersticiales por corte histológico	
	Calcificación global	Promedio de calcificaciones por grupo	

A menor puntuación, menor severidad de la lesión.

4.6.4 Procesado de las aortas

Inmediatamente tras el sacrificio se diseccionaron las aortas desde el arco hasta la bifurcación iliaca y se fijaron en PFA al 4% durante dos horas. Posteriormente se deshidrataron con etanol y se incluyeron en parafina.

4.6.4.1 MicroCT aórtico

Se realizó a 180° incluyendo todo el tejido aórtico. Los parámetros utilizados para este tejido fueron: Voltaje de 50 kW, 800 μ Amperios, no se utilizó ningún filtro, resolución de 14 μ m, tiempo de exposición de 1600 milisegundos, paso de rotación de 0,3° y un *frame average* de 3. La corrección de campo plano se realizó diariamente. Los valores de corrección del coeficiente de atenuación, la dureza del rayo y el suavizado del mismo, fueron iguales para todas las muestras. Se obtuvieron 616 imágenes que se reconstruyeron utilizando el software NRecon® (SkyScan, Antwerpen) para ser analizadas posteriormente con el software CTAn. La reconstrucción de modelos en 3D se realizó utilizando el algoritmo *doble-time-cubes* para ser visualizado con el programa CTVol. El umbral utilizado para todas las muestras fue de 0,3 – 0,7 g/cm³ de BMD y el umbral para determinar las calcificaciones fue de 0,6 – 0,7 g/cm³ de BMD.

Con el fin de obtener resultados de referencia sobre aortas de ratas sanas, se sacrificaron 3 animales de la misma variedad, sexo y edad, siguiendo el mismo protocolo de fijación y de escaneo aórtico (Tabla 3).

Tabla 3. Referencias de MicroCT aórtico en ratas sanas

Parámetros de medida	Control
Volumen total de la aorta (TV) en mm ³ .	4,0 \pm 0,5
Volumen de las calcificaciones (Obj.Ven) en mm ³ .	0,0 \pm 0,0
Porcentaje de calcificación (Obj.V/TV) en %	0,0 \pm 0,0

4.6.5 Estudio del hueso

4.6.5.1 Procesado de las tibias

Después del sacrificio, se extrajeron los segmentos proximales de las tibias y se eliminó el tejido adyacente. Ambas tibias se fijaron con paraformaldehído (PFA, Sigma-Aldrich, Madrid) al 4% durante 24 horas a 4°C; la tibia derecha se escogió para análisis

histológico y la izquierda para análisis en microescáner (MicroCT). Para el análisis por microCT se sometió a las tibias izquierdas a un proceso de deshidratación gradual hasta llegar a etanol al 100%. Antes de escanearlas, cada tibia se envolvió con papel y este se humedeció con agua para evitar la deshidratación de la muestra. Inmediatamente se introdujo en un tubo para mantenerla firme al pasarla por el escáner. Las tibias derechas se incluyeron en metil-metacrilato (MMA) con modificaciones al protocolo de Erben₍₁₁₁₎, técnica inicialmente descrita por Wolf₍₁₁₂₎. Una vez terminado el proceso de inclusión, se realizaron cortes de 5 μm de grosor utilizando un micrótomo Microm HM355S (Microm, Thermo Fisher Scientific, Madrid) con cuchillas de carburo de tungsteno. Antes de realizar las tinciones específicas, cada sección llevó un proceso que se inició con su colocación sobre un portaobjeto tratado previamente con TESPA® (3-aminopropiltriethoxi-silano, Sigma, Madrid), luego se estiraron cuidadosamente con etanol al 70%, se protegieron con una lámina de polietileno y se prensaron y secaron durante 48 horas a 37°C.

4.6.5.2 Análisis de la mineralización

Para valorar la matriz mineralizada del cartílago de crecimiento y del hueso se realizó una tinción de Von Kossa (AgNO_3 al 1% (Sigma, Madrid) y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Merck, Darmstadt) al 1% en agua destilada) contrastada con azul de toluidina (Sigma, Madrid). Esta tinción tiñe de color negro intenso las estructuras en proceso de mineralización o ya calcificadas cuyo contenido principal es el fosfato cálcico. Se capturaron imágenes con una cámara digital Olympus DP11 acoplada a un microscopio Olympus BX41 (Olympus España, Barcelona) bajo objetivo 20x. Para delimitar el área a medir, cada imagen se procesó digitalmente con Adobe Photoshop CS® (Adobe Systems Inc., Dublin) y se procedió a su análisis con el software Osteo® versión 13.2.6 (Bioquant USA) tomando la distancia en micras (μm) en entre la unión osteocondral hasta el final de la línea de mineralización.

Con el fin de obtener resultados de referencia del análisis con el software Osteo® en tibias de ratas sanas, se sacrificaron 3 animales de la misma variedad, sexo y edad,

siguiendo el mismo protocolo de fijación, inclusión y tinción. La referencia obtenida en ratas sanas para la altura de la mineralización tibial con Osteo® fue de $57,1 \pm 1,6 \mu\text{m}$.

4.6.5.3 Análisis de la resorción ósea

La actividad de los osteoclastos/condroclastos se identificó mediante la actividad enzimática de la fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP). Para el proceso de incubación a 37°C se utilizó una solución Tris-HCL 0,2 M, $\text{pH}=9,5$ que contiene 1,5 ml de acetato sódico 50mM, $\text{pH}=5,2$ (Sigma, Madrid), 60 μl de tartrato sódico 1M (Sigma, Madrid) y media tableta de Fast Red® (Roche, Basel). Se capturaron imágenes con una cámara digital Olympus DP11 acoplada a un microscopio Olympus BX41 (Olympus España, Barcelona) bajo objetivo 20x. Para delimitar el área a medir, cada imagen se procesó digitalmente con Adobe Photoshop CS® (Adobe Systems Inc., Dublin) y se procedió a su análisis con el software Osteo® versión 13.2.6 (Bioquant, USA) haciendo un recuento del número de células TRAP positivas en una superficie de 300 μm desde la unión osteocondral hacia la esponjosa primaria.

Con el fin de obtener resultados de referencia del análisis con el software Osteo® sobre tibias de ratas sanas, se sacrificaron 3 animales de la misma variedad, sexo y edad, siguiendo el mismo protocolo de fijación, inclusión y tinción. La referencia obtenida del número de osteoclastos o células TRAP positivas en ratas sanas para la altura delimitada de 300 μm (Relación N.Oc/TV) con Osteo® fue de $139,0 \pm 8,9$.

4.7 Análisis tridimensional y microarquitectura

Se realizó escáner de las muestras óseas con el microCT SkyScan 1174 (SkyScan, Antwerpen) ubicado en la Unidad de Imagen Preclínica del bioterio de la Universidad de Oviedo. El escáner fue de 180° incluyendo la región comprendida entre la epífisis proximal y la mitad de la tibial analizando la arquitectura tanto de hueso trabecular (esponjosa primaria y secundaria) como de hueso cortical. Los parámetros usados para este protocolo fueron: Voltaje de 50 kW, 800 $\mu\text{Amperios}$, filtro de aluminio 0,5 mm, resolución de 9,45

μm , tiempo de exposición de 5500 milisegundos, paso de rotación de $0,3^\circ$ y un *frame average* de 2. La corrección de campo plano se realizó una vez al día antes de iniciar el escaneo. Los valores de corrección del coeficiente de atenuación, la dureza del rayo y el suavizado fueron iguales para todas las muestras. De cada muestra se obtuvieron 1222 imágenes que fueron reconstruidas utilizando el software NRecon® (SkyScan, Antwerpen) y posteriormente analizadas morfométricamente con el software CTAn. La reconstrucción de modelos en 3D se realizó utilizando el algoritmo *doble-time-cubes* para ser visualizado con el programa CTVol. En la metafisis proximal de la tibia se analizaron 75 cortes transversales de espongiosa primaria y 200 de espongiosa secundaria. El hueso cortical se evaluó en la diáfisis tibial mediante 150 imágenes. Los parámetros morfométricos y umbrales utilizados para cada segmento se describen en la tabla 4. La terminología y unidades utilizadas en esta valoración siguieron las recomendaciones establecidas por el Committee of the American Society for Bone and Mineral Research⁽¹¹³⁾.

Tabla 4. Parámetros morfométricos y umbrales óseos utilizados en el microCT

Zona	Parámetro	Nomenclatura internacional	Unidades	Umbrales
Hueso trabecular	Densidad mineral ósea	BMD	$\text{g Ca}^{++}/\text{cm}^3$	
	Porcentaje de volumen óseo	BV/TV	%	0,3 g/cm^3 – 1,9 g/cm^3 de BMD
	Número de trabéculas	(Tb.N)	$1/\mu\text{m}$	
	Grosor de las trabéculas	Tb.Th	μm	
	Separación trabecular	Tb.Sp	μm	
Hueso cortical	Volumen óseo cortical	BV	mm^3	
	Grosor cortical	Ct.Th	mm	
	Porosidad hueso cortical	Ct.B.Po	%	0,8 g/cm^3 – 1,9 g/cm^3 de BMD
	Densidad tejido mineral	TMD	g/cm^3	

Con el fin de obtener resultados de referencia de los parámetros morfométricos y umbrales óseos en microCT con tibias de ratas sanas, se sacrificaron 3 animales de la misma variedad, sexo y edad, siguiendo el mismo protocolo (Tabla 5.).

Tabla 5. Referencias de mineralización tibial en MicroCT en ratas sanas

Espongiosa primaria	Control
Densidad mineral ósea (BMD) g Ca ⁺⁺ /cm ³	0,4 ± 0,0
Porcentaje de volumen óseo (BV/TV) %	47,4 ± 4,1
Número de trabéculas (Tb.N) 1/μm	6,8 ± 0,5
Grosor de las trabéculas (Tb.Th) μm	69,2 ± 0,7
Separación trabecular (Tb.Sp) μm	94,8 ± 8,5
Espongiosa secundaria	Control
Densidad mineral ósea (BMD) g Ca ⁺⁺ /cm ³	0,2 ± 0,0
Porcentaje de volumen óseo (BV/TV) %	18,1 ± 2,8
Número de trabéculas (Tb.N) 1/μm	2,7 ± 0,4
Grosor de las trabéculas (Tb.Th) μm	67,4 ± 0,1
Separación trabecular (Tb.Sp) μm	216,5 ± 24,8
Hueso cortical	Control
Volumen óseo cortical (BV) mm ³	3,8 ± 0,2
Grosor cortical (Ct.Th) mm	0,3 ± 0,0
Porosidad hueso cortical (Ct.B.Po) %	2,5 ± 0,4
Densidad tejido mineral (TMD) g/cm ³	1,1 ± 0,0

4.8 Análisis estadístico

Los resultados de cada grupo se expresan como la media ± error estándar de la media (EEM). Las diferencias entre los grupos fueron comparadas mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido del test de Newman-Keuls. Un valor de *p* igual o menor de 0,05 fue considerado significativo. Todo el tratamiento estadístico de la información se realizó con el programa SPSS[®] 15.0 (SPSS Inc, Chicago, USA).

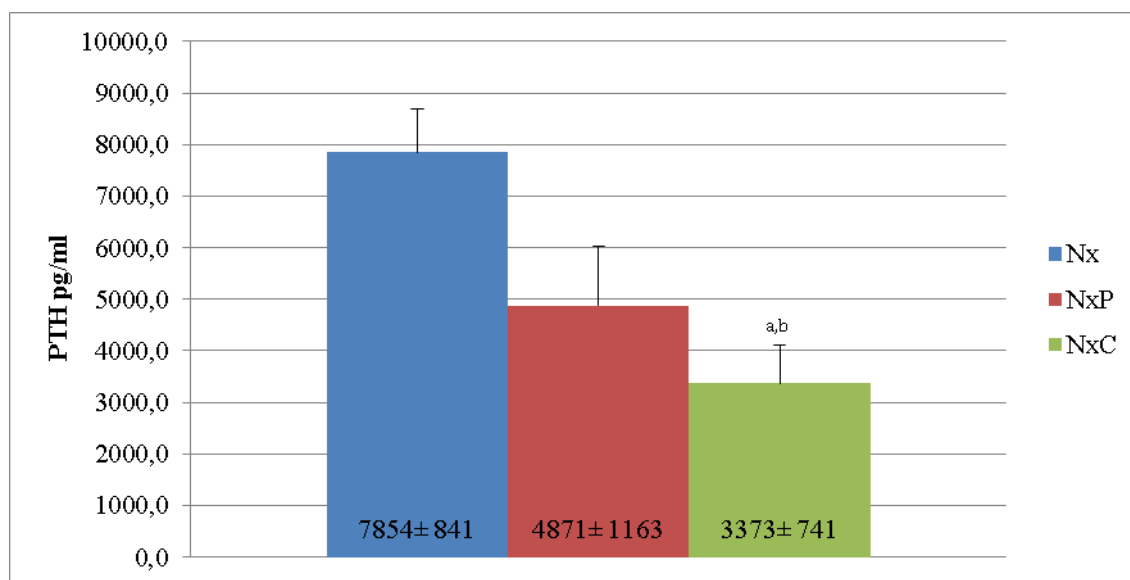
5 RESULTADOS

5.1 Bioquímica sanguínea

5.1.1 PTH

La validación del modelo experimental se basó en la disminución de los niveles de PTH en los dos grupos tratados. Hubo diferencias entre los grupos Nx y NxP. No sucedió lo mismo con el grupo tratado con paricalcitol aunque sí mostró una evidente tendencia hacia la reducción de la PTH (Figura 4.).

Figura 4. Efecto del paricalcitol y calcitriol sobre los niveles séricos PTH en los grupos Nx, NxP y NxP.



Los datos son expresados como media (especificada para cada grupo en la base de las columnas) ± EEM

^a diferente de Nx ($p \leq 0,01$); ^b diferente de NxP ($p \leq 0,05$).

5.1.2 Calcio y Fósforo

La Tabla 6 muestra la bioquímica sanguínea relativa al Ca y P el día del sacrificio. No hubo diferencias significativas entre los grupos tratados y el control, ni entre los dos grupos tratados en los valores de Ca, P, ni en el producto CaxP.

Tabla 6. Niveles séricos de calcio, fósforo y producto calcio x fósforo (CaxP) de los animales Nx, NxP y NxC.

	Nx	NxP	NxC
Calcio (mg/dl)	8,7 ± 0,3	8,7 ± 0,3	8,5 ± 0,3
Fósforo (mg/dl)	11,6 ± 1,9	10,0 ± 0,9	11,9 ± 0,7
Producto CaxP (mg ² /dl ²)	99,3 ± 14,5	86,4 ± 7,5	100,9 ± 7,0

Los datos son expresados como media ± EEM.

5.1.2.1 Balance externo de calcio y fósforo

Se muestra en las Tablas 7 y 8, y en la Figura 5. Por lo que respecta al calcio hubo una mayor excreción urinaria de calcio en ambos grupos tratados pero significativa en NxP frente a Nx.

Tabla 7. Ingesta, excreción y absorción neta de calcio (Ca)

	Nx	NxP	NxC
Ca en la dieta (%)	0,7	0,7	0,7
Ingesta total de Ca (mg/día)	90,4 ± 6,2	84,5 ± 4,9	67,0 ± 9,8
Ca en heces (mg/día)	21,7 ± 1,6	35,8 ± 6,7	21,9 ± 1,1
Absorción neta Ca (mg/día)	68,7 ± 6,4	48,7 ± 9,0	45,1 ± 9,4
Ca en orina (mg/100g/día)	2,1 ± 0,2	3,8 ± 0,4 ^a	3,1 ± 0,9
Balance Ca (mg/día)	68,1 ± 6,3	48,0 ± 8,9	44,3 ± 12,3

Absorción neta (mg/día) = ingesta - excreción fecal

Balance (mg/día) = absorción neta - excreción urinaria

Los datos son expresados como media ± EEM

^a diferente de Nx (p≤0,01)

En relación con el P, el grupo tratado con calcitriol tuvo menor excreción urinaria (p 0,013) NxC. La absorción neta de P y el balance de este elemento fue menor en el grupo NxP, así como la reabsorción tubular de fosfatos (RTP) fue menor en NxC.

Tabla 8. Ingesta, excreción y absorción neta de fósforo (P)

	Nx	NxP	NxC
P en el agua	0,25%	0,25%	0,25%
Ingesta P en agua (mg/día)	131,5 ± 8,5	95,1 ± 7,8	118,6 ± 11,6
P en la dieta	0,6%	0,6%	0,6%
Ingesta P en pienso (mg/día)	77,5 ± 5,3	72,4 ± 4,2	57,5 ± 8,4
Ingesta total P (mg/día)	209 ± 11,8	167,6 ± 11,5	176,1 ± 18,9
P en heces (mg/día)	19,8 ± 0,5	30,3 ± 5,1	19,0 ± 0,9
Absorción neta P (mg/día)	189,1 ± 12,0	137,3 ± 13,3^a	157,1 ± 18,7
P en orina (mg/100g/día)	124 ± 16	134,4 ± 9,8	110,1 ± 13,1
RTP (%)	12,9 ± 1,6	11,3 ± 1,8	6,8 ± 0,9 ^{a,b}
Balance P (mg/día)	158,0 ± 12,0	112,6 ± 11,7^a	135,5 ± 17,0

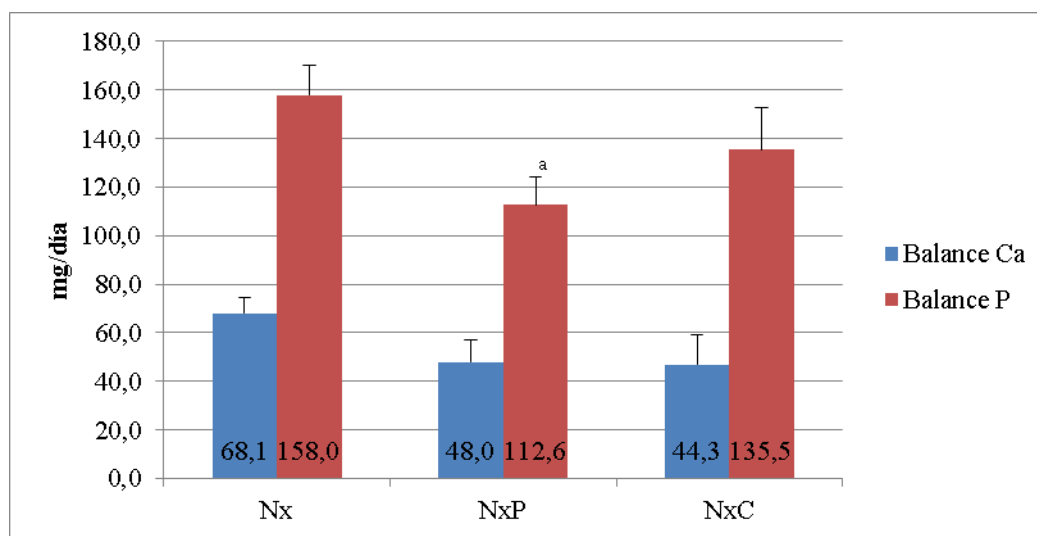
RTP: reabsorción tubular de fosfatos

Absorción neta (mg/día) = ingesta - excreción fecal

Balance (mg/día) = absorción neta - excreción urinaria

Los datos son expresados como media ± EEM. ^a diferente al grupo Nx (p≤0,05).

Figura 5. Balance de calcio (Ca) y fósforo (P) en los tres grupos.



Balance (mg/día) = absorción neta - excreción urinaria.

Los datos son X ± EEM. ^a diferente al grupo Nx (p≤0,05).

5.2 Crecimiento corporal

Los datos relativos a nutrición (ganancia de peso, ingesta acumulada y eficacia de la alimentación) mostraron una menor ingesta acumulada en el grupo NxP frente al grupo Nx. La eficacia en la alimentación fue menor en el grupo NxC. No hubo diferencias en la ganancia de peso. El incremento en longitud hocico-cola tampoco mostró diferencias entre los tres grupos de ratas (Tabla 9.).

Tabla 9. Crecimiento y nutrición de los animales Nx, NxP y NxC.

	Nx	NxP	NxC
Ganancia peso (g)	57,1 ± 4,0	41,9 ± 7,1	40,0 ± 7,0
Ingesta acumulada (g)	251,1 ± 12,4	211,3 ± 13,6 ^a	229,0 ± 7,1
Eficacia de la alimentación (g/g)	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,02	0,1 ± 0,02 ^a
Ganancia longitud (cm)	6,7 ± 0,4	5,2 ± 0,7	5,7 ± 0,9

Eficacia de la alimentación = ganancia de peso/ingesta acumulada.

Los datos son expresados como media ± error estándar de la media.

^a diferente al grupo Nx ($p \leq 0,05$).

5.3 Daño renal

5.3.1 Función renal

Respecto a la proteinuria, los tres grupos presentaron proteinuria masiva sin diferencias en la magnitud de la misma. La depuración de creatinina en el grupo NxC fue claramente mayor comparada con los otros dos grupos (Tabla 10.).

Tabla 10. Diuresis, proteinuria, creatinina sérica y depuración de creatinina en grupos Nx, NxP y NxC.

	Nx	NxP	NxC
Diuresis (ml/día)	18,4 ± 1,7	14,4 ± 1,1	16,1 ± 1,3
Proteinuria (mg/100g/día)	253,7 ± 36,5	347,0 ± 69,8	293,0 ± 64,8
Creatinina sérica (mg/dl)	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1 ^a
Depuración de creatinina (ml/min/100g)	19,0 ± 1,6	16,2 ± 0,9	27,5 ± 2,8 ^{a,b}

Los datos son X ± EEM. ^a diferente al grupo Nx ^b diferente al grupo NxP (p≤0,05).

5.3.2 Histología renal

La valoración histológica mediante las tinciones de HxE y PAS mostró en todos los grupos las alteraciones propias de las características de la ERC de estadio avanzado: degeneración hidrópica, vacualización y atrofia tubular, desprendimiento celular con detritos y cilindros en el lumen de algunos cortes. No obstante, aunque sin diferencias estadísticas, los grupos sometidos a tratamiento, NxP y NxC, mostraron mayor compromiso tubular así como abundante fibrosis intersticial, exhibiendo además un importante infiltrado inflamatorio intersticial peritubular difuso de predominio linfocítico (Tabla 11 y Figura 6). En la tinción con VK para calcificación renal se observaron diferencias.

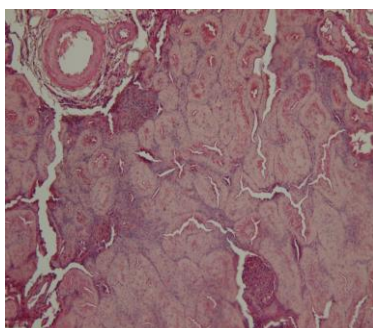
Tabla 11. Valoración histológica del daño renal con tinción de HxE y ácido PAS contrastado con hematoxilina.

	Nx	NxP	NxC	
HE	Lesión glomerular	1,29 ± 0,18	2,00 ± 0,49	0,88 ± 0,35
	Afectación tubular	0,75 ± 0,41	1,57 ± 0,37	1,71 ± 0,18 ^a
	Engrosamiento arterias	0,67 ± 0,48	1,29 ± 0,47	0,29 ± 0,29
	Afectación Intersticial	0,13 ± 0,13	0,33 ± 0,33	0,38 ± 0,26
PAS	Túbulo- intersticial	0,57 ± 0,19	0,14 ± 0,14	1,20 ± 0,49 ^b
	Arterial	0,86 ± 0,43	0,83 ± 0,54	1,00 ± 0,63
	Glomerular	0,43 ± 0,19	0,67 ± 0,33	0,00 ± 0,00

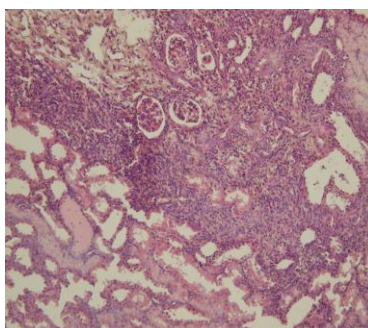
Una puntuación más baja indica menor severidad de la lesión.

Los datos son X ± EEM. ^a diferente al grupo Nx (p≤0,05). ^b diferente al grupo NxP (p≤0,05).

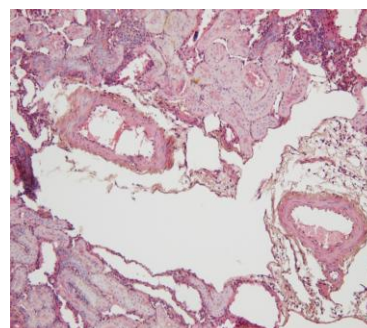
Figuras 6. Imágenes representativas de la histología renal en los grupos Nx, NxP y NxC con tinciones HxE y PAS.



Grupo nefrectomizado (Nx).
Conserva arquitectura tubular.
No hay infiltrado intersticial.



Grupo nefrectomizado tratado con paricalcitol (NxP). Nefritis tubulointersticial con importante infiltrado inflamatorio y pérdida de la arquitectura renal.



Grupo nefrectomizado tratado con calcitriol (NxC). Nefritis tubulointersticial con desprendimiento de las células tubulares.

5.4 Calcificación en tejidos blandos

5.4.1 Calcificación renal

La valoración histológica del tejido renal con tinciones de Von-Kossa contrastada con HxE, revelaron la presencia de áreas calcificadas en de predominio tubulointersticial en el grupo NxP. Respecto a la calcificación arterial solo se observó en los grupos Nx y NxP sin diferencias estadísticas (Tabla 12 y Figuras 7.).

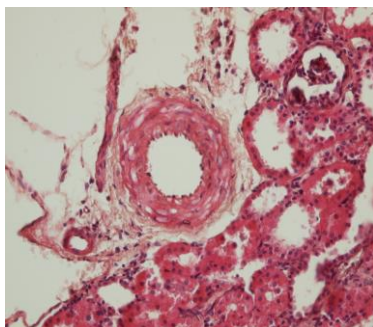
Tabla 12. Valoración histológica de la calcificación en tejido renal con tinción de Von Kossa

	Nx	NxP	NxC
Calcificación tubular	0,50 ± 0,53	0,86 ± 0,38	0,00 ± 0,00 ^{a,b}
Calcificación vascular	0,25 ± 0,46	0,14 ± 0,38	0,00 ± 0,00
Calcificación intersticial	0,63 ± 0,52	0,86 ± 0,38	0,29 ± 0,49 ^b
Calcificación global	1,37 ± 0,32	1,85 ± 0,34	0,28 ± 0,18 ^{a,b}

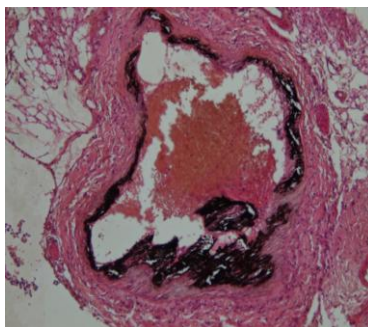
Una puntuación más baja indica menor severidad de la lesión.

Los datos son X ± EEM. ^a diferente al grupo Nx ($p \leq 0,05$), ^b diferente al grupo NxP ($p \leq 0,05$).

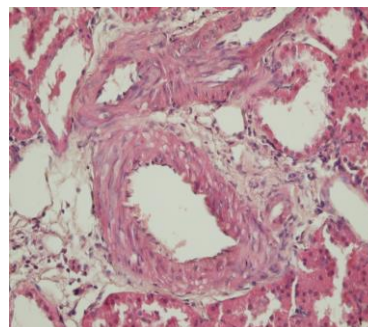
Figuras 7. Imágenes representativas de histología renal en los grupos Nx, NxP y NxC con tinción de Von Kossa contrastada con HxE. Resoluciones 20x y 40x.



Grupo nefrectomizado Nx.
Resolución 20x. Hiperplasia pared arteriolar sin calcificación.



Grupo nefrectomizado tratado con paricalcitol (NxP).
Resolución 40x. Calcificación arteriolar renal.

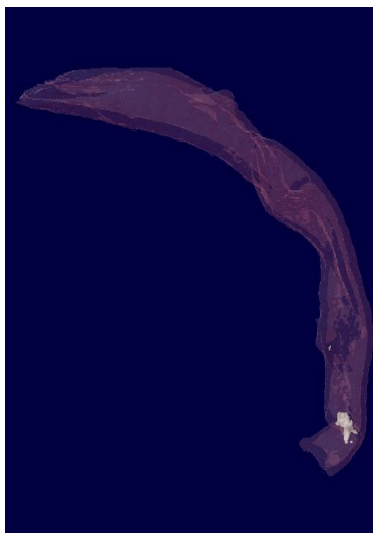


Grupo nefrectomizado tratado con calcitriol (NxC).
Resolución 20x. Hiperplasia de la pared arteriolar sin calcificación.

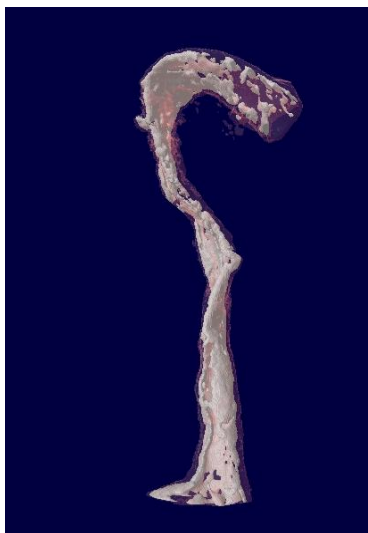
5.4.2 Calcificación vascular aórtica

El análisis por microCT mostró un mayor porcentaje de calcificaciones aórticas en el grupo NxP que en los otros grupos (Nx $0,51 \pm 0,18$, NxP $16,50 \pm 6,67^a$, NxC $10,95 \pm 6,74^a$) (Los datos son $X \pm EEM$. ^adiferente al grupo Nx ($p \leq 0,05$) (Figuras 8).

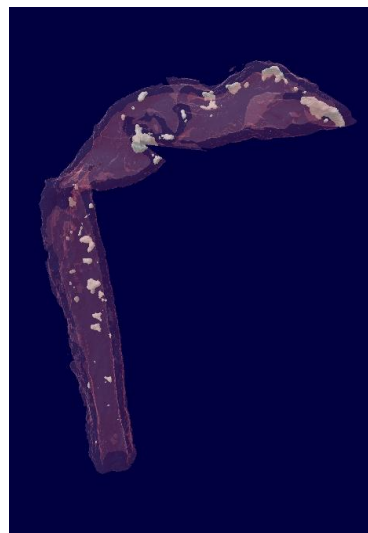
Figuras 8. Reconstrucción tridimensional de las calcificaciones aórticas en los grupos Nx, NxP y NxC.



Aorta en grupo Nx



Aorta en grupo NxP



Aorta en grupo NxC

5.5 Estructura y metabolismo de los huesos largos y del cartílago de crecimiento

5.5.1 Resorción ósea

En el análisis de la TRAP, la esponjosa primaria mostró un aumento en el número de osteoclastos activos en relación al volumen óseo en el caso de los grupos Nx y NxP. El tratamiento con calcitriol no modificó este índice.

Tabla 13. Actividad osteoclástica en los grupos Nx, NxP y NxC cuantificada con Osteo®.

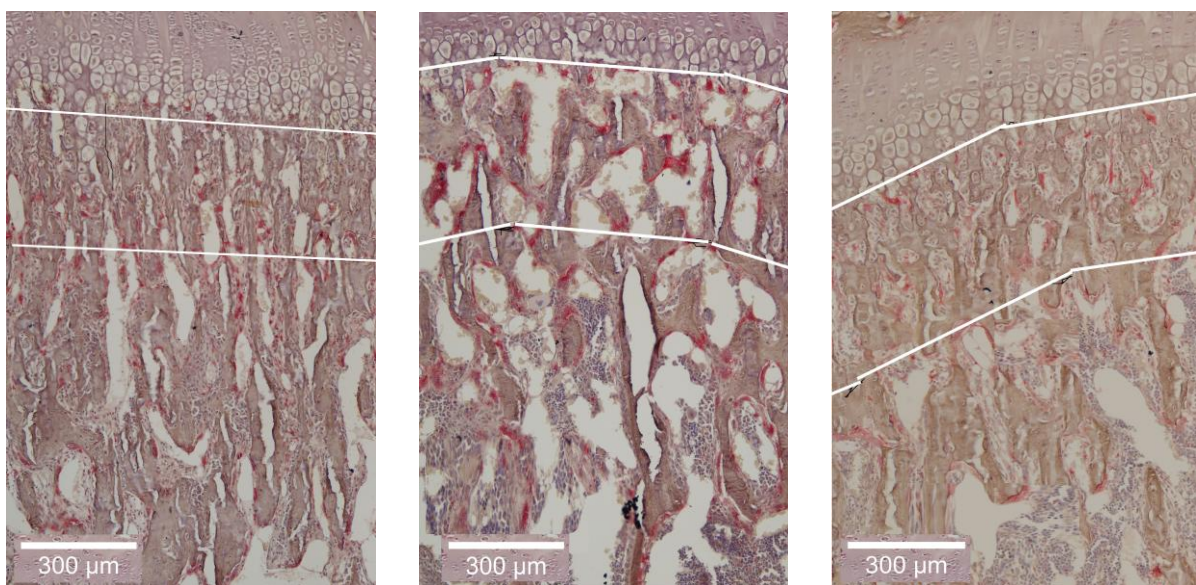
	Control	Nx	NxP	NxC
Relación N.Oc/TV	139,01 ±8,9	239,9 ±9,6 ^a	263,1 ±27,0 ^a	166,27 ±11,3 ^{b,c}

TV Volumen tisular en μm N.Oc Número de osteoclastos activos.

Los datos son $X \pm \text{EEM}$.

^a diferente al valor control de referencia; ^b diferente al grupo Nx; ^c diferente al grupo NxP ($p \leq 0,05$)

Figuras 9. Actividad osteoclástica por TRAP de la placa de crecimiento de los grupos control, Nx, NxP y NxC. Reconstrucción digital de imágenes representativas del cartílago de crecimiento para cuantificación de TRAP en Osteo®



Grupo Nx

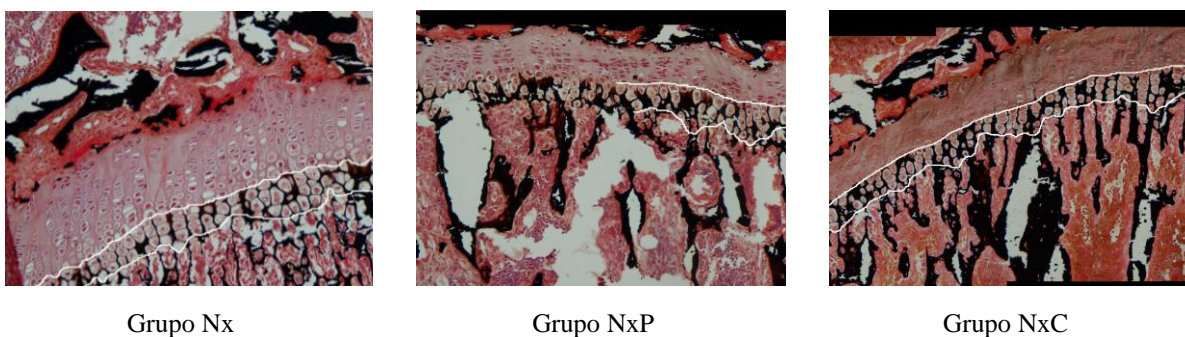
Grupo NxP

Grupo NxP

5.5.2 Mineralización

La tinción con VonKossa + Hematoxilina + Ponceau, reveló a nivel de la unión osteocondral un aumento en la mineralización trabecular (μm) en los grupo Nx y NxP frente al control (Control $57,11 \pm 1,6$, Nx $82,58 \pm 4,1^a$, NxP $81,66 \pm 8,4^a$, NxC $70,44 \pm 1,9^{a,b}$). Los datos son $X \pm \text{EEM}$. ^a diferente al valor control de referencia; ^b diferente al grupo Nx; ^c diferente al grupo NxP ($p \leq 0,05$). El calcitriol disminuyó la altura del frente de mineralización aunque no consiguió normalizarlo, según los valores control de referencia de la sección “Material y Métodos”.

Figuras 10. Altura de la mineralización de la placa de crecimiento de los grupos control, Nx, NxP y NxC con tinción de VK. Reconstrucción digital de fotos del cartílago de crecimiento para medición altura de la mineralización con Osteo®



5.5.3 Morfometría y microarquitectura ósea

5.5.3.1 Espongiosa primaria

La densidad mineral del hueso a nivel de la espongiosa primaria fue menor en los tres grupos de ratas urémicas comparada con los valores controles de referencia (Tabla 14.). El porcentaje de volumen óseo, el número de trabéculas, y su separación fueron diferentes en los grupos tratados con respecto al Nx y a los valores normales de referencia de la sección de “Material y Métodos”.

Tabla 14. Densidad mineral ósea y características de la esponjosa primaria analizadas con microCT.

	Control	Nx	NxP	NxC
BMD g (Ca ⁺⁺ /cm ³)	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,0 ^a
BV/TV (%)	47,4 ± 4,1	43,1 ± 1,9	29,7 ± 2,9 ^b	28,3 ± 5,0 ^{a,b}
Tb.N (1/μm)	6,8 ± 0,5	7,0 ± 0,2	5,1 ± 0,6 ^b	4,7 ± 0,7 ^b
Tb.Th (μm)	69,2 ± 0,7	61,3 ± 2,1	59,6 ± 1,8 ^a	59,7 ± 2,3 ^a
Tb.Sp (μm)	94,8 ± 8,5	89,4 ± 2,7	149,5 ± 24,5 ^b	155,9 ± 27,6 ^b

BMD: Densidad mineral ósea. BV/TV Porcentaje de volumen óseo. Tb.N: Número de trabéculas. Tb.Th: Grosor de las trabéculas. Tb.Sp: Separación trabecular. Los datos se expresan como X ± EEM.

^a diferente al valor control de referencia; ^b diferente al grupo Nx (p≤0,05).

5.5.3.2 Esponjosa secundaria

A nivel de la esponjosa secundaria, el tratamiento con calcitriol ejerció efecto adicional al producido por el fallo renal crónico haciendo al hueso aún más distinto del control sano. Esto ocurrió para todos los parámetros cuantificados a excepción de la separación entre las trabéculas.

Tabla 15. Densidad mineral ósea y características de la esponjosa secundaria analizadas con microCT.

	Control	Nx	NxP	NxC
BMD g (Ca ⁺⁺ /cm ³)	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,0 ^b
BV/TV (%)	18,1 ± 2,8	29,5 ± 1,1	43,6 ± 9,1	45,9 ± 4,1 ^{a,b}
Tb.N (1/μm)	2,7 ± 0,4	4,2 ± 0,1	5,9 ± 1,2	5,7 ± 0,5 ^{a,b}
Tb.Th (μm)	67,4 ± 0,1	71,0 ± 1,3 ^a	72,5 ± 1,9 ^a	80,4 ± 3,4 ^{a,b}
Tb.Sp (μm)	216,5 ± 24,8	189,1 ± 5,5	186,8 ± 59,3	186,1 ± 24,1

BMD: Densidad mineral ósea. BV/TV Porcentaje de volumen óseo. Tb.N: Número de trabéculas. Tb.Th: Grosor de las trabéculas. Tb.Sp: Separación trabecular. Los datos se expresan como X ± EEM. Los datos se expresan como X ± EEM. ^a diferente al valor control de referencia; ^b diferente al grupo Nx (p≤0,05).

5.5.3.3 Hueso Cortical

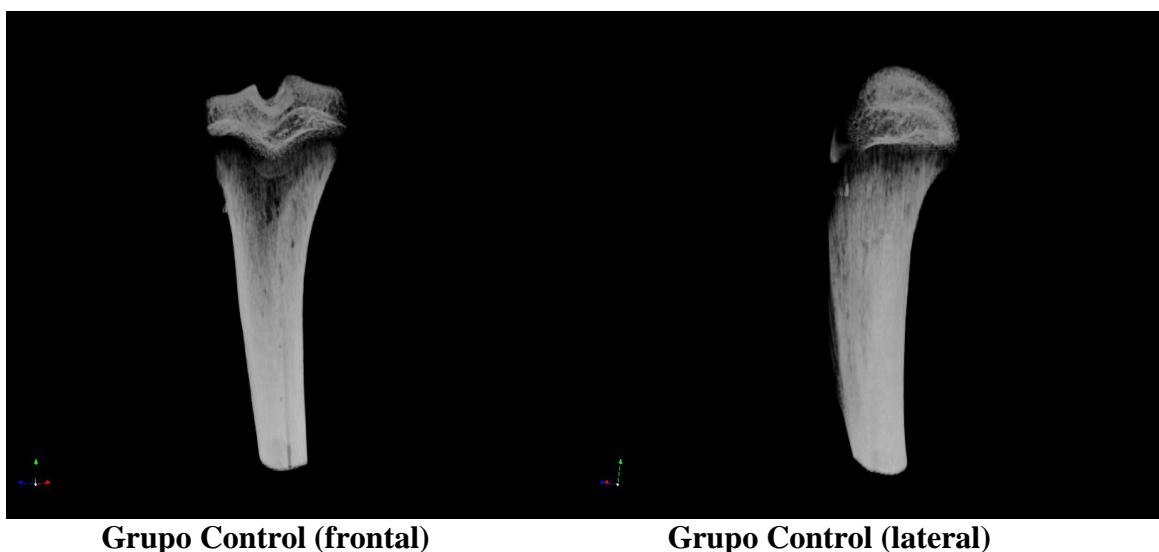
Tanto el grosor de la zona cortical como la densidad del tejido mineral estuvieron disminuidos en el grupo Nx, mientras que la porosidad sufrió un incremento muy llamativo. Ninguno de los dos tratamientos fue capaz de mejorar estos valores hacia la situación control teniendo en cuenta los valores control de referencia. Tanto el paricalcitol como el calcitriol tuvieron efecto negativo sobre el volumen del tejido cortical.

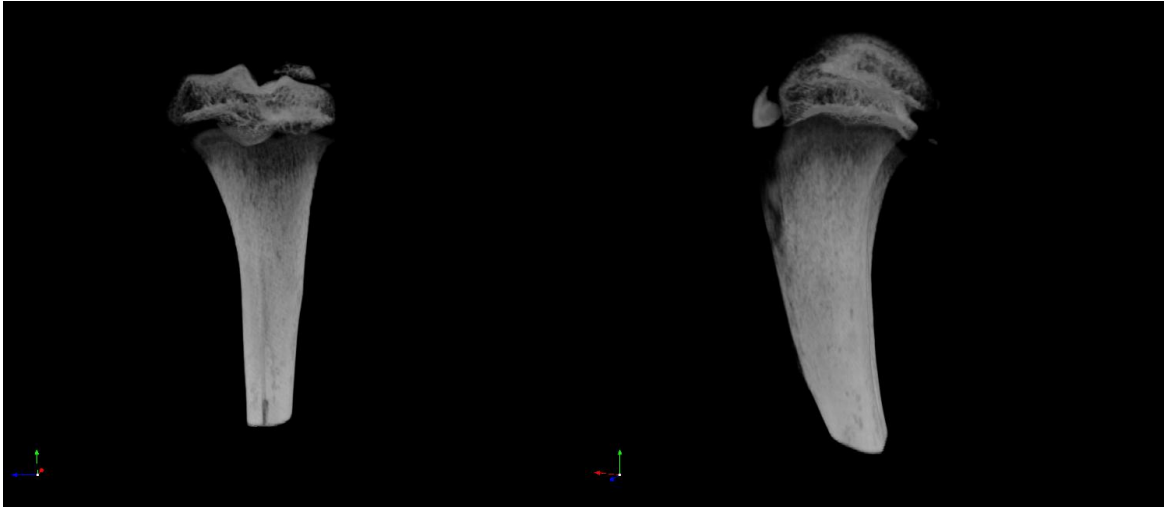
Tabla 16. Volumen óseo, grosor, porosidad y densidad del tejido mineral en el hueso cortical analizadas con microCT.

	Control	Nx	NxP	NxC
BV (mm ³)	3,8 ± 0,2	3,4 ± 0,1	2,6 ± 0,3 ^{a,b}	2,7 ± 0,3 ^{a,b}
Ct.Th (mm)	0,30 ± 0,0	0,16 ± 0,0 ^a	0,12 ± 0,0 ^a	0,12 ± 0,0
Ct.B.Po (%)	2,5 ± 0,4	15,2 ± 3,3	16,6 ± 2,7 ^a	20,9 ± 2,1 ^a
TMD (g/cm ³)	1,13 ± 0,0	1,01 ± 0,0 ^a	0,98 ± 0,0 ^a	1,02 ± 0,0 ^a

BV: Volumen óseo cortical. Ct.Th: Grosor cortical. Ct.B.Po: Porosidad hueso cortical. TMD: Densidad tejido mineral. Los datos se expresan como X ± EEM. ^a diferente al valor control de referencia; ^b diferente al grupo Nx (p≤0,05).

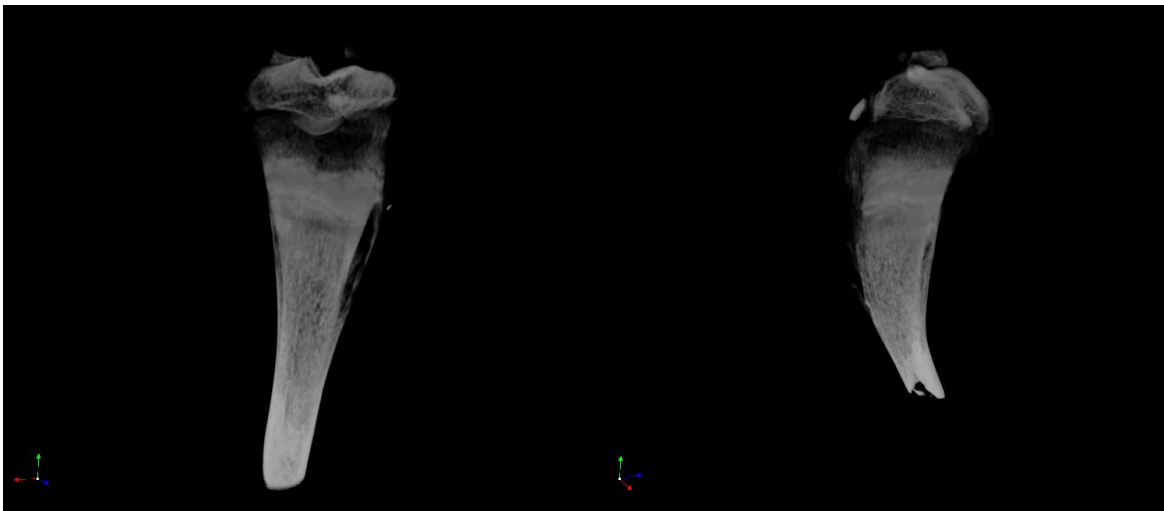
Figuras 11. Reconstrucción tridimensional de imágenes representativas por microCT de tibias de un control sano, Nx, NxP y NxC, planos frontal y lateral.





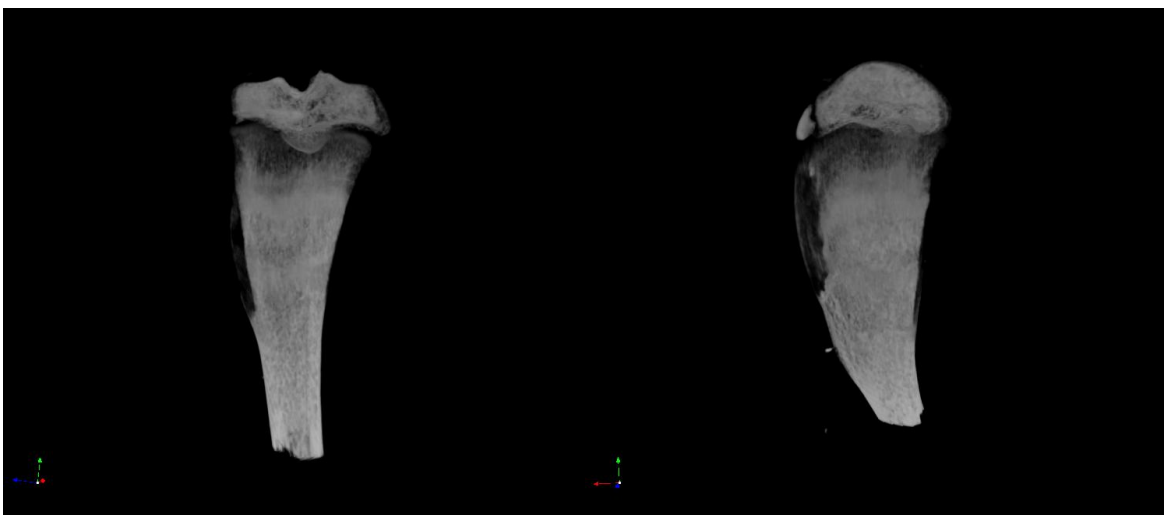
Grupo Nx (frontal)

Grupo Nx (lateral)



Grupo NxP (frontal)

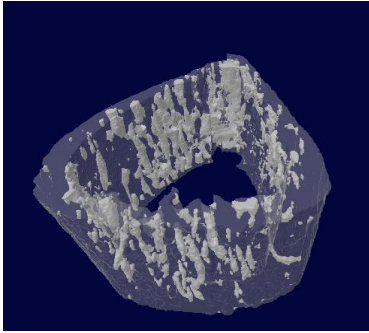
Grupo NxP (lateral)



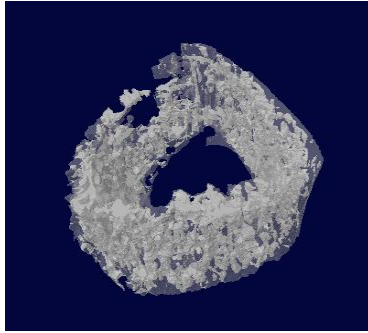
Grupo Nx C (frontal)

Grupo Nx C (lateral)

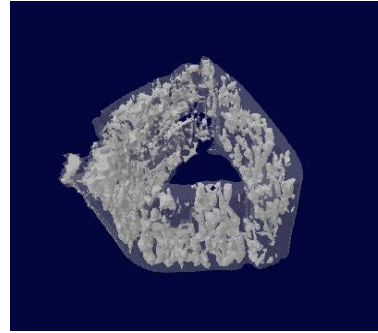
Figuras 12. Reconstrucción tridimensional de imágenes por microCT de poros en corte transversal de hueso cortical de grupos Nx, NxP y NxC. Los poros son representados por imagen sólida.



Grupo Nx



Grupo NxP



Grupo NxC

6 DISCUSIÓN

6.1 El modelo experimental

La nefrectomía subtotal o de 5/6 es un modelo ampliamente empleado de ERC, útil para investigar los mecanismos fisiopatológicos de esta entidad y, cuando se prolonga el seguimiento, para reproducir la glomerulosclerosis secundaria a la disminución de la masa renal funcionante que acaece en los seres humanos. Una vez adquirida la experiencia, la cirugía es fácil de ejecutar, el protocolo produce proteinuria y reducción de la TFG, y aunque no se utilizó en esta ocasión, ofrece la posibilidad de comparar el riñón terminal con el riñón sano de la primera nefrectomía en un mismo individuo. Desde la implementación de esta técnica en nuestro laboratorio en el año 1991 para el estudio del hipocrecimiento en la ERC, la tasa de complicaciones y muerte ha sido baja, y este estudio no fue la excepción con una mortalidad del 4,2%. Un animal del grupo NxP murió durante el protocolo, sin que se pudiese establecer relación causal con el procedimiento quirúrgico y/o con el tratamiento farmacológico.

Previamente al protocolo final utilizado en este trabajo se ensayaron otros dos, basados en experimentos realizados por nuestro grupo⁽¹¹⁴⁾, buscando un modelo de rápida inducción de HPTs para no sobrepasar la edad prepuberal de la rata, y que ofreciera las condiciones patológicas necesarias para evaluar la actividad terapéutica de los AVDR. El primero utilizó ratas con nefrectomía 5/6 frente a un grupo *Sham* y *pair-fed*, comparando la administración de paricalcitol, paricalcitol más hormona de crecimiento (GHr), y ratas sin tratamiento. La dosis de paricalcitol fue de 0,24 µg/kg cada 48 horas por vía intraperitoneal (IP) con una dieta de alto contenido en P (1,2%) para todos los grupos. Con este modelo, similar al trabajo de Jiang y cols.⁽¹¹⁵⁾, se consiguió producir HPTs gracias a una dieta rica en fosfatos adicional a la ERC. Sin embargo, este modelo falló en conseguir una reducción de la PTH con el tratamiento con AVDR, lo que motivó a cambiar la estrategia aumentando la dosis de paricalcitol a 0,24 µg/kg cada 24 horas IP, conservando el grupo tratado con GHr y paricalcitol a la nueva dosis, y adicionando un grupo tratado con calcitriol a una dosis equiparable a la del activador selectivo, de 0,08 µg/kg cada 24 horas IP, mientras la dieta continuó alta en P para los tres grupos. En esta oportunidad a pesar de la titulación de la dosis de los AVDRs tampoco se logró una reducción significativa en los valores de PTH,

y de forma llamativa igual que en el primer protocolo, los niveles séricos de P fueron inusualmente altos. La falta de respuesta de la PTH al tratamiento con AVDRs tanto selectivos como no selectivos, pudo deberse a varias situaciones: a una disminución en el aclaramiento renal de PTH₍₁₁₆₎, a una mayor estabilidad de la molécula de PTH en ambientes hiperfosforémicos₍₈₇₎ y/o a la represión del ARNm del PTHR con dietas ricas en P₍₁₁₇₎.

Finalmente se administró una dosis fija de paricalcitol 1 µg y calcitriol de 0,25 µg por sonda orogástrica cada 48 horas con el fin de reducir la PTH manteniendo los valores séricos de Ca y P dentro de límites normales, y paralelamente se disminuyó el contenido de P en la dieta (0,85%). En esta ocasión se evaluaron la morfometría ósea, el balance mineral total así como los depósitos de calcio en tejidos blandos como aorta y riñón, disminuyendo la prioridad del análisis de crecimiento y virando hacia un modelo de calcificación vascular que investiga y compara los efectos de un AVDR selectivo contra uno no selectivo, bajo una dieta moderadamente alta en P. El protocolo establece un paralelismo con la práctica clínica en sujetos en estadios prepuberales con ERC y el efecto de la intervención terapéutica con AVDRs sobre el metabolismo mineral, la osificación endocondral y el crecimiento. Sin embargo, como se comentará también posteriormente, algunos de los efectos encontrados indican que el modelo obtenido fue “agresivo” y de alguna manera “extremo” permitiendo el análisis de mecanismos fisiopatológicos pero no reproduciendo adecuadamente muchas situaciones clínicas de ERC más progresivas y posiblemente menos “violentas”. No obstante, con mayor o menor extensión, ésta es una limitación de los estudios experimentales en animales, máxime en nuestro caso en el que la necesidad de emplear ratas prepuberales, para el mejor análisis del crecimiento, obliga a que las intervenciones terapéuticas o dietéticas produzcan un efecto apreciable en un breve plazo de tiempo.

6.2 Hiperparatiroidismo secundario

La validación del modelo experimental se basó en el desarrollo de un marcado HPTs y de la disminución de los niveles de PTH en los dos grupos tratados. Si bien se encontraron diferencias entre los grupos Nx y Nx_C, no sucedió lo mismo con el grupo Nx_P

que mostró una tendencia a la reducción de la PTH sin poder estadístico. Si bien en este sentido el tratamiento con paricalcitol fue menos efectivo, se logró una disminución de un 38% del valor de PTH lo cual se sitúa dentro del rango diana de descenso entre un 30 - 60% de los valores de PTH recomendado en las guías mundiales de manejo del HPTs a ERC₍₁₁₈₎ y sitúa a ambos fármacos como posibles opciones para el tratamiento de este HPTs. Varios condicionantes pueden explicar que la concentración sérica de PTH encontrada en el grupo NxP no haya sido diferente con significancia estadística de la del grupo Nx. Así, es presumible que la inclusión de un mayor número de animales por grupo, la posibilidad de haber comparado cada individuo consigo mismo antes y después del tratamiento así como la obtención de un HPTs menos acusado hubiera permitido encontrar una diferencia significativa. A este respecto la fiabilidad de las medidas de PTH sérica fue comprobada enviando muestras a otros laboratorios con experiencia en el análisis de PTH en estudios experimentales, ratificándose los resultados obtenidos en nuestro experimento. Un meta-análisis reciente que incluyó 10 estudios clínicos con 734 pacientes comparó la eficacia de paricalcitol y AVDR no selectivos en el tratamiento del HPTs sin encontrar diferencias estadísticas, ni en la reducción de la PTH ni en la proporción de pacientes que alcanzaron la diana esperada, definida como una reducción entre el 30 y 50% de los valores iniciales de PTH₍₁₁₉₎.

Estudios en humanos han establecido que la relación de dosis entre calcitriol y paricalcitol ideal para lograr un efecto sobre la PTH es de 4:1₍₁₂₀₎ relación que se utilizó en nuestro estudio (paricalcitol 1 µg: calcitriol 0,25 µg), aunque no existan datos publicados en la literatura que validen esta equivalencia en ratas jóvenes. Respecto la duración del tratamiento, estudios en ratas adultas han demostrado la eficacia del paricalcitol en dosis entre 0,008 y 0,01 µg/rata IP en periodos de 2 semanas₍₁₂₁₎ de 8 semanas₍₁₂₂₎ y hasta de 15 semanas₍₁₂₀₎ con un contenido de P en la dieta cercano a 0,8% en los dos primeros y normal en el último. En el presente estudio, el impacto sobre la PTH se buscó a los 22 días intentando no sobrepasar la etapa puberal de la rata por lo que desconocemos si con periodos más largos de tratamiento el comportamiento hubiese sido diferente. En humanos con ERC, tanto la formulación oral como parenteral de calcitriol han sido efectivas para tratar o prevenir el HPTs_(123,124). En nuestro protocolo final, los AVDR se administraron por

vía oral y a días alternos, una pauta similar a la seguida por pacientes con ERC en prediálisis o diálisis.

6.3 Balance mineral

Teniendo en cuenta la elevación de creatinina entre 3-4 veces por encima de los valores de referencia de ratas de similar edad en nuestro laboratorio en todos los grupos del estudio, el modelo de ERC es comparable a un estadio 3 a 4 de ERC en humanos, con la reducción de la TFG necesaria para que se observen las alteraciones metabólicas subsiguientes. Aunque estudios en animales han demostrado menor efecto calcémico y fosforémico del paricalcitol frente a los AVDR no selectivos como el doxercalciferol y el calcitriol^(99,125) en el presente estudio no hubo diferencias en los valores de Ca, P y producto CaxP entre los grupos si bien hubo tendencia hacia un menor producto CaxP en el grupo NxP relacionado con un menor nivel en el P sérico. Pese a la potencia del tratamiento de nuestro protocolo, no se detectó hipercalcemia en los grupos NxP y NxC, lo cual puede ser explicado por la acción supresora del P de la dieta sobre la actividad de la vitamina D₍₁₂₆₎. El meta-análisis publicado por Cai y cols. no encontró diferencias estadísticas en la calcemia, fosforemia o producto CaxP de los grupos tratados con paricalcitol frente a sus grupos controles, así como bajo un modelo estadístico de efecto-fijo, los episodios de hipercalcemia en tres estudios no fueron diferentes entre la activación selectiva del VDR y el control⁽¹¹⁹⁾.

El balance total de calcio fue similar en los tres grupos con tendencia a valores menores de absorción intestinal de Ca en los dos grupos con tratamiento frente al Nx. Esto difiere de ciertas publicaciones en las que ratas urémicas tratadas con calcitriol exhibieron un mayor contenido de VDR intestinal con mayor absorción de calcio y el subsecuente efecto hipercalcémico⁽¹²⁵⁾. Otro estudio en ratas con función renal normal, demostró una mayor absorción intestinal de Ca y aumento de Ca urinario en el grupo tratado con calcitriol frente al grupo con paricalcitol⁽¹²¹⁾. En un estudio clínico con pacientes con ERC estadios 2 a 4, el paricalcitol disminuyó la excreción urinaria de Ca comparado al calcitriol

(127). La ausencia de diferencias en el balance cálcico entre los grupos de nuestro trabajo puede deberse al efecto supresor del P de la dieta sobre la actividad intestinal del calcitriol y/o a las características únicas del metabolismo mineral en individuos prepuberales en situación de rápido crecimiento y balance positivo de Ca.

En el balance de P, el grupo Nx_C reveló una menor excreción urinaria respecto al grupo Nx pero esto no se tradujo en diferencias en la absorción neta ni el balance total. Si hubo diferencias entre el grupo Nx_P y el Nx basado en una menor absorción intestinal neta en el grupo tratado. Un estudio en ratas normales sometidas a dieta alta en P con contenido normal de Ca₍₁₂₈₎ describió un aumento en las excreciones urinaria e intestinal de P, con una disminución de la excreción urinaria de Ca sin afectar la excreción intestinal. Por el contrario, en nuestro estudio, la diferencia en el balance total de P en el grupo Nx_P se basó en una mayor excreción a nivel intestinal, lo que puede explicarse por la incapacidad para incrementar la excreción urinaria del P en la uremia que fue compensada a nivel intestinal con la administración de paricalcitol. Respecto al P, existen resultados antagónicos en trabajos en humanos, uno de ellos reporta hiperfosforemia severa en pacientes tratados con calcitriol frente a niveles casi normales en quienes recibieron paricalcitol₍₁₂₉₎ y otro que señala valores de P similares en ambos grupos₍₁₂₀₎.

6.4 Crecimiento corporal

Los datos relativos a nutrición (ganancia de peso, ingesta acumulada y eficacia de la alimentación) mostraron una menor ingesta acumulada en el grupo Nx_P frente al grupo Nx. La eficacia en la alimentación fue menor en el grupo Nx_C. No hubo diferencias en la ganancia de peso a pesar de que se notó una menor ingesta global en el grupo Nx_P. El incremento en longitud hocico-cola tampoco mostró diferencias entre los grupos.

6.5 Función e histología renal

Los tres grupos de ratas de nuestro estudio mostraron alteraciones histológicas congruentes con ERC en estadio terminal. Sin embargo, el grupo Nx_C mostró mayor

afectación tubular con un importante infiltrado inflamatorio intersticial de predominio linfocítico aunque esto no se vio reflejado en la TFG, como se discute mas adelante. Los tres grupos presentaron proteinuria masiva sin diferencias, al final de protocolo. Estudios en ratas con ERC describen rangos de proteinuria entre 200–600 mg/24h, desde la segunda semana de la nefrectomía 5/6 con hipertrofia glomerular en la fase aguda evolucionando a esclerosis segmentaria y focal mas fibrosis intersticial y atrofia tubular para la cuarta semana₍₁₃₀₎. La acción antiproteinúrica de los AVDR se explica por diferentes acciones: supresión del eje renina-angiotensina-aldosterona, regulación de la inflamación/fibrosis o por efectos directos en el podocito. En un estudio experimental, la activación de la transcripción del gen de la nefrina en cultivos de podocitos ejerció una acción protectora antiapoptótica directa sobre el podocito, conservando la integridad de la hendidura diafragmática y disminuyendo la filtración de proteínas₍₁₃₁₎. Otro estudio valida los efectos de pleiotrópicos del calcitriol y el paricalcitol reduciendo la expresión de mediadores inflamatorios en un modelo experimental de diabetes en cultivos de células renales₍₁₃₂₎. Los ensayos clínicos que evalúan el efecto pleiotrópico de los AVDR sobre la proteinuria en pacientes con diferentes estadios de ERC_(107,133,134) mostraron modificaciones modestas del cociente proteinuria/creatinuria mientras que en un estudio en proteinuria diabética₍₁₃₅₎ no se demostró un claro beneficio con al administración de paricalcitol sobre el cociente albuminuria/creatinuria ni sobre la función renal. En nuestro protocolo no hubo diferencias en el grado de proteinuria entre los grupos, posiblemente por la magnitud del daño histológico lo cual no apoya la posible acción citoprotectora y antiinflamatoria de los AVDR sobre el podocito.

Respecto a la función renal, el grupo Nx_C tuvo una mayor depuración de Cr comparada con los otros dos grupos, y no hubo diferencias entre los grupos Nx_P y Nx. Esto puede explicar las diferencias encontradas en el grado de calcificación aórtica y vasculatura renal en favor del calcitriol. A pesar de la pobre sensibilidad de la Cr debido a la secreción tubular en individuos con TFG muy baja, se ha reportado un aumento de la Cr sérica en pacientes con calcitriol que fue atribuida a la liberación de creatina muscular al mejorar la miopatía urémica gracias a la acción del AVDR₍₁₃₆₎ pero en nuestro modelo no hubo este aumento. Recientemente Agarwal y cols. determinaron el efecto del paricalcitol sobre la Cr

sérica en pacientes con ERC encontrando un aumento significativo de esta⁽¹⁰⁶⁾ lo que apoya los resultados de un meta-análisis que es consistente en demostrar que el uso de activadores selectivos y no selectivos de VDR altera el metabolismo de la Cr sin afectar la función renal medida por otros métodos⁽¹³⁷⁾. Las diferencias en la depuración de Cr a favor de una mejor función renal en el grupo Nx_C de nuestro protocolo, se pueden correlacionar con los hallazgos de Chen y cols. en pacientes en hemodiálisis. En dicho estudio, se determinó mediante regresión logística que a mayor grado de calcificación vascular menor función renal residual⁽¹³⁸⁾, situación idéntica a la observada en nuestro grupo Nx_C. Sin embargo, es posible que las variaciones en la creatinina sérica entre nuestros grupos, se puedan atribuir simplemente a diferencias en el grado de nefrectomía.

6.6 Calcificación en tejidos blandos

La cuantificación de calcificación de la aorta por microCT mostró un porcentaje diez veces mayor en el grupo Nx_C y 16 veces mayor en el grupo Nx_P frente a las Nx. Las imágenes de microCT aórtico son representativas de las áreas calcificadas sin observar mayor calcificación en la rata Nx y con altos grados de calcificación en la Nx_P. La hipercalcemia derivada de la activación no selectiva del VDR es la situación que varios estudios aducen para encontrar una mayor calcificación cardiovascular con la administración de calcitriol^(139, 140) pero no fue este nuestro caso. Un estudio clínico de calcificación valvular y aórtica comparando paricalcitol contra calcitriol, no mostró diferencias entre los dos AVDR⁽¹⁴¹⁾. Una posible explicación para que el grupo Nx_C, a pesar de no tener un menor producto CaxP, indujera menos calcificación tanto aórtica como renal, podría explicarse por una mayor capacidad del calcitriol para restaurar la señalización paracrina/intracrina de la vitamina D en tejidos periféricos sin aumentar necesariamente los niveles de Ca o P. En las células endoteliales, el calcitriol es capaz de inhibir la activación de citoquinas y la expresión de moléculas de adhesión tipo TNF – α , como lo demostraron Zehnder y colaboradores⁽¹⁴²⁾.

6.7 Metabolismo óseo

Con respecto a la valoración dinámica del hueso, la actividad osteoclástica medida por TRAP estuvo aumentada en todos los grupos respecto al control sano, en coherencia con la enfermedad ósea del HPTs de la ERC. Se apreciaron diferencias significativas entre el grupo NxP y el NxC demostrando mayor actividad osteoclástica en el primero. El paricalcitol parece inducir una mayor actividad osteoclástica, disminuyendo el volumen óseo y movilizándolo Ca desde el hueso hacia células de tejidos blandos. Los hallazgos encontrados en la altura de la mineralización tibial son relevantes en los grupos con tratamiento indicando una enfermedad de recambio óseo alto relacionada con la administración de los AVDRs.

Respecto a la microarquitectura de las tibias se encontraron importantes diferencias entre la esponjosa primaria y la secundaria constituyendo una enfermedad ósea mixta. Los valores de la esponjosa primaria en los dos grupos tratados NxP y NxC no demostraron mejoría en el patrón mineralización con diferencias estadísticas frente al Nx en el que hubo reducción del número de trabéculas y aumento de la separación trabecular. Sin embargo en la esponjosa secundaria ambos tratamientos estimularon el recambio óseo e intentaron mejorar la BMD, el volumen óseo así como el grosor y número de trabéculas, disminuyendo la distancia entre ellas. Respecto al hueso cortical, no hubo impacto positivo del tratamiento con paricalcitol ni con calcitriol en los parámetros analizados. Se observó una enfermedad de recambio óseo alto resultante del HTPs pero asociada a signos de osteomalacia por la introducción de dosis suprafisiológicas de AVDRs, que suprimen la PTH pero que dejan al hueso metabólicamente lento lo cual favorece la migración de Ca y P hacia el tejido vascular produciendo calcificaciones. Los hallazgos del hueso cortical indican una disminución importante de la BMD y del grosor de la pared cortical. Por tanto, el paricalcitol modifica la PTH pero si se introduce tardíamente en un medio urémico y con dieta enriquecida en P, algo similar a lo que ocurre en la práctica clínica, no previene y más bien facilita la calcificación. Datos experimentales han mostrado supresión de la PTH con AVDR no selectivos como calcitriol⁽¹⁴³⁾ así como selectivos como maxacalcitol y paricalcitol⁽¹⁴⁴⁾ pero con un mínimo efecto sobre el recambio óseo.

En resumen, el modelo experimental tenía el reto de observar el metabolismo mineral, la función e histología renal, la arquitectura y dinámica óseas así como la

calcificación vascular bajo dosis altas de AVDR y en un medio enriquecido con P, en ratas con HPTs a fallo renal. Si bien se logró disminuir la PTH manteniendo la calcemia en rango normal, el tratamiento con paricalcitol indujo calcificaciones en aorta y riñones que se tradujeron en una menor disposición de Ca para la mineralización ósea. Este modelo recuerda al HPT terciario donde la calcificación extraósea no responde a la terapéutica disponible, independientemente de las dosis utilizadas.

7 CONCLUSIONES

- 7.1** El protocolo descrito produce un modelo experimental de marcado hiperparatiroidismo secundario inducido por fallo renal y dieta alta en fósforo en ratas jóvenes en fase de rápido crecimiento corporal.
- 7.2** Respecto al tratamiento con paricalcitol en este modelo se concluye que:
 - 7.2.1** Mejora el hiperparatiroidismo sin provocar hipercalcemia ni hiperfosforemia
 - 7.2.2** No ejerce efecto protector sobre el daño renal
 - 7.2.3** Resulta en una masiva calcificación u osificación de las paredes de la aorta
 - 7.2.4** No tiene efecto sobre el crecimiento corporal
 - 7.2.5** No mejora la estructura del hueso valorada por histomorfometría y microCT
 - 7.2.6** No es superior al tratamiento con calcitriol con respecto a las variables anteriores

8 REFERENCIAS

1. Massry S. (2003). K/DOQI guidelines released on bone metabolism and disease in CKD. *Nephrol News Issues*, 17(12), 38-44.
2. Moe S., Drueke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, et al. (2013). Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes KDIGO. *Kidney Int*, 6911, 1945-53.
3. Moe S.M. (2008). Disorders involving calcium, phosphorus, and magnesium. *Prim Care*, 35(2), 215-37, v-vi.
4. Davies M.R., Lund R.J., Mathew S., Hruska K.A. (2005). Low turnover osteodystrophy and vascular calcification are amenable to skeletal anabolism in an animal model of chronic kidney disease and the metabolic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 16(4), 917-28.
5. Block G.A., Hulbert-Shearon T.E., Levin N.W., Port F.K. (1998). Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: A national study. *Am J Kidney*, 31, 601–17.
6. Potts J.T., Gardella T.J. (2007) Progress, paradox, and potential: parathyroid hormone research over five decades. *Ann N Y Acad Sci*, 1117,196-208.
7. Jurutka P.W., Whitfield G.K., Hsieh J.C., Thompson P.D., Haussler C.A., Haussler M.R. (2001). Molecular nature of the vitamin D receptor and its role in regulation of gene expression. *Rev Endocr Metab Disord*, 2(2), 203-16.
8. Brown E.M. (2007) The calcium-sensing receptor: physiology, pathophysiology and CaR-based therapeutics. *Subcell Biochem* 45,139-67.
9. de Groot T., Lee K., Langeslag M., Xi Q., Jalink K., Bindels R.J., Hoenderop J.G. (2009) Parathyroid hormone activates TRPV5 via PKA-dependent phosphorylation. *J Am Soc Nephrol*, 20(8), 1693-1704.
10. Imanishi Y., Inaba M., Nakatsuka K., Nagasue K., Okuno S., Yoshihara A., Miura M., Miyauchi A., Kobayashi K., Miki T. (2004). FGF-23 in patients with end-stage renal disease on hemodialysis. *Kidney Int*, 65, 1943-46.
11. Levin A., Bakris G.L., Molitch M., Smulders M., Tian J., Williams L.A., et al. (2007). 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*, 711, 31-8.
12. Rodriguez M., Canadillas S., Lopez I., Aguilera-Tejero E., Almaden Y. (2006). Regulation of parathyroid function in chronic renal failure. *J Bone Miner Metab*, 24, 164 –68.
 13. Berndt T.J., Schiavi S., Kumar R. (2005) "Phosphatonins" and the regulation of phosphorus homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289(6), F1170-82.
 14. Moranne O., Froissart M., Rossert J., Gauci C., Boffa J.J., Haymann J.P., et al. (2009) Timing of onset of CKD-related metabolic complications. *J Amer Soc Nephrol*, 201:164-71.
 15. Llach F., Massry S.G., Koffler A. (1977) Secondary hyperparathyroidism in early renal failure: role of phosphate retention. *Kidney Int*, 12:459-63.
 16. Block G.A., Klassen P.S., Lazarus J.M., Ofsthun N., Lowrie E.G., Chertow G.M. (2004) Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Amer Soc Nephrol*, 158, 2208-18.
 17. Moe S.M., Drueke T.B. (2003) Management of secondary hyperparathyroidism: the importance and the challenge of controlling parathyroid hormone levels without elevating calcium, phosphorus, and calcium-phosphorus product. *American journal of nephrology*, 236, 369-79.
 18. Tentori F., Blayney M.J., Albert J.M., Gillespie B.W., Kerr P.G., Bommer J., et al. (2008). Mortality risk for dialysis patients with different levels of serum calcium, phosphorus, and PTH: the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study DOPPS. *Am J Kidney Dis*, 523, 519-30.
 19. Floegue J. (2008) Calcium-containing phosphate binders in dialysis patients with cardiovascular calcifications: should we CARE-2 avoid them? *Nephrol Dial Transplant*, 2310, 3050-2.
 20. Palmer S.C., Hayen A., Macaskill P., Pellegrini F., Craig J.C., Elder G.J., Strippoli G.F. (2011) Serum levels of phosphorus, parathyroid hormone, and calcium and risks of death and cardiovascular disease in individuals with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 305(11),1119-27.

21. Hruska K.A., Mathew S., Lund R. (2008). Osteoporosis and cardiovascular disease: lessons from chronic kidney disease. *Clin Cases Miner Bone Metab*, 5(1), 35-9.
22. Drüeke T.B., Massy Z.A.. (2016) Changing bone patterns with progression of chronic kidney disease. *Kidney Int*, 892, 289-302.
23. Drüeke T.B. (2000) Cell biology of parathyroid gland hyperplasia in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 11, 1141–1152.
24. Ritter C.S., Finch J.L., Slatopolsky E.A., Brown A.J. (2001) Parathyroid hyperplasia in uremic rats precedes down-regulation of the calcium receptor. *Kidney Int*, 60, 1737–1744.
25. Rodriguez M.E., Almaden Y., Canadillas S., Canalejo A., Siendones E., Lopez I., Aguilera-Tejero E., Martin D., Rodriguez M. (2007). The calcimimetic R-568 increases vitamin D receptor expression in rat parathyroid glands. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292, F1390 –F1395.
26. Silver J., Levi R. (2005). Cellular and molecular mechanisms of secondary hyperparathyroidism. *Clin Nephrol*, 632,119-126.
27. Kurosu H., Kuro O.M.. (2009). The Klotho gene family as a regulator of endocrine fibroblast growth factors. *Molec Cell Endocrinol*, 2991, 72-8.
28. Hu M.C., Shi M., Zhang J., Pastor J., Nakatani T., Lanske B., Razzaque M.S., Rosenblatt K.P., Baum M.G., Kuro-o M., Moe O.W. (2010) Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule *FASEB J*, 249, 3438-50.
29. Isakova T., Gutierrez O., Shah A., Castaldo L., Holmes J., Lee H., Wolf M. (2008). Postprandial mineral metabolism and secondary hyperparathyroidism in early CKD. *J Am Soc Nephrol*, 19, 615–623.
30. Hu M.C., Shi M., Zhang J., Quinones H., Griffith C., Kuro-o M., et al. (2011). Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *JASN*, 221, 124-36.
31. Lim K., Lu T.S., Molostvov G., Lee C., Lam F.T., Zehnder D., et al. (2012). Vascular klotho deficiency potentiates the development of human artery calcification and mediates resistance to fibroblast growth factor 23. *Circulation*, 12518, 2243-55.

32. Ohnishi M., Nakatani T., Lanske B., Razzaque M.S. (2009). In vivo genetic evidence for suppressing vascular and soft-tissue calcification through the reduction of serum phosphate levels, even in the presence of high serum calcium and 1,25-dihydroxyvitamin d levels. *Circ Cardiovasc Genet*, 26, 583-90.
33. Fan Y., Bi R., Densmore M.J., Sato T., Kobayashi T., Yuan Q., et al. (2016). Parathyroid hormone 1 receptor is essential to induce FGF23 production and maintain systemic mineral ion homeostasis. *FASEB J*, 30(1), 428-40.
34. Meir T., Durlacher K., Pan Z., Amir G., Richards W.G., Silver J., et al. (2014). Parathyroid hormone activates the orphan nuclear receptor Nurr1 to induce FGF23 transcription. *Kidney Int*, 866, 1106-15.
35. Lopez I., Rodriguez-Ortiz M.E., Almaden Y., Guerrero F., de Oca A.M., Pineda C., et al. (2011). Direct and indirect effects of parathyroid hormone on circulating levels of fibroblast growth factor 23 in vivo. *Kidney Int*, 805, 475-82.
36. Galitzer H., BenDov I.Z., Silver J., Naveh Many T. (2010). Parathyroid cell resistance to fibroblast growth factor 23 in secondary hyperparathyroidism of chronic kidney disease. *Kidney Int*, 773, 211-8.
37. Canalejo R., Canalejo A., Martinez-Moreno J.M., Rodriguez-Ortiz M.E., Estepa J.C., Mendoza F.J., Munoz-Castaneda J.R., Shalhoub V., Almaden Y., Rodriguez M. J. (2010). FGF23 fails to inhibit uremic parathyroid glands. *JASN*, 21(7),1125-35.
38. Komaba H., Goto S., Fujii H., Hamada Y., Kobayashi A., Shibuya K., et al. (2010). Depressed expression of Klotho and FGF receptor 1 in hyperplastic parathyroid glands from uremic patients. *Kidney Int*, 773, 232-8.
39. Koizumi M., Komaba H., Fukagawa M. (2013). Parathyroid function in chronic kidney disease: role of FGF23-Klotho axis. *Contrib Nephrol*, 180, 110-23.
40. Sela-Brown A., Russell J., Koszewski N.J., Michalak M., Naveh-Many T., Silver J. (1998). Calreticulin inhibits vitamin D's action on the PTH gene in vitro and may prevent vitamin D's effect in vivo in hypocalcemic rats. *Mol Endocrinol*, 128, 1193-1200.
41. Dusso A.S. (2003). Vitamin D receptor: Mechanisms for vitamin D resistance in renal failure. *Kidney Int Suppl*, 85, 6-9.

42. Naveh-Many T., Rahamimov R., Livni N., Silver J. (1995). Parathyroid cell proliferation in normal and chronic renal failure rats. The effects of calcium, phosphate, and vitamin D. *J Clin Invest*, 96,1786-93.
43. Zehnder D., Bland R., Walker E.A., Bradwell A.R., Howie A.J., Hewison M., et al. (1999). Expression of 25-hydroxyvitamin D-3-1 alpha-hydroxylase in the human kidney. *JASN*, 1012, 2465-73.
44. Cuppari L., Garcia-Lopes M.G. (2009). Hypovitaminosis D in chronic kidney disease patients: prevalence and treatment. *J Ren Nutr*, 19(1), 38-43.
45. Mehrotra R., Kermah D., Budoff M., Salusky I.B., Mao S.S., Gao Y.L., et al. (2008). Hypovitaminosis D in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 34, 1144-51.
46. Hu M.C., Shiizaki K., Kuro-o M., Moe O.W. (2013). Fibroblast Growth Factor 23 and Klotho: Physiology and Pathophysiology of an Endocrine Network of Mineral Metabolism. *Annu Rev Physiol*, 75, 503–533.
47. Kazama J.J., Shigematsu T., Yano K., Tsuda E., Miura M., Iwasaki Y., Kawaguchi Y., Gejyo F., Kurokawa K., Fukagawa M. (2002). Increased circulating levels of osteoclastogenesis inhibitory factor (osteoprotegerin) in patients with chronic renal failure. *Am J Kidney Dis*, 39(3), 525-532.
48. Hu M.C., Kuro-o M., Moe O.W. (2012). The emerging role of Klotho in clinical nephrology. *Nephrol Dial Transplant*, 277, 2650-7.
49. Berndt T.J., Bielez B., Craig T.A., Tebben P.J., Bacic D., Wagner C.A., O'Brien S., Schiavi S., Biber J., Murer H., Kumar R. (2006) Secreted frizzled-related protein-4 reduces sodium-phosphate co-transporter abundance and activity in proximal tubule cells. *Pflugers Arch*, 451(4),579-87.
50. Evenepoel P., D'Haese P., Brandenburg V. (2015). Sclerostin and DKK1: new players in renal bone and vascular disease. *Kidney Int*, 882, 235-40.
51. Frye M.A., Melton L.J. 3rd, Bryant S.C., Fitzpatrick L.A., Wahner H.W., Schwartz R.S., Riggs B.L. (1992). Osteoporosis and calcification of the aorta. *Bone Miner*, 19(2), 185-94.

52. Chan J.J., Cupples L.A., Kiel D.P., O'Donnell C.J., Hoffmann U., Samelson E.J. (2015). QCT Volumetric Bone Mineral Density and Vascular and Valvular Calcification: The Framingham Study. *J Bone Miner Res*, 30(10),1767-74.
53. Adragao T., Herberth J., Monier-Faugere M.C., Branscum A.J., Ferreira A., Frazao J.M., Dias Curto J, Malluche H.H. (2009) Low bone volume-a risk factor for coronary calcifications in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol*, 4(2), 450-5.
54. Cannata-Andía J.B., Rodríguez-García M., Carrillo-López N., Naves-Díaz M., Díaz-López B. (2006) Vascular calcifications: pathogenesis, management, and impact on clinical outcomes. *JASN*, 17(12 Suppl 3), S267-73.
55. Proudfoot D., Skepper J.N., Hegyi L., Bennett M.R., Shanahan C.M., Weissberg P.L. (2000) Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res*, 87(11), 1055-62.
56. Kockx M.M, De Meyer G.R., Muhring J., Jacob W., Bult H., Herman A.G. (1998). Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation*, 97(23), 2307-15.
57. Shanahan C.M, Crouthamel M.H, Kapustin A., Giachelli C.M. (2011). Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circ Res*, 109(6), 697-711.
58. Speer M.Y., Yang H.Y., Brabb T., Leaf E., Look A., Lin W.L., Frutkin A., Dichek D., Giachelli C.M. (2009). Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. *Circ Res*,104(6),733-41.
59. Chillon J.M., Mozar A., Six I., Maizel J., Bugnicourt J.M., Kamel S., Slama M., Brazier M., Massy Z.A. (2009). Pathophysiological mechanisms and consequences of cardiovascular calcifications: role of uremic toxicity. *Ann Pharm Fr*, 67(4), 234-40.
60. Shao J.S., Cai J., Towler D.A. (2006) Molecular mechanisms of vascular calcification: lessons learned from the aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26(7),1423-30.

61. Lau W.L., Festing M.H., Giachelli C.M. (2010). Phosphate and vascular calcification: Emerging role of the sodium-dependent phosphate co-transporter PiT-1. *Thromb Haemost*, 104(3), 464-70.
62. Jono S., Shioi A., Ikari Y., Nishizawa Y. (2006). Vascular calcification in chronic kidney disease. *J Bone Miner Metab*, 24(2), 176-181.
63. Shioi A., Nishizawa Y. (2009). Vascular calcification in chronic kidney disease: pathogenesis and clinical implications. *J Ren Nutr*, 19(1), 78-81.
64. El-Abbadi M.M., Pai A.S., Leaf E.M., Yang H.Y., Bartley B.A., Quan K.K., Ingalls C.M., Liao H.W., Giachelli C.M. (2009). Phosphate feeding induces arterial medial calcification in uremic mice: role of serum phosphorus, fibroblast growth factor-23, and osteopontin. *Kidney Int* 75(12), 1297-307.
65. Rong S., Zhao X., Jin X., Zhang Z., Chen L., Zhu Y., Yuan W. (2014). Vascular calcification in chronic kidney disease is induced by bone morphogenetic protein-2 via a mechanism involving the Wnt/ β -catenin pathway. *Cell Physiol Biochem*, 34(6), 2049-60.
66. Sun C.Y., Chang S.C., Wu M.S. (2012). Suppression of Klotho expression by protein-bound uremic toxins is associated with increased DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation. *Kidney Int*, 81(7), 640-50.
67. Kitagawa M., Sugiyama H., Morinaga H., Inoue T., Takiue K., Ogawa A., Yamanari T., Kikumoto Y., Uchida H.A., Kitamura S., Maeshima Y., Nakamura K., Ito H., Makino H. (2013). A decreased level of serum soluble Klotho is an independent biomarker associated with arterial stiffness in patients with chronic kidney disease. *PloS One*, 8(2), e56695.
68. Giachelli C.M. (2009). The emerging role of phosphate in vascular calcification. *Kidney Int*, 75(9), 890-7.
69. Mazhar A.R., Johnson R.J., Gillen D., Stivelman J.C., Ryan M.J., Davis C.L., Stehman-Breen C.O. (2001). Risk factors and mortality associated with calciphylaxis in end-stage renal disease. *Kidney Int*, 60(1), 324-32.
70. Anderson J.L., Vanwoerkom R.C., Horne B.D., Bair T.L., May H.T., Lappé D.L., Muhlestein J.B. (2011). Parathyroid hormone, vitamin D, renal dysfunction, and

- cardiovascular disease: dependent or independent risk factors? *Am Heart J*, 162(2), 331-339.
71. New chapter on CKD highlights changes to 15th annual USRDS report. (2003). [No authors listed] *Nephrol News Issues*, 17(12), 25-8.
 72. Wilson A.C., Schneider M.F., Cox C., Greenbaum L.A., Saland J., White C.T., Furth S., Warady B.A., Mitsnefes M.M. (2011). Prevalence and correlates of multiple cardiovascular risk factors in children with chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 6(12), 2759-65.
 73. Piovesan A., Molineri N., Casasso F., Emmolo I., Ugliengo G., Cesario F., Borretta G. (1999). Left ventricular hypertrophy in primary hyperparathyroidism. Effects of successful parathyroidectomy. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 50(3), 321-8.
 74. Hara S., Ubara Y., Arizono K., Ikeguchi H., Katori H., Yamada A., Ogura Y., Murata H., Mimura N. (1995). Relation between parathyroid hormone and cardiac function in long-term hemodialysis patients. *Miner Electrolyte Metab*, 21(1-3), 72-6.
 75. Mitsnefes M.M. (2005). Cardiovascular morbidity and mortality in children with chronic kidney disease in North America: lessons from the USRDS and NAPRTCS databases. *Perit Dial Int*, 25 Suppl 3, S120-2.
 76. Goodman W.G., Goldin J., Kuizon B.D., Yoon C., Gales B., Sider D., Wang Y., Chung J., Emerick A., Greaser L. et al. (2000). Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med*, 342(20), 1478-1483.
 77. Eifinger F., Wahn F., Querfeld U., Pollok M., Gevargez A., Kriener P., Grönemeyer D. (2000). Coronary artery calcifications in children and young adults treated with renal replacement therapy. *Nephrol Dial Transplant*, 15(11), 1892-4.
 78. Civilibal M., Caliskan S., Kurugoglu S., Candan C., Canpolat N., Sever L., Kasapcopur O., Arisoy N. (2009). Progression of coronary calcification in pediatric chronic kidney disease stage 5. *Pediatr Nephrol*, 24(3), 555-63.
 79. Litwin M., Wühl E., Jourdan C., Trelewicz J., Niemirska A., Fahr K., Jobs K., Grenda R., Wawer Z.T., Rajszyts P., Tröger J., Mehls O., Schaefer F. (2005).

- Altered morphologic properties of large arteries in children with chronic renal failure and after renal transplantation. *JASN*, 16(5), 1494-500.
80. Oh J., Wunsch R., Turzer M., Bahner M., Raggi P., Querfeld U, Mehls O & Schaefer F. (2002). Advanced Coronary and Carotid Arteriopathy in Young Adults With Childhood-Onset Chronic Renal Failure. *Circulation*, 106,100-105.
 81. Shroff R.C., Donald A.E., Hiorns M.P., Watson A., Feather S., Milford D., Ellins E.A., Storry C., Ridout D., Deanfield J., Rees L. (2007). Mineral metabolism and vascular damage in children on dialysis. *JASN*, 18(11), 2996-3003.
 82. Sozeri B., Mir S., Kara O.D., Levent E. (2010). When does the cardiovascular disease appear in patients with chronic kidney disease? *Pediatr Cardiol*, 31(6), 821-8.
 83. Amann K., Törnig J., Kugel B., Gross M.L., Tyralla K., El-Shakmak A., Szabo A., Ritz E. (2003). Hyperphosphatemia aggravates cardiac fibrosis and microvascular disease in experimental uremia. *Kidney Int*, 63(4), 1296-301.
 84. Giachelli C.M. (2003). Vascular calcification: in vitro evidence for the role of inorganic phosphate. *JASN*,14(9 Suppl 4), S300-4.
 85. Silver J., Levi R. (2005). Regulation of PTH synthesis and secretion relevant to the management of secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*, 95, S8-12.
 86. Sommer S., Berndt T., Craig T., Kumar R. (2007). The phosphatonins and the regulation of phosphate transport and vitamin D metabolism. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1033-5, 497-503.
 87. Tallon S., Berdud I., Hernandez A., Concepcion M.T., Almaden Y., Torres A., Martin-Malo A., Felsenfeld A.J., Aljama P., Rodriguez M. (1996). Relative effects of PTH and dietary phosphorus on calcitriol production in normal and azotemic rats. *Kidney Int*, 495, 1441-1446.
 88. Saito H., Maeda A., Ohtomo S., Hirata M., Kusano K., Kato S., Ogata E., Segawa H., Miyamoto K., Fukushima N (2005). Circulating FGF-23 is regulated by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and phosphorus in vivo. *J Biol Chem*, 2804, 2543-2549.

89. Katsumata S., Masuyama R., Koshihara M., Matsuzaki H., Uehara M., Suzuki K. (2004). Effect of high phosphorus diet on phosphorus metabolism in parathyroidectomized rats. *Biofactors*, 22(1-4), 33-7.
90. Nishida Y., Taketani Y., Yamanaka-Okumura H., Imamura F., Taniguchi A., Sato T., Shuto E., Nashiki K., Arai H., Yamamoto H et al. (2006). Acute effect of oral phosphate loading on serum fibroblast growth factor 23 levels in healthy men. *Kidney Int*, 70(12), 2141-2147.
91. Block GA. (2000). Prevalence and clinical consequences of elevated Ca x P product in hemodialysis patients. *Clin Nephrol*, 54(4), 318-24.
92. Tonelli M., Sacks F., Pfeffer M., Gao Z., Curhan G, Cholesterol And Recurrent Events Trial Investigators. (2005). Relation between serum phosphate level and cardiovascular event rate in people with coronary disease. *Circulation*, 112(17), 2627-33.
93. Suetonia C., Palmer M., Hayen A., Macaskill, P., Pellegrini F., Craig J., et al. (2011). Serum Levels of Phosphorus, Parathyroid Hormone, and Calcium and Risks of Death and Cardiovascular Disease in Individuals With Chronic Kidney Disease A Systematic Review and Meta-analysis *JAMA*, 305(11),1119-1127.
94. Noordzij M., Korevaar J.C., Boeschoten E.W., Dekker F.W., Bos W.J., Krediet R.T; Netherlands Cooperative Study on the Adequacy of Dialysis (NECOSAD) Study Group. (2005). The Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI) Guideline for Bone Metabolism and Disease in CKD: association with mortality in dialysis patients. *Am J Kidney Dis*, 46(5), 925-32.
95. Shroff R.C., McNair R., Figg N., Skepper J.N., Schurgers L., Gupta A., Hiorns M., Donald A.E., Deanfield J., Rees L., Shanahan C.M. (2008). Dialysis accelerates medial vascular calcification in part by triggering smooth muscle cell apoptosis. *Circulation*, 118(17), 1748-57.
96. Briese S., Wiesner S., Will J.C., Lembcke A., Opgen-Rhein B., Nissel R., et al. (2006.) Arterial and cardiac disease in young adults with childhood-onset end-stage renal disease—impact of calcium and vitamin D therapy. *Nephrol Dial Transplant*, 21 (7), 1906-1914.

97. Shroff R.C., McNair R., Skepper J.N., Figg N., Schurgers L.J., Deanfield J., Rees L., Shanahan C.M. (2010). Chronic mineral dysregulation promotes vascular smooth muscle cell adaptation and extracellular matrix calcification. *JASN*, 21(1), 103-12.
98. Dusso A.S. (2011). Kidney disease and vitamin D levels: 25-hydroxyvitamin D, 1,25-dihydroxyvitamin D, and VDR activation. *Kidney Int Suppl*, 1(4), 136-41.
99. Slatopolsky E., Finch J., Brown A. (2003). New vitamin D analogs. *Kidney Int Suppl* (85), S83-7.
100. Martínez-Moreno J.M., Munoz-Castañeda J.R., Herencia C., Oca A.M., Estepa J.C., Canalejo R., et al. (2012). In vascular smooth muscle cells paricalcitol prevents phosphate-induced Wnt/beta-catenin activation. *Am J Physiol Renal Physiol*, 303(8), F1136-44.
101. Rodríguez M., Martínez-Moreno J.M., Rodríguez-Ortiz M.E., Muñoz-Castañeda J.R., Almaden Y. (2011). Vitamin D and vascular calcification in chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res*, 34, 261-8
102. Teng M., Wolf M., Lowrie E. et al. (2003) Survival of patients undergoing hemodialysis with paricalcitol or calcitriol therapy. *N Engl J Med*, 349, 446–456
103. Seeherunvong W., Nwobi O., Abitbol C.L., Chandar J., Strauss J., Zilleruelo G. (2006). Paricalcitol versus calcitriol treatment for hyperparathyroidism in pediatric hemodialysis patients. *Pediatr Nephrol*, 21(10), 1434-9.
104. Greenbaum L.A., Benador N., Goldstein S.L., Paredes A., Melnick J.Z., Mattingly S., Amdahl M., Williams L.A., Salusky I.B. (2007). Intravenous paricalcitol for treatment of secondary hyperparathyroidism in children on hemodialysis. *Am J Kidney Dis*, 49(6), 814-23.
105. Kuhlmann A., Haas C.S., Gross M.L., et al. (2004). 1,25- Dihydroxyvitamin D3 decreases podocyte loss and podocyte hypertrophy in the subtotaly nephrectomized rat. *Am J Physiol Renal Physiol*, 286,F526-F533.
106. Agarwal R., Hynson J.E., Hecht T.J., Light R.P., Sinha A.D. (2011) Short-term vitamin D receptor activation increases serum creatinine due to increased production with no effect on the glomerular filtration rate. *Kidney Int*, 80,1073–1079

107. Alborzi P., Patel N.A., Peterson C., Bills J.E., Bekele D.M., Bunaye Z., Light R.P. & Agarwal R. (2008) Paricalcitol reduces albuminuria and inflammation in chronic kidney disease: a randomized double-blind pilot trial. *Hypertension*, 52(2), 249-55.
108. Szeto C.C., Chow K.M., Kwan B.C., Chung K.Y., Leung C.B., Li P.K. (2008). Oral calcitriol for the treatment of persistent proteinuria in immunoglobulin A nephropathy: An uncontrolled trial. *Am J Kidney Dis* 51,724-731.
109. Morrison A.B., Howard R.M. (1996). The functional capacity of hypertrophied nephrons. Effect of partial nephrectomy on the clearance of inulin and PAH in the rat. *J Exp Med*, 123(5), 829-44.
110. Cobo A., López J.M., Carbajo E., Santos F., Alvarez J., Fernández M., Weruaga A. (1999). Growth plate cartilage formation and resorption are differentially depressed in growth retarded uremic rats. *J Am Soc Nephrol*, 10(5), 971-9.
111. Erben R.G. (1997). Embedding of bone samples in methylmethacrylate: an improved method suitable for bone histomorphometry, histochemistry, and immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*, 45(2), 307-13.
112. Wolf E., Röser K., Hahn M., Welkerling H., Delling G. (1992). Enzyme and immunohistochemistry on undecalcified bone and bone marrow biopsies after embedding in plastic: a new embedding method for routine application. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 420(1), 17-24.
113. Parfitt A.M., Drezner M.K., Glorieux F.H., Kanis J.A., Malluche H., Meunier P.J., Ott S.M., Recker R.R. (1987). Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*, 2(6), 595-610.
114. Molinos I., Santos F., Carbajo-Perez E., Garcia E., Rodriguez J., Garcia-Alvarez O., Gil H., Ordoñez F.A., Loredó V. Mallada L. (2006). Catch-up growth follows an abnormal pattern in experimental renal insufficiency and growth hormone treatment normalizes it. *Kidney Int*, 70(11), 1955-61.

115. Jiang Y., Wang M. (2008). Hyperphosphatemia-induced hyperparathyroidism in 5/6 nephrectomized rats: development of a new animal model. *Chin Med J (Engl)*, 121(23), 2440-3.
116. van Ballegooijen A.J., Elmariah S., de Boer I.H., Kestenbaum B. (2016). Renal Clearance of Mineral Metabolism Biomarkers. *J Am Soc Nephrol*, 27(2), 392-7.
117. Katsumata S., Masuyama R., Uehara M., Suzuki K. (2004). Decreased mRNA expression of the PTH/PTHrP receptor and type II sodium-dependent phosphate transporter in the kidney of rats fed a high phosphorus diet accompanied with a decrease in serum calcium concentration. *Biosci Biotechnol Biochem*, 68(12), 2484-2489.
118. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). (2009), *Kidney Int Suppl*, 113, S1–S130.
119. Cai P., Tang X., Qin W., Ji L., Li Z. (2016). Comparison between paricalcitol and active non-selective vitamin D receptor activator for secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Int Urol Nephrol*, 48(4), 571-84.
120. Sprague S.M., Llach F., Amdahl M., Taccetta C., Batlle D. (2003). Paricalcitol versus calcitriol in the treatment of secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int*, 63(4), 1483-90.
121. Slatopolsky E., Finch J., Ritter C., Denda M., Morrissey J., Brown A., DeLuca H. (1995). A new analog of calcitriol, 19-nor-1,25-(OH)₂D₂, suppresses parathyroid hormone secretion in uremic rats in the absence of hypercalcemia. *Am J Kidney Dis*, 26(5), 852-60.
122. Takahashi F., Finch J.L., Denda M., Dusso A.S., Brown A.J., Slatopolsky E. (1997). A new analog of 1,25-(OH)₂D₃, 19-NOR-1,25-(OH)₂D₂, suppresses serum PTH and parathyroid gland growth in uremic rats without elevation of intestinal vitamin D receptor content. *Am J Kidney Dis*, 30(1), 105-12.

123. Sprague S.M., Moe S.M. (1992). Safety and efficacy of long-term treatment of secondary hyperparathyroidism by low-dose intravenous calcitriol. *Am J Kidney Dis*, 19(6), 532-9.
124. Moe S.M., Kraus M.A., Gassensmith C.M., Fineberg N.S., Gannon F.H., Peacock M. (1998). Safety and efficacy of pulse and daily calcitriol in patients on CAPD: a randomized trial. *Nephrol Dial Transplant*, 13(5), 1234-41.
125. Slatopolsky E., Finch J., Ritter C., Takahashi F. (1998) Effects of 19-nor-1,25(OH)₂D₂, a new analogue of calcitriol, on secondary Int Urol Nephrol 1 3 hyperparathyroidism in uremic rats. *Am J Kidney Dis*, 32(4 Suppl 2), S40-S47.
126. Lewin E., Wang W., Olgaard K. (1997). Reversibility of experimental secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int*, 52, 1232-1241.
127. Martinez-Fernandez I., Saracho R. (2015). Effects of paricalcitol on urinary calcium in patients with chronic kidney disease stages 2 - 4. *Clin Nephrol*, 83(4), 201-7.
128. Tani Y., Sato T., Yamanaka-Okumura H., Yamamoto H., Arai H., Sawada N., Genjida K., Taketani Y., Takeda E. (2007). Effects of prolonged high phosphorus diet on phosphorus and calcium balance in rats. *J Clin Biochem Nutr*, 40(3), 221-8.
129. Sprague S.M., Lerma E., McCormick D., Abraham M., Battle D. (2001). Suppression of parathyroid hormone secretion in hemodialysis patients: comparison of paricalcitol with calcitriol. *Am J Kidney Dis*, 38(5 Suppl 5), S51-6.
130. Fogo A.B. (2003). Model of robust induction of glomerulosclerosis in mice: importance of genetic background. *Kidney Int*, 64, 350-355.
131. Yamauchi K., Takano Y., Kasai A., Hayakawa K., Hiramatsu N., Enomoto N., et al. (2006). Screening and identification of substances that regulate nephrin gene expression using engineered reporter podocytes. *Kidney Int*, 70, 892-900.
132. Sanchez-Niño M.D., Bozic M., Cordoba-Lanus E., Valcheva P., Gracia O., Ibarz M, et al. (2012). Beyond proteinuria: VDR activation reduces renal inflammation in experimental diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*, 302, F647-57

133. Agarwal R., Acharya M., Tian J., Hippensteel R.L., Melnick J.Z., Qiu P., et al. (2005). Antiproteinuric effect of oral paricalcitol in chronic kidney disease. *Kidney Int*, 68, 2823-8. 17.
134. Fishbane S., Chittineni H., Packman M., Dutka P., Ali N., Durie N. (2009). Oral paricalcitol in the treatment of patients with CKD and proteinuria: a randomized trial. *Am J Kidney Dis*, 54, 647-52.
135. de Zeeuw D., Agarwal R., Amdahl M., Audhya P., Coyne D., Garimella T, et al. (2010). Selective vitamin D receptor activation with paricalcitol for reduction of albuminuria in patients with type 2 diabetes (VITAL study): a randomised controlled trial. *Lancet*, 376, 1543-51.
136. Bertoli M., Luisetto G., Ruffatti A., Urso M., Romagnoli G. (1990). Renal function during calcitriol therapy in chronic renal failure. *Clin Nephrol*, 33, 98–102.
137. Zhang Q., Li M., Zhang T., Chen J. (2016). Effect of Vitamin D Receptor Activators on Glomerular Filtration Rate: A Meta-Analysis and Systematic Review. *PLoS ONE*, 11(1), e0147347.
138. Chen H.C., Chou C.Y., Jheng J.S., Chen I.R., Liang C.C., Wang S.M., Liu J.H, Lin S.Y., Kuo H.L., Wang I.K., Chang C.T., Huang C.C. (2016). Loss of Residual Renal Function is Associated With Vascular Calcification in Hemodialysis Patients. *Ther Apher Dial*, 0(1), 27-30.
139. Cardús A., Panizo S., Parisi E., et al. (2007). Differential effects of vitamin D analogs on vascular calcification. *J Bone Miner Res*, 22, 860-866
140. Cozzolino M., Mehmeti F., Ciceri P., Volpi E., Stucchi A., Brenna I., Cusi D. (2011). The Effect of Paricalcitol on Vascular Calcification and Cardiovascular Disease in Uremia: Beyond PTH Control. *Int J Nephrol*, 2011:269060.
141. Rosas S.E., Yang W., Litt H. (2013) A phase IV, randomized, blinded single-center study of the effects of calcitriol and paricalcitol on vascular calcification in chronic kidney disease stages 3 and 4-vitamin D and coronary calcification study (VCOR). *J Am Soc Nephrol*, 24:894A.
142. Zehnder D., Bland R., Chana R.S, et al. (2002). Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) by human endothelial cells is regulated by inflammatory

cytokines: a novel autocrine determinant of vascular cell adhesion. *J Am Soc Nephrol*, 13, 621–29.

143. Newman C.L., Tian N, Hammond M.A., Wallace J.M., Brown D.M., Chen N.X., Moe S.M. Allen M.R. (2016). Calcitriol Suppression of Parathyroid Hormone Fails to Improve Skeletal Properties in an Animal Model of Chronic Kidney Disease. *Am J Nephrol*, 43, 20-31.
144. Malluche H.H., Mawad H., Monier-Faugere M.C. (2008). Effects of treatment of renal osteodystrophy on bone histology. *Clin J Am Soc Nephrol*, Suppl 3,S157-63.

9 FINANCIACIÓN Y DIFUSIÓN

9.1 FINANCIACIÓN

- PROYECTO FIS 0902354
- FUNDACIÓN NUTRICIÓN Y CRECIMIENTO

9.2 DIFUSIÓN

- 38º Congreso Nacional de Nefrología Pediátrica. 7-9 de mayo de 2012. Pamplona, Navarra, España. Trabajo libre oral: Efectos del paricalcitol frente al calcitriol en un modelo experimental de rata joven con hiperparatiroidismo secundario a fallo renal crónico.
- Annual Scientific Meeting, European Society for Paediatric Nephrology. 6-8 septiembre de 2012. Cracovia, Polonia.
- Póster: Effects of paricalcitol vs. calcitriol in an experimental model of young rat with hyperparathyroidism secondary to chronic renal failure.
- II Jornadas Doctorales de la Universidad de Oviedo. 28-29 de noviembre de 2012. Mieres, Asturias, España. Póster: Efectos del paricalcitol vs. calcitriol en un modelo experimental de rata joven con hiperparatiroidismo secundario a fallo renal crónico. International Pediatric Nephrology Association Congress Shanghai China, Agosto 2013. Póster: In young uremic rats with secondary hyperparathyroidism oral paricalcitol is not superior to calcitriol in terms of improving proteinuria, vascular calcification or bone structure.
- Primer Encuentro Conjunto de Investigación Universidad de los Andes – Fundación Santa Fe de Bogotá, 22 de mayo de 2014, Bogotá. Póster: Efectos del paricalcitol vs. calcitriol en un modelo experimental de rata joven con hiperparatiroidismo secundario a fallo renal crónico.

10 ANEXOS

Anexo 1. Datos Bioquímica Sanguínea

Grupo	Nº	CrS	BUN	Ca	P	CaxP
Nx	1441	1,2	55,0	9,8	10,1	98,9
Nx	1442	0,9	56,0	8,8	8,3	73,0
Nx	1443	1,0	48,0	8,9	11,5	102,3
Nx	1444	1,2	50,0	9,3	12,6	117,2
Nx	1445	0,8	48,0	8,7	9,1	79,2
Nx	1446	0,9	45,0	8,4	8,1	68,0
Nx	1447	1,6	79,0	7,9	24,1	190,4
Nx	1448	0,9	48,0	7,6	8,6	65,4
Nx + P	1449	1,1	53,0	7,9	12,9	101,9
Nx + P	1451	0,9	57,0	9,3	13,0	120,9
Nx + P	1452	0,9	46,0	9,4	9,9	93,1
Nx + P	1453	0,8	26,0	8,6	8,6	74,0
Nx + P	1454	0,8	33,0	9,2	7,5	69,0
Nx + P	1455	1,1	43,0	9,0	7,4	66,6
Nx + P	1456	0,9	38,0	7,5	10,6	79,5
Nx + C	1463	1,2	71,0	7,4	14,8	109,5
Nx + C	1464	0,6	32,0	9,3	14,8	137,6
Nx + C	1465	0,8	55,0	7,6	11,8	89,7
Nx + C	1466	0,6	38,0	7,5	9,6	72,0
Nx + C	1467	0,6	36,0	9,8	9,2	90,2
Nx + C	1469	1,0	56,0	8,4	11,6	97,4
Nx + C	1470	0,6	47,0	8,8	10,8	95,0
Nx + C	1471	0,7	50,0	9,2	12,6	115,9

Anexo 2. Datos hormona paratiroidea

Grupo	N°	PTH
Nx	1441	7748,7
Nx	1442	5774,2
Nx	1443	9025,1
Nx	1444	8308,7
Nx	1445	10879,6
Nx	1446	7116,0
Nx	1447	10345,1
Nx	1448	3636,0
Nx + P	1449	10668,7
Nx + P	1451	1541,5
Nx + P	1452	3090,5
Nx + P	1453	2236,0
Nx + P	1454	6083,3
Nx + P	1455	5628,7
Nx + P	1456	4850,5
Nx + C	1463	6160,8
Nx + C	1464	980,3
Nx + C	1465	4960,8
Nx + C	1466	4020,9
Nx + C	1467	850,2
Nx + C	1469	4150,2
Nx + C	1470	4790,1
Nx + C	1471	1070,5

Anexo 3. Datos peso

Grupo	Nº	Día 0	Día 4	Día 7	Día 8	Día 11	Día 14	Día 16	Día 18	Día 21	Día 23	Día 25	Día 28	Día 29	Día 30	Día 31	Día 32
Nx	1441	69,5	83,7	82	80	96,2	92,7	120,2	128,9	135,8	137,8	145,9	159,2	159,4	160,2	163,9	167,6
Nx	1442	68,1	78	61,6	60,6	82,2	90,8	93,4	96,9	105,2	113,2	120,7	135,1	139,6	139,3	139,9	140,6
Nx	1443	65,5	76,4	66,8	72,3	88,7	95,8	103,4	108,4	121,9	125,4	133,3	146,7	144,8	148	151,8	155,7
Nx	1444	69	80	74,4	77	98,1	111,4	120,4	123,9	132,7	136,5	142,9	152,8	150,8	151,1	153,1	157,3
Nx	1445	66,8	76,8	72,2	69,7	85,6	95,4	96,5	91,3	100,2	104	110,3	121,1	122,7	123,5	128,1	132,7
Nx	1446	66,9	76,7	76,3	76,8	95,1	105,4	113,1	118,6	127,7	130	142,3	151,2	147,7	149,2	150,2	151,5
Nx	1447	73,1	82,2	70,7	71,3	85,2	88,7	89,4	94,2	98,7	102	108,6	119,4	122,8	117,7	119,3	120,9
Nx	1448	66,4	72,7	66,6	68,4	84,7	100	104,8	110,5	118,6	121,1	129,9	138,5	139,5	141,3	143,7	146,1
Nx + P	1449	65,2	74,2	64,2	64,1	76,9	85,8	87,8	90,5	94,9	100,5	106,9	118	115,3	114,6	119,8	125,1
Nx + P	1451	65,5	74,1	65,7	59,2	76,4	77,9	82	84,2	88,2	98	101,7	114,8	110,9	113,5	116,5	119,5
Nx + P	1452	59,9	64,3	55,2	55,1	74	84,6	92	103,8	108,8	121,6	125,5	133,4	133,3	137,4	140,6	143,9
Nx + P	1453	69	79,6	77,9	78,4	95	94,4	95	97,4	97,3	103,7	106,8	106,4	103,2	110,1	111,6	113,1
Nx + P	1454	67,1	81	78,8	79,9	98,8	103,2	101,3	110,5	108,7	116	126,5	140,5	140,8	146,4	149,9	153,5
Nx + P	1455	73,3	85,7	79,5	61,1	91,5	104	107	111,3	114,5	115,1	113,9	120,6	121,2	125,5	128,9	132,3
Nx + P	1456	70,2	79,5	69,1	70,2	89,3	94,5	96,4	100,1	103,7	110,6	109,7	99,7	98,5	104,4	106,1	107,9
Nx + C	1463	68,5	81,4	74,6	82,8	90	97,4	100,9	98,7	106,7	114,4	125,4	131,7	139,1	135,7	134,6	139,1
Nx + C	1464	65,5	76	69,2	13,2	95,6	107,4	120,5	125,8	136,6	144,7	153	160,8	161,9	159,3	162,4	168
Nx + C	1465	61,1	71,7	64,9	73,3	81,7	88,6	100	102,5	112,4	113,3	115,3	109,4	111,3	114	110,9	111,2
Nx + C	1466	63	74,9	68,1	73,5	79	82,7	82,8	82,8	84,6	81,3	84	89	92,3	98,6	90,8	100,4
Nx + C	1467	62,2	79,6	72,8	8,5	89,9	105,9	120,3	130,8	144,2	143,1	150,3	153,9	151,4	158,5	160,9	161,9
Nx + C	1469	72,7	88,3	81,5	92	102,6	114,1	121,4	118	125,4	130	129	126,2	127,8	137,8	135,5	134,7
Nx + C	1470	75,5	89,4	82,6	86,3	90	99,5	101,2	105,7	102	104,1	106,4	107	107,3	113,5	115,1	114,5
Nx + C	1471	64,2	75,2	68,4	71,2	74	90,4	94,3	88,5	84,1	87,5	83,1	87,9	85,2	92,1	90,6	93,2

Anexo 4. Datos longitud

Grupo	N°	Día 0	Día 4	Día 32
Nx	1441	25	27,2	34,5
Nx	1442	24	25,6	31,5
Nx	1443	24,1	25,9	33,3
Nx	1444	24,5	26,2	34
Nx	1445	24,4	26,2	31,7
Nx	1446	24,1	25,7	33,5
Nx	1447	24,9	27,3	32
Nx	1448	24,2	25,5	33
Nx + P	1449	24,1	26,2	31,5
Nx + P	1451	24,1	25,7	30,8
Nx + P	1452	23,8	25,5	33,7
Nx + P	1453	24,8	27	31
Nx + P	1454	24,7	26	32,5
Nx + P	1455	25	27	31,7
Nx + P	1456	24,2	26,4	28,9
Nx + C	1463	23,1	25,6	31,5
Nx + C	1464	22,6	24,7	34,2
Nx + C	1465	22,2	24,1	30
Nx + C	1466	22,4	24,6	28,5
Nx + C	1467	22,6	24,9	34
Nx + C	1469	23,9	26,3	31,5
Nx + C	1470	24	26,6	30
Nx + C	1471	23,2	25	28

Anexo 5. Datos alimentación

Grupo	Nº	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14	Día 15	Día 16	Día 17	Día 18	Día 19	Día 20	Día 21	Día 22	Día 23	Día 24	Día 25	Día 26	Día 27	Día 28	Día 29	Día 30	Día 31
Nx	1441	12,8	12,8	13,2	12,4	12,5	13,3	13,3	12,6	12,6	12,7	9,8	9,9	15,8	15,8	15,2	15,2	15,2	13	12,6	14,1	14,1
Nx	1442	10,1	10,1	10,1	9,4	9,5	8,4	8,5	9,6	9,6	9,8	11	11	14,3	14,3	13,7	13,7	13,8	15,1	15,5	9,3	9,4
Nx	1443	7,6	7,6	7,7	9,3	9,3	11	11	18,2	18,2	8,4	8,4	8,4	13	13,1	14,7	14,7	14,8	13,4	16,7	15,1	15,2
Nx	1444	10,6	10,6	10,7	17,7	17,7	12,4	12,5	17,8	17,9	8,5	8,5	8,7	12,9	13	12,8	12,8	12,8	13,8	15	15,2	15,3
Nx	1445	11,8	11,8	11,9	5,3	5,3	5,9	5,9	12	12,1	6,7	6,7	6,8	10,6	10,6	12,2	12,2	12,4	11,1	15,2	13,6	13,6
Nx	1446	12,3	12,3	12,4	14	14	11,7	11,7	19,5	19,5	8,2	8,2	8,4	18,9	18,9	14	14	14	11,3	14,6	13,1	13,2
Nx	1447	8,6	8,6	8,7	7,9	8	8,4	8,4	12,9	13	5,5	5,5	5,5	11,3	11,3	9,8	9,8	10	11,8	6,8	8,7	8,7
Nx	1448	13,5	13,5	13,5	10,6	10,6	12,3	12,4	18,3	18,3	7,5	7,5	7,5	15,2	15,3	14,5	14,5	14,7	13	13,7	13,7	13,8
Nx + P	1449	9,4	9,4	9,4	8	8	7,9	8	7,3	7,3	7,4	9,3	9,4	10,7	10,7	10,6	10,6	10,8	8,2	11,5	11,6	11,6
Nx + P	1451	7,8	7,8	8	6,9	7	7,3	7,3	7,8	7,8	8	10,2	10,2	9,8	9,8	11,4	11,4	11,4	14,6	11,1	12,5	12,6
Nx + P	1452	11,7	11,7	11,8	13,3	13,3	13,4	13,5	12,8	12,8	12,8	14,3	14,4	13,4	13,5	13,4	13,4	13,6	14,3	16,2	14	14
Nx + P	1453	8,6	8,6	8,8	9,2	9,2	9,6	9,7	7,5	7,5	7,5	9,3	9,4	9,1	9,2	7,6	7,6	7,6	7,4	11	10,5	10,5
Nx + P	1454	10,4	10,4	10,5	8,3	8,4	8,8	8,8	8,5	8,5	8,6	10,2	10,2	12,7	12,8	14,2	14,2	14,3	13,7	14,8	14,1	14,2
Nx + P	1455	12,9	12,9	13,1	10,2	10,3	9	9	8,8	8,8	8,8	8,3	8,3	7,7	7,7	10	10	10,2	9,5	13,3	12,4	12,5
Nx + P	1456	8	8	8,1	8,4	8,5	8,2	8,2	11,7	11,7	11,9	5	5,1	7,9	7,9	6,1	6,1	6,3	7,8	9,3	9,1	9,1
Nx + C	1463	9,9	9,9	10,1	9,3	9,4	8,9	8,9	9,9	9,9	10,1	11,4	11,4	13	13	14,3	14,3	14,3	14,2	11,8	11,6	11,6
Nx + C	1464	13,2	13,2	13,2	16,5	16,5	15,1	15,2	16,2	16,2	16,3	14,8	14,8	15,9	16	15,6	15,6	15,6	13,4	14	14,3	15
Nx + C	1465	11	11	11,1	12,1	12,2	11,2	11,2	10,7	10,7	10,9	9,6	9,6	8,8	8,9	8,1	8,1	8,1	7,3	18	3,2	3,2
Nx + C	1466	7,9	7,9	7,9	8,4	8,5	7,8	7,9	7,4	7,4	7,5	6,8	6,8	7,5	7,5	8,3	8,3	8,3	9,9	11,7	8,7	8,8
Nx + C	1467	15,8	15,8	16	20	20	19,1	19,1	16,3	16,3	16,4	12,8	12,8	11,8	11,8	13,2	13,2	13,2	11	16,3	12,5	14,5
Nx + C	1469	11,7	11,7	11,9	13,2	13,3	9,8	9,9	9,8	9,8	9,9	9,2	9,3	7,8	7,8	8,8	8,8	8,9	9,3	13,4	9,6	7,5
Nx + C	1470	10,8	10,8	10,9	9,9	10	9,9	9,9	7,5	7,5	7,6	8,6	8,7	7,7	7,7	8,2	8,2	8,3	8,3	11,7	8,5	8,6
Nx + C	1471	11,3	11,3	11,3	10,1	10,2	7,9	7,9	7,3	7,3	7,5	8,3	8,4	6,9	7	8,6	8,6	8,6	7,6	12,5	7,4	7,4

Anexo 6. Datos ingesta líquidos

Grupo	Nº	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14	Día 15	Día 16	Día 17	Día 18	Día 19	Día 20	Día 21	Día 22	Día 23	Día 24	Día 25	Día 26	Día 27	Día 28	Día 29	Día 30	Día 31	Día 32
Nx	1441	34,3	34,3	34,3	37,2	37,2	34,3	34,3	36,6	36,6	36,7	32,3	32,3	34,3	34,4	36,4	36,4	36,6	40,2	36,1	30,7	30,7	30,8
Nx	1442	27,3	27,3	27,4	30,2	30,2	27,2	27,2	30,7	30,7	30,7	32,7	32,7	29,3	29,4	35,3	35,3	35,5	42,1	38,9	27,5	27,5	27,7
Nx	1443	31,9	31,9	32,1	33,1	33,2	30,7	30,7	35,7	35,7	35,8	33,6	33,6	33	33,1	37,3	37,3	37,4	41,2	38,6	30,6	30,6	30,7
Nx	1444	35,6	35,6	35,7	39,2	39,2	33,8	33,8	38,6	38,6	38,7	38,4	38,4	32,3	32,3	45,8	45,8	45,8	52	31,8	24,9	24,9	25,1
Nx	1445	28,8	28,8	28,8	40,5	40,5	20,6	20,7	28,9	28,9	29	32,6	32,6	29,9	29,9	35,1	35,1	35,2	37,5	31,6	23,8	23,8	24
Nx	1446	29	29	29,2	37,5	37,5	31,6	31,6	36,1	36,1	36,1	32	32	36,4	36,5	39,6	39,6	39,6	36,4	40,7	32	32	32
Nx	1447	23	23	23	22,5	22,5	23,1	23,1	22,4	22,4	22,5	20,1	20,2	20,3	20,4	23	23	23	28,1	27,2	18,5	18,5	18,5
Nx	1448	35,6	35,6	35,6	34,4	34,5	33,7	33,8	37,7	37,7	37,8	30,8	30,8	31,1	31,2	37,3	37,3	37,5	37,1	31,3	21,5	21,5	21,6
Nx + P	1449	17,8	17,8	18	31,8	31,8	25,5	25,6	21,7	21,7	21,8	30,3	30,4	30,8	30,9	33,1	33,1	33,2	30,2	26,4	19,1	19,1	19,2
Nx + P	1451	18,5	18,5	18,5	28,3	28,4	29,6	29,7	22,8	22,8	22,9	29,2	29,3	24	24,1	30	30	30,1	25,8	21	19	19	19,1
Nx + P	1452	26,8	26,8	27	29,1	29,1	34,1	34,2	32,2	32,2	32,4	37,6	37,7	36,1	36,1	33,5	33,5	33,5	36,4	33,5	23,7	23,7	23,8
Nx + P	1453	24,2	24,2	24,3	24,3	24,4	22,3	22,4	21,5	21,5	21,6	24,5	24,6	23,6	23,6	22	22	22,1	26	24,3	16,6	16,6	16,7
Nx + P	1454	27,4	27,4	27,4	23,8	23,8	23,7	23,8	25	25	25,1	26,7	26,7	29,5	29,6	33,5	33,5	33,7	39,4	35,2	24,9	24,9	25,1
Nx + P	1455	28	28	28	26	26	23,8	23,8	21,7	21,7	21,8	22,6	22,6	21,7	21,8	25,9	25,9	26	29,7	24,1	14,8	14,8	14,8
Nx + P	1456	24,4	24,4	24,6	29,1	29,2	25,1	25,2	24,9	24,9	24,9	29,7	29,8	23,3	23,3	20,7	20,7	20,9	26,2	22,3	14,4	14,4	14,5
Nx + C	1463	21,1	20,8	20,8	20,9	20,8	20,9	16,2	16,3	20	20	20,2	20,8	20,9	22	22	25	25	25	32,3	19,8	26,9	26,9
Nx + C	1464	23,3	23,8	23,8	24	27,3	27,4	22,5	22,5	27,6	27,6	27,6	29,8	29,9	34,6	34,6	31,6	31,6	31,6	35,7	27,3	33,1	33,2
Nx + C	1465	21,9	20,4	20,4	20,4	24,9	24,9	19,1	19,1	21,7	21,7	21,9	19,6	19,6	20,8	20,8	20	20	20	26,3	23	20,9	20,9
Nx + C	1466	21,4	18	18	18,2	19,2	19,2	15,3	15,3	15	15	15,2	13,7	13,7	15,9	16	16,7	16,7	16,7	23	22,1	22,3	22,4
Nx + C	1467	27,9	29,3	29,3	29,4	35	35,1	33,2	33,2	36,9	36,9	37	29,9	29,9	30,3	30,3	27,7	27,7	27,9	30,6	29,8	30,4	30,5
Nx + C	1469	23,7	24	24	24,1	25,8	25,8	17	17	21,2	21,2	21,3	23,7	23,8	25	25,1	22,3	22,3	22,5	28,1	29,2	13,8	13,8
Nx + C	1470	26,5	22,7	22,7	22,8	21,6	21,7	18,1	18,2	17,4	17,4	17,5	18,7	18,8	19	19	18,7	18,7	18,7	23,5	23,7	24,9	25
Nx + C	1471	13,5	22	22	22,1	20	20,1	14,6	14,6	18,7	18,7	18,9	19,3	19,3	16,5	16,6	19,3	19,3	19,5	15,9	20,8	17	17,1

Anexo 7. Datos calcio orina

Grupo	N°	Ca mg/dia
Nx	1441	98,7
Nx	1442	65,8
Nx	1443	106,4
Nx	1444	107,1
Nx	1445	95,2
Nx	1446	92,4
Nx	1447	60,9
Nx	1448	96,6
Nx + P	1449	81,2
Nx + P	1451	88,2
Nx + P	1452	98
Nx + P	1453	73,5
Nx + P	1454	99,4
Nx + P	1455	87,5
Nx + P	1456	63,7
Nx + C	1463	81,2
Nx + C	1464	105
Nx + C	1465	22,4
Nx + C	1466	61,6
Nx + C	1467	101,5
Nx + C	1469	52,5
Nx + C	1470	60,2
Nx + C	1471	51,8

Anexo 8. Datos balance fósforo

Grupo	N°	Agua mL	Agua	Pienso gr	Pienso	Agua + pienso
		liq 11-32	P mg	dia 11-32	P mg	P mg
Nx	1441	767	3835,0	278,90	1673,4	5508,4
Nx	1442	682,8	3414,0	236,20	1417,2	4831,2
Nx	1443	747,8	3739,0	255,80	1534,8	5273,8
Nx	1444	806,3	4031,5	277,20	1663,2	5694,7
Nx	1445	666,6	3333,0	213,70	1282,2	4615,2
Nx	1446	762,5	3812,5	284,20	1705,2	5517,7
Nx	1447	488,3	2441,5	189,20	1135,2	3576,7
Nx	1448	725,4	3627,0	273,90	1643,4	5270,4
Nx + P	1449	569,3	2846,5	197,1	1182,6	4029,1
Nx + P	1451	540,6	2703,0	200,7	1204,2	3907,2
Nx + P	1452	693,0	3465,0	281,6	1689,6	5154,6
Nx + P	1453	493,3	2466,5	185,4	1112,4	3578,9
Nx + P	1454	615,1	3075,5	228,1	1368,6	4444,1
Nx + P	1455	513,5	2567,5	213,7	1282,2	3849,7
Nx + P	1456	516,9	2584,5	172,4	1034,4	3618,9
Nx + C	1463	484,6	2423,0	237,20	1423,2	3740,7
Nx + C	1464	630,4	3152,0	316,60	1899,6	4935,1
Nx + C	1465	468,3	2341,5	205,00	1230	3462,0
Nx + C	1466	389	1945,0	171,20	1027,2	2865,2
Nx + C	1467	688,2	3441,0	317,90	1907,4	5208,9
Nx + C	1469	494,7	2473,5	211,40	1268,4	3623,4
Nx + C	1470	455,3	2276,5	189,30	1135,8	3279,8
Nx + C	1471	405,8	2029,0	183,40	1100,4	3061,9

Anexo 9. Datos proteinuria y depuración de creatinina

Grupo	Multistix	Proteínas (+)	pH	Hb(+)	pH HCL	Prot (mg/dl)	CrU (mg/dl)	ProtU/CrU	Prot/100g peso	CrSérica	Depuración	Diuresis/día
Nx	1441	4	6,5	2	4,10	344	24,33	14,14	205,25	1,20	19,32	23,00
Nx	1442	4	8,5	0	6,24	218	21,80	10,00	155,05	0,90	23,93	20,00
Nx	1443	3	6,5	2	2,78	331	19,30	17,15	212,59	1,00	20,66	24,00
Nx	1444	4	7,0	2	3,77	642	20,15	31,86	408,14	1,20	17,05	23,00
Nx	1445	4	6,0	0	4,45	293	23,00	12,74	220,80	0,80	21,06	14,00
Nx	1446	4	6,0	1	3,27	645	24,35	26,49	425,74	0,90	18,60	15,00
Nx	1447	4	6,0	0	2,62	219	21,17	10,34	181,14	1,60	9,12	12,00
Nx	1448	4	7,0	0	4,26	323	26,11	12,37	221,08	0,90	22,06	16,00
Nx + P	1449	4	6,5	2	3,18	401	23,24	17,25	320,54	1,10	16,42	14,00
Nx + P	1451	4	6,0	2	4,69	195	19,62	9,94	163,18	0,90	16,47	13,00
Nx + P	1452	4	8,0	2	6,87	449	21,31	21,07	312,02	0,90	18,28	16,00
Nx + P	1453	4	7,5	2	2,56	632	15,16	41,69	558,80	0,80	12,80	11,00
Nx + P	1454	3	7,5	2	3,13	156	17,46	8,93	101,63	0,80	19,75	20,00
Nx + P	1455	4	7,5	0	3,81	496	22,29	22,25	374,91	1,10	13,83	13,00
Nx + P	1456	4	7,5	0	3,44	645	16,06	40,16	597,78	0,90	16,08	14,00
Nx + C	1463	4	9,2	2	9,1	210	23,64	8,88	150,97	1,2	17,31	16,00
Nx + C	1464	3	7,5	1	7,6	720	27,37	26,31	428,57	0,6	37,34	18,00
Nx + C	1465	2	8,7	2	8,2	393	23,24	16,91	353,42	0,8	24,94	12,50
Nx + C	1466	3	9,2	3	9,1	630	19,14	32,92	627,49	0,6	29,13	12,00
Nx + C	1467	3	6,2	1	2,8	174	24,81	7,01	107,47	0,6	39,02	20,00
Nx + C	1469	3	7,9	1	7,9	195	15,58	12,52	144,77	1,0	17,67	20,00
Nx + C	1470	4	9,2	2	8,8	181	13,15	13,76	158,08	0,6	27,78	19,00
Nx + C	1471	3	7,0	1	3,5	348	20,58	16,91	373,39	0,7	26,51	11,00

Anexo 10. Datos heces

Grupo	N°	gr 48 h	gr 24 h	P (microg/g)	Ca (microg/g)
Nx	1441	10,9	5,45	20668	23759
Nx	1442	6,8	3,4	19757	21235
Nx	1443	8,6	4,3	18488	20280
Nx	1444	8,4	4,2	21961	28510
Nx	1445	8,1	4,05	17950	18909
Nx	1446	3,2	1,6	18119	12891
Nx	1447	9,8	4,9	20430	24670
Nx	1448	10,8	5,4	21326	23374
Nx + P	1449	6,5	3,25	21955	23696
Nx + P	1451	7,4	3,7	51141	65585
Nx + P	1452	9,2	4,6	23013	26804
Nx + P	1453	7,5	3,75	48953	57329
Nx + P	1454	10,6	5,3	23186	24297
Nx + P	1455	8,7	4,35	21618	25183
Nx + P	1456	5,6	2,8	22378	27839
Nx + C	1463	8,3	4,2	17315	22829
Nx + C	1464	9,6	4,8	21274	25189
Nx + C	1465	4,5	2,3	18986	21514
Nx + C	1466	5,8	2,9	18517	22907
Nx + C	1467	9,5	4,8	17806	21063
Nx + C	1469	6,9	3,5	18201	18244
Nx + C	1470	6,9	3,5	23702	26260
Nx + C	1471	5,1	2,6	16015	17517

Anexo 11. Datos histología renal

Grupo	Numero	Hematoxilina eosina					Von Kossa			PAS		
		Glomerulo	Compromiso Túbulo proximal	Compromiso Túbulo Distal	Engrosamiento Arterias	Intersticio	Calcificación tubular (s/n)	Calcificación arterial (%)	Calcificación intersticial (s/n)	PAS tubular	PAS arterial	PAS glomerular
Nx	1441		0,5	0		0	0	1	0			
Nx	1442	0,25	0,75	0	0,25	0	1	0	1	0,25	0,5	0,25
Nx	1443	0,25	0,5	0,5		0	0	0	0	0	0	0
Nx	1444	0,25	0,5	0,25	0	0	0	0	1	0,25	0	0,25
Nx	1445	0,25	0,5	0,75	0	0	1	1	1	0,25	0	0
Nx	1446	0,5	0,25	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Nx	1447	0,5	0,5	0	0,5	x	1	0	0	0,25	0,75	0,25
Nx	1448	2,25	0,5	0	0,25	0	0	0	1	0	0,25	0
NxP	1449	0	0,5	0,25	0,75	0	0	0	0	0	0,75	0
NxP	1451	0,75	0,5	0,5	0	0	1	0	1	0	0	0,25
NxP	1452	0,25	0,5	0	0,5	0	1	0	1	0		0
NxP	1453	0,75	0,25	0,25	0,5	0	1	0	1	0	0	0,5
NxP	1454	0,25	0,25	0,5	0	0,5	1	0	1	0,25	0	
NxP	1455	0,75	0,75	0,75	0,5		1	1	1	0	0,5	0,25
NxP	1456	0,75	0,75	0,5	0	0	1	0	1	0	0	0
NxC	1463	0,25	0,25	0,5		0						
NxC	1464	0,25	0,25	0,25	0	0	0	0	0		0	
NxC	1465	0	0,5	0,25	0	0	0	0	0	0,5	0,5	0
NxC	1466	0	0,5	0,75	0,5	0,5	0	0	0	0	0,75	0
NxC	1467	0,25	0,25	0,5	0	0	0	0	1	0,5	0	0
NxC	1469	0,25		0,5	0	0,25	0	0	1			
NxC	1470	0,75	0		0	0	0	0	0	0	0,25	0
NxC	1471	0	0,5	0,5	0	0	0	0	0	0,5	0	0

Anexo 12. Datos TRAP hueso

	Rata	TV (mm2)	N.Oc	Relacion N.Oc/TV
NX	1441b	0,88	206	234,2871
	1442a	0,87	189	216,0998
	1442b	1,32	352	266,6667
	1443a	0,71	156	219,7183
	1443b	1,32	245	185,6061
	1444a	1,24	342	275,8065
	1444b	0,86	215	250,0000
	1446a	0,77	194	251,9481
	1446b	0,91	236	259,3407
Nx-P	1452a	0,94	163	173,4043
	1452b	0,71	155	218,3099
	1453a	1	143	143,0000
	1453b	0,94	219	232,9787
	1454a	1,01	268	265,3465
	1454b	0,66	269	407,5758
	1455a	1,22	369	302,4590
	1455b	0,80	245	307,5108
	1456	0,97	307	316,4948
NX-C	1465a	1,06	208	196,2264
	1465b	1,18	162	137,2881
	1466a	0,97	160	164,9485
	1466b	1,04	214	205,7692
	1469a	1,32	264	200,0000
	1469b	1,07	207	193,4579
	1470a	1,17	212	181,1966
	1470b	0,91	130	142,8571
	1471a	0,7	91	130,0000
1471b	0,82	91	110,9756	
Control	1480	0,57	63	110,5263
	1481a	0,81	135	166,6667
	1481b	0,81	119	146,9136
	1482a	1,22	179	146,7213
	1482b	0,99	123	124,2424

Anexo 13. Datos Von Kossa Hueso

GRUPO	Rata	um
Nx	1441b	82,544
	1444a	77,050
	1444b	70,596
	1446a	89,393
	1446b	93,324
Nx+P	1454a	92,747
	1454b	86,997
	1556	65,239
Nx+C	1465a	64,059
	1465b	74,872
	1469a	75,927
	1569b	71,752
	1470a	67,359
	1470b	68,723
Control	1480a	55,269
	1480b	54,554
	1481b	61,891
	1482a	56,756

Anexo 14. Datos CTscan aortas Volumen de las calcificaciones

Grupos	Nombre	Obj.V mm ³
Control	1480	0,0000
	1481	0,0000
	1482	0,0000
	1441	0,0405
	1442	0,0000
Nx	1443	0,0130
	1444	0,0432
	1446	0,0162
	1452	0,0157
	1453	1,7599
NxP	1454	0,0005
	1455	1,7938
	1456	1,6299
	1465	0,0404
	1466	1,7089
NxC	1469	0,0005
	1470	0,0026
	1471	0,7973

Porcentaje del volumen de calcificación (relativo al volumen de la aorta)

Grupos	Nombre	Obj.V/TV %
Control	1480	0,0000
	1481	0,0000
	1482	0,0000
Nx	1441	0,9016
	1442	0,0000
	1443	0,3805
	1444	0,9588
	1446	0,3049
NxP	1452	0,4367
	1453	25,8090
	1454	0,0172
	1455	29,2160
	1456	27,0170
NxC	1465	0,8632
	1466	32,4109
	1469	0,0103
	1470	0,0971
	1471	21,3821

Anexo 15. Datos CTscan aortas Volumen total de la aorta

Grupos	Nombre	TV mm³
Control	1480	3,9633
	1481	3,1409
	1482	4,8607
Nx	1441	4,4973
	1442	0,2393
	1443	3,4145
	1444	4,5058
	1446	5,3206
NxP	1452	3,6049
	1453	6,8190
	1454	2,9805
	1455	6,1399
	1456	6,0329
NxC	1465	4,6845
	1466	5,2727
	1469	5,2057
	1470	2,7188
	1471	3,7288