

**Paper de la 1,25 dihidroxivitamina D₃ extrarenal
en l'arteriopatia urèmica. Efecte diferencial
de l'analeg 19-nor-dihidroxivitamina D₂**

Anna Cardús i Figueras

Coodirectors:

**Elvira Fernández i Giráldez
Jose Manuel Valdivielso i Revilla**

LLEIDA, MARÇ DE 2007

— |

| —

— |

| —



Universitat de Lleida, Departament de Medicina

**Paper de la 1,25 dihidroxivitamina D₃ extrarenal
en l'arteriopatia urèmica. Efecte diferencial
de l'analog 19-nor-dihidroxivitamina D₂**

Anna Cardús i Figueras
Lleida, 2007-02-07

Jose Manuel Valdivielso i Revilla
Coodirector

Elvira Fernández i Giráldez
Coodirector

— |

| —

— |

| —

*A tota la meva família
Als avis*

— |

| —

— |

| —

Tot i que pugui semblar estrany, després de tants anys es fa difícil acabar aquesta fase de la vida, i es nota, oi?? La qüestió es que escriure els agraïments de la tesis representa que ja està!!! i com molts de vosaltres podeu saber, en part tens ganes d'acabar de ser un becari "precar", de començar a veure món, de començar el que en realitat es considera carrera investigadora. Però per una altra part, saps que enyoraràs tot el que aquí has tingut, tot el que durant aquests anys has après, tota la gent que has conegut i per la meua part Lleida, una ciutat que he descobert i que després de tants anys vivint aquí, fins i tot la boira m'agrada.

Primer de tot li agraeixo a l'Elvira la confiança que ha tingut en mi, ja sé que al principi li costava entendre la manera de pensar i treballar dels biòlegs, però amb els anys hem pogut arribar a tenir una molt bona relació professional i personal, cosa que considero més important. Gràcies també al Jose per l'ajuda prestada i per aconseguir que els articles "maleïts" estiguin publicats.

Al Martí i la Carme, que he de dir, per ensenyar-me ciència, per ajudar-me, per proveir-me de tot el necessari quan ho necessitava, per ajudar-me a muntar el laboratori i per tenir molta paciència, com diu la frase feta, "la paciència es la mare de la ciència". Tot i que a ells no els hi agrada que ho digui, sense la seva ajuda això no hagués estat possible.

A les nenes (que ja no són tant nenes) la Evita, la Sarita, la Petruski i la Milica per les bones hores al laboratori, per l'ajuda que m'han prestat sempre que ho he necessitat i per acompanyar-me, tot i el fred i la boira, a fumar el cigarret al carrer!!! Només dir-vos que molts ànims, que encara que no ho sembli això te fi.

A l'Ana (la Martínez) per solucionar-nos els problemes, per mantenir l'ordre (que sense tu no hagués estat possible), i per ajudar-nos en tot el que fa falta. A la Crispi que després de tants anys ja veiem el final, eh?? Molts ànims i endavant!! A l'Eli, que tot i que ens va abandonar no va marxar gaire lluny, a tota la gent de la Unitat Docent, la Dolora, la Teresa (ja ho sé que he sigut una privilegiada), la M^aJosé, la Silvia, la Maria i la Montse, moltes gràcies a totes per aquests anys.

A la gent del departament de Ciències Mèdiques Bàsiques perquè sempre que he necessitat ajuda la he trobat, especialment, aquest últims anys amb la gent del grup de Neurobiologia Molecular, des de què van venir cap a l'Arnau per nosaltres la cosa

ba estat molt diferent. A les nenes noves, l'Anabel i la Núria (la fitxaje) que encara que ha sigut poc temps m'ha encantat conèixer-vos. I a "Lodavid", gràcies per fer-nos riure a l'hora de dinar, per patir per nosaltres a l'hora dels seminaris i per estar a tota hora a punt de resoldre qualsevol dubte.

A la Madris i la Sònia, grans amigues i companyes de feina, per ajudar-me en el laboratori però sobretot a nivell personal. No és necessari que els hi digui en aquest moment tot el que haig d'agrair-los, estic segura que tot i que no sóc dona de moltes paraules saben el que sento i que això es per sempre. I amb elles, al Scrofi, la Rouse, el Manu, la Silvi, el Dani (que siguis molt, molt feliç per les terres de Granada), al Homer (no olvidéis que es catalán, así que tendréis que venir a ver a la familia como mínimo, mínimo una vez al año), al Toni i la Judith (el meus germans lleidatans) i sense oblidar-nos de l'Unai, que l'hem vist néixer, créixer i el que ens queda.... A tots vosaltres no sé ven bé com dir el que sento, que gràcies per tot, que gràcies per ser aquí, que gràcies pels "soparets" (i quins sopars!!!), les cervectes, les sortides, el "karaoke", els "xistes" del Manu i la Madris (perquè els catalans d'això no en sabem gaire), el "Penta" i el "Dirty".... que ja ho sabeu, a partir d'ara sigui on sigui teniu una casa.

A la gent de Pallejà, que ho han patit tot. Als nens, l'Ori, el Pepe, el Jordi, el Marc i especialment l'Albertito, gràcies per les estones a la casa, per les calçotades, les "cervectes" i "Patxis", per les partides de cartes i moltes altres coses A l'Adri, el Pomes, la Gisela, la Rut, l'Ana (Txantxez), el Viti i el petit Iñaki, el Pep, el Carlitos, el Lirón i la resta de la trupe, les Gemmes, la Colla jove i la Colla gran, el Maki, la Glòria i l'Arnauet, al Major i al Jarr i els vermuts del Maldo.... i no podria parar. Al Moi i la seva família. A la Gisela, l'Óscar i el també petit Isaac, gràcies per entendre el meu tipus de feina i poder quedar amb mi en qualsevol moment.

També he de fer menció a Sant Llorenç el meu poble "adoptat". A la Duni i la Saskia, a la Manan i el Tonino, a tots els amics que quan necessito un "escape" estan allà.

A l'Alce, el Xavi, l'Ali, la Susana i l'Alex, en veritat tota aquesta història va començar amb vosaltres, qui ho diria quan estavem a la Uni que acabaria a Lleida fent el doctorat, eh?

I finalment i de tot cor a la meua família, a la Roser i el Martí, que els he dir, gràcies per ajudar-me a fer el que en veritat vull fer, ja sabeu que sense vosaltres això no hagués sigut possible i no només parlo de “cales”, per ensenyar-me a viure, per obligar-me (en moments dolents) a estudiar i a poder fer realitat aquest moment. A l'Antxi i el Cristian, no hi ha ningú al món que em conegui millor que vosaltres així que ja sabeu que avui estic nerviosa (encara que no ho sembli) i que us necessito més que mai, gràcies per tot. Al Llorenç, l'Anna i les dos petites de casa, la Laia i la Clara, gràcies per entendre i per aguantar-me i nenes quan sigueu grans no estudiieu Biologia que la vida del becari es molt dura!!! I no poden faltar les “iaietes”, la Carme i la Mariana, gràcies, gràcies, gràcies per estimar-nos tant, per ensenyar-nos que la vida val la pena i que tot es pot superar, sou les dones més fortes que conec i això es el millor que ens deixareu d'herència. I clar, no serien uns agraïments escrits per mi si no esmentés a les meves “nenes”, la Neu i la Brida, que com sempre dic són les úniques que venen a rebre'm movent la cua.

“Pues eso”, que moltes gràcies a tothom i que encara que no sóc persona de dir-ho ja sabeu que sempre esteu en el meu cap i en el meu cor.

— |

| —

— |

| —

L'arteriosclerosi és un procés caracteritzat per l'engruximent i enduriment de la paret arterial, aquest procés es troba accelerat en pacients amb insuficiència renal crònica (IRC). A més a més, aquests pacients pateixen una disminució de la síntesis de 1,25-dihidroxitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃) que comporta altres complicacions com el hiperparatiroidisme secundari (HPT2). Per aquesta raó es comú l'ús de 1,25(OH)₂D₃ en el tractament del HPT2. L'efecte de la 1,25(OH)₂D₃ en la calcificació de les cèl·lules de múscul llis (CMLV) està força estudiat, però el seu efecte en la proliferació no és molt clar.

Vàrem analitzar l'efecte de la 1,25(OH)₂D₃ en la proliferació de les CMLV per incorporació de BrdU i citometria de flux. Els nostres resultats mostren que la 1,25(OH)₂D₃ induïx la proliferació de manera dosis dependent tant en estat quiescent com proliferatiu. L'efecte de la 1,25(OH)₂D₃ en la proliferació es correlaciona amb un increment de l'expressió del factor de creixement de l'endoteli vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF). A més a més, inhibint l'activitat d'aquest factor s'observa que la proliferació induïda per 1,25(OH)₂D₃ es troba totalment bloquejada.

A partir d'aquests resultats vàrem analitzar la zona promotora del VEGF i vàrem detectar la presència de tres zones amb una seqüència molt semblant als elements de resposta de la vitamina D (VDRE) presents en els gens diana de la 1,25(OH)₂D₃. A partir de l'anàlisi per Immunoprecipitació de Cromatina (ChIP) detectem un VDRE en el promotor del VEGF on el receptor de la vitamina D (VDR) s'uneix després de tractar les CMLV amb 1,25(OH)₂D₃.

Després vàrem plantejar un model diferent per comparar l'efecte de la 1,25(OH)₂D₃ i el 19-nor-1,25(OH)₂D₂ en el procés de proliferació i de calcificació *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*. Vàrem observar un increment de la proliferació en les CMLV, els anells d'artèria aorta i en rates amb IRC tractades amb 1,25(OH)₂D₃, però no en els tractaments amb 19-nor-1,25(OH)₂D₂. També vàrem determinar l'efecte que poden tenir aquests tractaments en la pressió arterial i ambdòs tractaments incrementen la tensió arterial sistòlica (TAS) de manera significativa, en canvi la 1,25(OH)₂D₃ no incrementa la diastòlica (TAD) de la mateixa manera que el 19-nor-1,25(OH)₂D₂. La pressió del pols (PP) incrementa significativament en els animals tractats amb 1,25(OH)₂D₃.

Posteriorment, vàrem analitzar les diferències en la calcificació en les rates tractades amb els dos compostos i a l'analitzar el calci i el fosfat del sèrum, observem un increment significatiu de calci en els dos tractaments. Després vàrem estudiar les àrees calcificades de l'artèria aorta on observem un increment clar en les rates tractades amb $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ que no va ser observat en les rates tractades amb 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$. També mostrem la ratio de la túnica mitja respecte el lumen i podem observar un increment significatiu en les rates tractades amb $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Finalment vàrem analitzar el procés de calcificació *in vitro* en les CMLV on vàrem observar un clar increment del contingut de calci en aquestes cèl·lules després del tractament amb $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, cosa que no vàrem observar en les cèl·lules tractades amb 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$. També vàrem observar un major increment en les cèl·lules tractades amb $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ de l'expressió de RANKL, una citoquina essencial en el procés d'osteoclastogènesis secretada pels osteoblasts (en el nostre cas probablement per cèl·lules semblants a osteoblasts).

Per tant, els nostres resultats suggereixen que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ estimula la proliferació mitjançant el factor de creixement VEGF y la calcificació de les CMLV. En canvi, el 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ solament presenta un lleu efecte en la proliferació.

La arteriosclerosis es un proceso caracterizado por el engrosamiento y endurecimiento de la pared de las arterias. Este proceso se encuentra acelerado en pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC). Además, estos pacientes sufren una disminución de la síntesis de 1,25-dihidroxit vitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃) que les conduce a otras complicaciones como el hiperparatiroidismo secundario (HPT2). Por esta razón el uso de 1,25(OH)₂D₃ es común en el tratamiento del HPT2. El efecto de la 1,25(OH)₂D₃ en la calcificación de las células de músculo liso (CMLV) está bastante estudiado, pero su efecto en la proliferación no está muy claro.

Analizamos el efecto de la 1,25(OH)₂D₃ en la proliferación de las CMLV por incorporación de BrdU y citometría de flujo. Nuestros resultados muestran que la 1,25(OH)₂D₃ induce la proliferación de las CMLV de una manera dosis dependiente tanto en estado quiescente como proliferativo. El efecto de la 1,25(OH)₂D₃ en la proliferación se correlaciona con un incremento de expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF). Además, al inhibir la actividad de este VEGF observamos que la proliferación inducida por la 1,25(OH)₂D₃ se encuentra totalmente bloqueada.

A partir de estos resultados analizamos la zona promotora de VEGF y observamos la presencia de 3 zonas con secuencias muy parecidas a los elementos de respuesta de la vitamina D (VDRE) presentes en los genes diana de la 1,25(OH)₂D₃. A partir del análisis por Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP) detectamos un VDRE en el promotor del VEGF donde el receptor de la vitamina D (VDR) se une tras el tratamiento con 1,25(OH)₂D₃.

Luego planteamos un modelo distinto para comparar el efecto de la 1,25(OH)₂D₃ y el 19-nor-1,25(OH)₂D₂ en el proceso de proliferación y de calcificación *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* en un modelo de ratas IRC. Observamos un incremento de la proliferación en las CMLV, los anillos de arteria aorta y en los animales tratados con 1,25(OH)₂D₃ pero no en los tratamientos con 19-nor-1,25(OH)₂D₂. También determinamos el efecto de ambos tratamientos en la presión arterial y ambos tratamientos incrementan la TAS de manera significativa, en cambio la 1,25(OH)₂D₃ no aumenta la TAD de la misma manera que el 19-nor-1,25(OH)₂D₂. La presión del pulso incrementa significativamente en los animales tratados con 1,25(OH)₂D₃.

Posteriormente, analizamos las diferencias en la calcificación en ratas tratadas con los dos compuestos y al analizar el calcio y fosfato del suero observamos un incremento significativo del calcio en los dos tratamientos. También determinamos la ratio media/lumen donde podemos observar un incremento significativo en las ratas tratadas con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. A continuación, estudiamos las áreas calcificadas de la arteria aorta y determinamos un claro incremento en las ratas tratadas con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ que no es observado en las tratadas con $19\text{-nor-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$.

Finalmente, analizamos el proceso de calcificación *in vitro* en las CMLV y observamos un incremento claro del contenido de calcio en estas células después del tratamiento con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ que no fue observado en el tratamiento con $19\text{-nor-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$. También observamos un incremento mayor en las células tratadas con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ de la expresión de RANKL, una citoquina esencial en el proceso de osteoclastogénesis, secretada por los osteoblastos (en nuestro caso probablemente por células parecidas a osteoblastos).

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ estimula la proliferación mediante el factor de crecimiento VEGF y la calcificación de las CMLV. En cambio el $19\text{-nor-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ solamente presenta un leve efecto en la calcificación.

Atherosclerosis is a complex process characterized by an increase in the wall thickness due to accumulation of cells and extracellular matrix between the endothelium and the smooth muscle cell wall. This process is accelerated in patients with chronic renal failure. In these patients, decreased synthesis of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) leads to secondary complications, like hyperparathyroidism, being treatment with 1,25(OH)₂D₃ a common practice. The effect of 1,25(OH)₂D₃ on vascular smooth muscle cells (VSMC) calcification has been widely studied, but the role of 1,25(OH)₂D₃ on VSMC proliferation remains obscure.

We have analyzed the effects of 1,25(OH)₂D₃ in the proliferation of VSMC. We found that 1,25(OH)₂D₃ induces a dose-dependent increase in VSMC proliferation in quiescent cells and in cells stimulated to grow. The effect of 1,25(OH)₂D₃ on VSMC proliferation is mediated by an increase of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), since the inhibition of VEGF activity totally blunted the 1,25(OH)₂D₃-induced VSMC proliferation. These results led us to study the promoter zone of VEGF gene. In this sequence we detected three putative sequences resembling vitamin D response elements (VDRE). Using chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis we determined one VDRE in VEGF promoter that binds to the vitamin D receptor (VDR) after treatment with 1,25(OH)₂D₃.

Then, we aimed to study the effect of 1,25(OH)₂D₃ and 19-nor-1,25-(OH)₂D₂ in VSMC proliferation and calcification *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* in a model of chronic renal failure (5/6 nephrectomy). We found an increase in proliferation *in vitro*, *ex vivo* in aortic rings incubated with 1,25(OH)₂D₃ and in animals treated with 1,25(OH)₂D₃ for 8 weeks. Furthermore, 19-nor-1,25-(OH)₂D₂ treatment did not increase VSMC proliferation. We determined the effect of 1,25(OH)₂D₃ and 19-nor-1,25-(OH)₂D₂ in blood pressure. Both treatment increased SBP significantly. However 19-nor-1,25-(OH)₂D₂ induced a significant increase in DBP which was not seen in the 1,25(OH)₂D₃ treated animals. The pulse pressure increased significantly with 1,25(OH)₂D₃ treatment. Then, we analyzed calcium and phosphate serum levels in rats and we observed a significant elevation of serum calcium in both treatments. This elevation was not different between 1,25(OH)₂D₃ and 19-nor-1,25-(OH)₂D₂. The ratio media/lumen area increased significantly in the 1,25(OH)₂D₃-treated group.

Abstract

Finally, we studied the calcified areas and we noticed a clear increase of calcification in rats treated with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ compared with control and 19-nor- $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_2$. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimulated VSMC proliferation and calcification in vivo. In contrast, 19-nor- $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_2$ had a slight effect in proliferation process with no effect on calcification, despite the increases in plasma calcium observed in both groups.

Finally, we evaluated the calcification proces in VSMC *in vitro*. Firstly, we determined calcium content in VSMC treated with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ or 19-nor- $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_2$ and we observed an increase of VSMC calcification only in cells treated wit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Moreover, we analized different osteoblastic markers and we detected that RANKL expression increasased 5 fold in $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ treatment.

Therefore, this results suggest that $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimulate vascular smooth muscle cells through VEGF mediated pathway. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimulate calcification process too. Analog of vitamin D, 19-nor- $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_2$ only present slight efect in VSMC calcification.

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓ	3
1. MALALTIA RENAL CRÒNICA (MRC)	5
1.1 Filtració Glomerular (FG)	5
1.2 Factors de risc en la progressió de la MRC	6
1.3 Etapes de la Malaltia Renal Crònica	6
1.4 Conseqüències de la MRC	7
1.4.1 Síndrome urèmic	7
1.4.2 Hiperparatiroidisme secundari	7
1.4.3 Malaltia cardiovascular (CV) associada a la MRC	9
1.4.3.1 Arteriopaties urèmiques	10
1.4.3.2 Calcificació vascular	13
1.4.3.2.1 Mecanismes de calcificació vascular	14
1.4.3.2.2 Diferenciació de les CMLV durant la calcificació	16
1.4.3.3 Proliferació cel·lular	19
1.4.3.3.1 Regulació del cicle cel·lular	19
1.4.3.3.2 Factors de creixement	20
2 VITAMINA D	24
2.1 Breu història de la vitamina D	24
2.2 Biosíntesis de la vitamina D	25
2.3 Receptor de la vitamina D (VDR)	27
2.4 Acció de la vitamina D	29
2.4.1 Acció genòmica de la vitamina D a través del VDR	29
2.4.2 Acció no-genòmica de la vitamina D	31
2.5 Funcions de la vitamina D	32
2.6 Anàlegs de la vitamina D	33

Índex

OBJECTIUS	39
RESULTATS	43
1. 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through a VEGF-mediated pathway	47
2. A forgotten method to induce experimental chronic renal failure in the rat by ligation of the renal parenchyma	55
3. Differential cardiovascular effects of calcitriol and paricalcitol	61
4. 1,25-dihydroxyvitamin D ₃ stimulates vitamin d receptor DNA binding to the vegf promoter	89
DISCUSSIÓ	105
1. La 1,25(OH) ₂ D ₃ estimula la proliferació en les cèl·lules de múscul llis vascular (CMLV)	107
2. El VEGF com a mediador de la proliferació de les CMLV per la 1,25(OH) ₂ D ₃	110
3. L'anàleg de la vitamina d: 19-nor-1,25(OH) ₂ D ₂ té un efecte menor que la 1,25(OH) ₂ D ₃ en el procés de proliferació i calcificació de les CMLV	114
4. Evidències in vivo dels efectes de la 1,25(OH) ₂ D ₃ i el 19-nor-1,25(OH) ₂ D ₂ sobre les CMLV i la paret vascular	116
5. Quin pot ser el mecanisme de selectivitat del anàleg de la vitamina ?.....	122
CONCLUSIONS	127
BIBLIOGRAFIA	131

1,25(OH) ₂ D ₃	Calcitriol (1,25-dihidroxitamina D ₃)
19-nor-1,25(OH) ₂ D ₂	Paricalcitol (19-nor-1,25-dihidroxitamin D ₂)
AF2	Domini d'activació de la funció-2
BMP	Proteïna morfogenètiques de l'os
CaBP	Proteïna d'unió al calci
CaXP	Producte calci-fòsfor
Cbaf-1	Core binding factor
CD	Cèl·lules dendrítiques
CE	Cèl·lules endotelials
ChIP	Immunoprecipitació de cromatina
CMLV	Cèl·lules de múscul llis vascular
CV	Malaltia cardiovascular
DBD	Domini d'unió a l'DNA
DBP	Proteïna lligadora de la vitamina D
FG	Filtració glomerular
HPT2	Hiperparatiroidisme secundari
HRE	Elements de resposta hormonal
HVE	Hipertrofia ventricular esquerra
LBD	Domini d'unió al lligant
LDL	Lipoproteïnes de Baixa Densitat
MGP	Proteïna de matriu Gla
MRC	Malaltia renal crònica
OPG	Osteoprotegerina
PIGF	Factor de creixement de placenta
PP	Pressió del pols
PTH	Hormona paratiroidea
RANK	Receptor activador del factor nuclear γ B
RANKL	Lligand del receptor activador del factor nuclear γ B
RXR	Receptor de l'àcid cis- retinoic
TAD	Tensió arterial diastòlica
TAS	Tensió arterial sistòlica
TNF- α	Factor de necrosis tumoral - α
VDR	Receptor de la vitamina D

Abreviatures

VDRE	Elements de resposta de la vitamina D
VE	Dilatació ventricular esquerra
VEGF	Factor de creixement de l'endoteli vascular
VEGFR-1	Receptor 1 del VEGF (Flt1)
VEGFR-2	Receptor 2 del VEGF (Flk-1 ó Kdr)
VEGFR-3	Receptor 3 del VEGF (Flt-4)
VFP	Factor de permeabilitat vascular

— |

| —

— |

| —

1. MALATIA RENAL CRÒNICA (MRC)

La malaltia renal crònica (MRC) és una síndrome clínica complexa que resulta del dany progressiu i permanent de l'estructura anatòmica renal, això comporta la disminució de la funció renal que desenvolupa la malaltia clínica per retenció de substàncies que normalment serien excretades pels ronyons, pèrdua de substàncies que normalment són retingudes pels ronyons i respostes compensadores a la pèrdua de la funció. Quan el filtrat glomerular (FG) disminueix aproximadament per sota del 15%, comencen a aparèixer els signes del denominat Síndrome Urèmic. Aquesta síndrome és el conjunt de símptomes i alteracions bioquímiques que apareixen durant l'estadi final de la MRC.

1.1 Filtració Glomerular (FG)

Indubtablement el paràmetre més important per a determinar la funció renal és determinar la taxa de Filtració Glomerular (FG). La taxa de FG representa el grau en el qual es forma l'ultrafiltrat de plasma pel glomèrul i això és un indicatiu de la funció de la massa renal. A partir de compostos sintetitzats de manera endògena o administrats de manera exògena que no s'uneixen a proteïnes del sèrum, són permeables a través dels capil·lars del glomèrul, no es reabsorbeixen ni metabolitzen, sintetitzen o secreten pels túbuls renals, podem obtenir una fidel estimació de la taxa de FG. Això pot ser expressat matemàticament com:

$$FG=UV/P$$

On U és la concentració en orina del compost, V és el grau del flux urinari i P és la concentració plasmàtica del mateix compost. Clínicament s'usa com a marcador per a determinar la taxa de FG el aclariment de creatinina. La creatinina és una substància endògena produïda en les cèl·lules musculars per una conversió no enzimàtica de creatinina i fosfocreatinina. Atès que la creatinina té un pes molecular baix, no s'uneix a proteïnes del plasma i es filtra lliurement a nivell de glomèruls, és un excel·lent marcador per a estimar la taxa de FG. El valor normal de l'aclariment de creatinina està comprès entre 100-130 ml/min en humans i entre 1-3 ml/min en el cas de les rates.

1.2 Factors de risc en la progressió de la MRC

Els individus amb alt risc per a malalties cròniques del ronyó han de ser sotmeses a revisions específiques en avaluacions de salut. Tal i com es pot observar a la taula 1 s'inclouen individus amb diabetis, hipertensió,... A més a més tenim altres factors de risc considerats sociodemogràfics, com l'edat i l'ètnia que també es consideren factors potencials de risc de inici o susceptibilitat a la MRC.

Factors clínics	Factors de risc sociodemogràfics
Diabetis Hipertensió Malalties autoimmunes Infeccions sistèmiques Exposició medicines o drogues Procediments associats a la disminució de la funció del ronyó	Edat avançada Ètnia: afroamericans Exposició a certes condicions ambientals i químiques. Fumar Altres

Taula 1. Factors de risc de les malalties renals cròniques: classificació d'acord amb el *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (K/DOQI)

1.3 Etapes de la Malaltia Renal Crònica

La progressió de la MRC transcorre en cinc etapes segons el grau de la funció renal. Es considera funció normal el 100% de aclariment de creatinina.

Etapa	Descripció	Filtració Glomerular (FG) (mL/min/1.73 m ²)
1	Dany renal (ex. Proteïnúria)	> 90
2	Lleu disminució de la FG	60-89
3	Moderada disminucions de la FG	30-59
4	Severa disminució de la FG	15-29
5	Fracàs del ronyó	< 15 ó diàlisi

Taula 2. Classificació de etapes de la MRC: classificació d'acord amb el *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (K/DOQI)

1.4 Conseqüències de la MRC

1.4.1 Síndrome urèmic

El terme urèmia significa literalment “orina dintre de la sang”. Piorry l’any 1840 ho va utilitzar per a definir les conseqüències de l’acumulació dels compostos que normalment són eliminats pel ronyó. Actualment es denomina així al conjunt de símptomes i signes deguts a la retenció d’excés de productes del desdoblament metabòlic de les proteïnes en la sang per la incapacitat de les nefronas per a secretar adequadament la urea i altres productes del metabolisme proteic. Trobem una simptomatologia complexa i variable implicada en aquesta síndrome: anèmia, acidosis, sobrecàrrega de fluids, acumulació de productes del metabolisme proteic, malnutrició, acumulació de la càrrega d’alumini, de les encara no identificades toxines urèmiques i un desequilibri hormonal. Un dels desequilibris horminals més importants en la urèmia és l’increment de l’hormona paratiroidea (PTH).

1.4.2 Hiperparatiroidisme secundari

La parathormona (PTH) és una hormona que es sintetitza en les cèl·lules de la glàndula paratiroidea com preProPTH i es secreta com a polipèptid de cadena única constituïda per 84 aminoàcids. Una vegada en circulació pateix ruptures proteolítiques per a donar lloc a diferents fragments que contenen la regió amino-terminal (PTH 1-34), la regió mitja (PTH 44-48) o la regió carboxil-terminal (PTH 53-84). Per tant, en la circulació existeix una barreja de fragments de la PTH originats de la PTH intacta (1-84). La PTH intacta i la amino-terminal (1-34) tenen activitat biològica equipotent en el ronyó; la PTH 1-34 és l’única capaç d’exercir accions biològiques sobre l’esquelet. Com es pot observar a la Figura 1, la PTH regula els nivells de calci i fòsfor en la sang i juga un paper important en el remodelat ossi. L’acció de la PTH en l’os és complexa però en general estimula l’alliberament de calci i fòsfor de l’os a través del procés de reabsorció. A més, actua sobre els túbuls renals incrementant la reabsorció tubular del calci i inhibint la del fòsfor. La PTH també actua afavorint la hidroxilació de la 25-dihidroxi-vitamina D₃ per a aconseguir la forma activa de la vitamina D, 1,25-dihidroxi-vitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃), la qual actua incrementant l’absorció de calci i fòsfor en l’intestí i els túbuls renals. Per tant, l’increment de calci i de 1,25(OH)₂D₃ en el sèrum, causa retroalimentació negativa en el procés d’alliberament de PTH per

les glàndules paratiroides, mentre que tant la PTH com la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ causen un increment de calci en el sèrum. En la MRC aquest balanç es troba alterat de manera que els nivells de síntesi $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ es troben reduïts i consegüentment els nivells de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i calci en el sèrum disminueixen. Això afavoreix un increment de la secreció de PTH que també influeix en la hiperplàsia de la glàndula paratiroidea conduint a l'hiperparatiroidisme secundari.

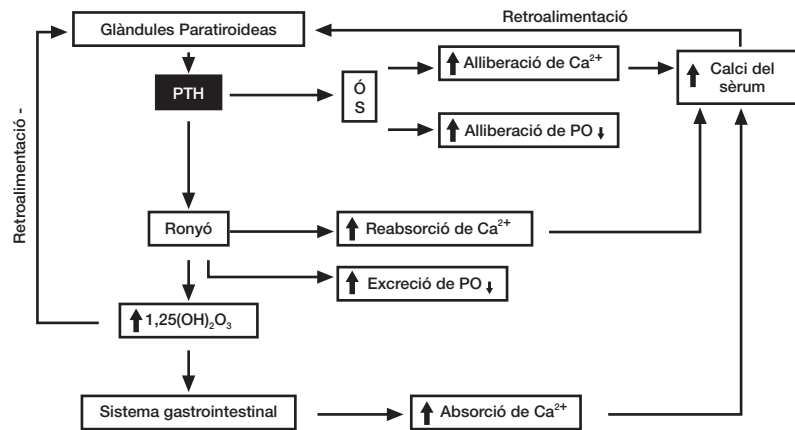


Figura 1. Mecanismes d'acció de la PTH: l'activitat biològica principal de la PTH es dona a nivell de l'os i el ronyó.

Està àmpliament demostrat que els pacients amb MRC pateixen hiperparatiroidisme secundari (HPT2), que es caracteritza per un desordre funcional de les glàndules paratiroides, amb la consegüent hipersecreció de PTH i hiperplàsia de les glàndules [39]. Els pacients amb MRC pateixen aquesta malaltia per diferents causes: l'eliminació de fòsfor es troba deteriorada, no es produeix vitamina D a causa de la desaparició del parènquima renal, l'absorció intestinal de calci és baixa i els nivells sanguinis de calci disminueixen [39]. Per tot això, el HPT2 en la MRC és tractat amb suplementes de calci, restricció de fòsfors i vitamina D. S'ha demostrat l'eficàcia de la administració intravenosa i oral de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ per suprimir el nivells de PTH en pacients amb HPT2 [7;61;170]. No obstant això, el potent efecte de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre l'absorció de calci i fòsfor dins l'intestí i sobre la mobilització dels mateixos en l'os produeix que el

tractament amb vitamina D activa es compliqui amb la hipercalcèmia i hiperfosfatèmia a dosis terapèutiques [45;145]. Per això, s'estan estudiant anàlegs de la vitamina D per al tractament del HPT2 els quals disminueixin les concentracions sèriques de PTH al mateix temps que elevin mínimament la calcèmia i la fosfatèmia.

Un dels anàlegs més estudiats i actualment més usat és el Paricalcitol (19-nor-1,25-dihidroxitamin D₂). Estudis de Slatopolsky *et al* [169] demostren que el 19-nor-1,25(OH)₂D₂ suprimeix els nivells de PTH en rates urèmiques a una concentració la qual no afecta els nivells de calci en el plasma. No es coneix la raó per aquest efecte diferencial entre la 1,25(OH)₂D₃ i el 19-nor-1,25(OH)₂D₂, però existeixen diversos estudis on detecten diferents efectes de l'anàleg en vers la 1,25(OH)₂D₃. Finch *et al* [57] observen que el 19-nor-1,25(OH)₂D₂ es unes 10 vegades menys actiu en l'increment de calci i fòsfor al sèrum quan aquests dos elements han estat eliminats de la dieta en rates paratiroidectomitzades suggerint que això pot ser degut, en part, a la disminució de la mobilització mineral en l'os. També Takahashi *et al* [179] van observar que l'administració durant 8 setmanes de 19-nor-1,25(OH)₂D₂ a rates urèmiques no incrementa d'igual manera els nivells de VDR en la paret intestinal comparat amb animals tractats amb 1,25(OH)₂D₃. Tant l'efecte de 1,25(OH)₂D₃ com de 19-nor-1,25(OH)₂D₂ en la paret vascular (on recentment s'ha descobert la presència de VDR) resta per estudiar, per aquesta raó es un dels principals objectius d'aquest estudi.

1.4.3 Malaltia cardiovascular (CV) associada a la MRC

La malaltia cardiovascular (CV) és molt comuna en adults amb MRC tractats regularment en diàlisi. És menys coneguda la seva prevalença en nens i adults joves amb MRC. El percentatge de mort per causes cardíaques en aquests pacients es d'un 40-50% i a més a més és 20 vegades més comú la mort per malaltia CV en pacients urèmics que en la població general [10;189]. Com podem observar en la Figura 2 la malaltia CV en la MRC es divideix en un component de miocardiopatia i un altre d'arteriopatia urèmica.

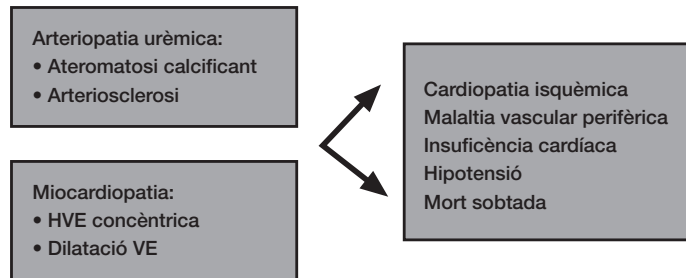


Figura 2. Malalties cardiovasculars associades a la MRC. Pel dany causat tant en el sistema arterial com en el cor el pacients amb MRC poden manifestar malalties com la cardiopatia isquèmica i altres.

La hipertrofia ventricular esquerra (HVE) es pot trobar durant l'inici de la progressió a la MRC i freqüentment es diagnostica en pacients amb malaltia renal, fins i tot quan encara manté la funció d'excreció a nivells normals. Els factors més importants en aquesta miocardiopatia són els factors neuroendocrins, en particular el sistema renina-angiotensina-aldosterona, endotelina i la alta activitat simpàtica. En el moment en que disminueix el filtrat glomerular apareixen altres factors de risc de la HVE com l'anèmia, la sobrecàrrega de volum i d'hiperparatiroidisme. La dilatació ventricular esquerra (VE) es el resultat de l'augment prolongat de la pressió diastòlica degut a un increment de flux/volum crònic i de la despesa cardíaca (*high out-put*) associat a tres factors: retenció de sals i aigua, "shunt" arteriovenós i anèmia [117].

Pel que fa a les arteriopaties més usuals en MRC, l'ateromatosis està associada amb la fibrosis i calcificació de la capa intima i per tant a la disminució del diàmetre de la llum per la formació de plaques d'ateroma calcificades. En canvi, en l'arteriosclerosi s'observa calcificació i engruiximent de la capa mitja de la paret dels vasos amb el conseqüent increment de la rigidesa arterial. La suma del dany en el miocardi amb el vascular causa les manifestacions clíniques ja conegudes com cardiopatia isquèmica, insuficiència cardíaca, hipotensió, ... [154]

1.43.1 Arteriopaties urèmiques: arteriosclerosi i ateromatosis

Com ja hem comentat, les arteriopaties urèmiques es troben afectades pels processos de proliferació i calcificació de les parets arterials. L'estructura normal de

les artèries consta de tres capes ben delimitades (Fig.3): la **túnica íntima** que consta de l'endoteli, format per una monocapa de cèl·lules endotelials i el subendoteli o làmina basal, formada per una capa de teixit conjuntiu, la **túnica mitja**, que és la capa més gruixuda constituïda per cèl·lules musculars llises (CMLV), aquesta túnica està limitada exteriorment per la làmina elàstica, que està formada per fibres elàstiques amb fenestracions que permeten el pas de substàncies i cèl·lules en ambdues direccions. I finalment la **túnica adventícia**, la part més externa de l'artèria, formada per teixit conjuntiu amb feixos de col·lagen, CMLV i fibroblastos. Aquest teixit conjuntiu es prolonga gradualment relacionant-se amb estructures veïnes.

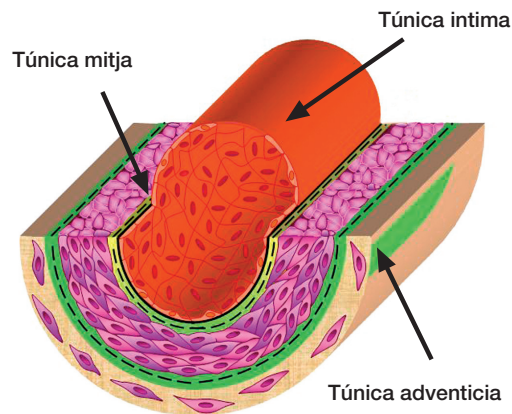


Figura 3. Estructura de la paret arterial. Es compon bàsicament de tres capes concèntriques: íntima, mitja i adventícia. Aquest tipus d'estructura es repeteix en tots els tipus d'artèria, variant la proporció d'alguns elements, com làmina elàstica i CMLV, segons on es troben.

Amb freqüència es confonen els termes d'arteriosclerosi i aterosclerosi i s'usen erròniament amb el mateix significat. L'arteriosclerosi està associada a un procés d'hipertròfia vascular, caracteritzat per un increment del grossor i de la duresa de la paret arterial, a causa d'un procés d'engreixament i calcificació sofert per les capes íntima i mitjana de les artèries [4;54]. Aquest increment de gruix es deu fonamentalment a l'augment de la síntesi de matriu extracel·lular i a un increment de la proliferació de les CMLV [4]. Segons els estudis de Amann *et al* [4] la proliferació de les CMLV en rates nefrectomitzades (nefrectomia 5/6) està associat amb un increment de l'activitat secretora

de manera que s'obté un increment del contingut de col·lagen i un engruiximent de la paret de la aorta. En aquest estudi observen un increment de les CMLV (+67.3%) després de la nefrectomia, suggerint hiperplàsia cel·lular, amb un petit increment del volum cel·lular (+14.3%), considerat com a hipertròfia cel·lular. Com a conseqüència d'aquesta remodelació, disminueix l'elasticitat de les artèries per adaptar-se al flux del bombament cardíac [5]. Aquest increment de la duresa de la paret arterial en pacients amb MRC i l'increment de la velocitat de l'ona de pols, un marcador de la duresa de la paret, són importants predictors independents de la mortalitat en aquesta població [12]. Els pacients amb malaltia renal crònica (MRC) pateixen aquesta patologia de manera accelerada, essent les CMLV un dels tipus cel·lulars afectats [160]. A més de la proliferació de les CMLV de la túnica íntima, aquesta patologia es caracteritza per patir calcificació de la paret arterial. Està descrit que la calcificació vascular és un procés actiu d'osteogènesis a la paret del vas sanguini on les CMLV pateixen un canvi fenotípic convertint-se en cèl·lules que expressen marcadors de osteoblasts [160]. En aquest procés s'han involucrat diversos mediadors [3], però l'origen i els factors que acceleren el procés no estan clars (veure més endavant). L'ateromatosi o aterosclerosi és una forma comuna d'arteriosclerosi en la qual es desenvolupen lesions anomenades ateromes a les parets de les artèries de manera que es redueix el diàmetre de la llum del vas. La OMS defineix l'aterosclerosi com: "thickening and loss of elasticity of the walls of medium and large muscular arteries with lesions in the innermost layer of the artery (arterial intima). this disease process of atherogenesis includes the retention of cholesterol-rich lipoproteins and their binding to proteoglycans in the arterial intima, generation of proinflammatory molecules that recruit macrophages to the subendothelial space, formation of foam cells, and eventual calcification of the arterial wall. these arterial plaques (atheromas) contain carbohydrates; blood; and calcium". S'han formulat diferents teories per explicar el procés d'inici i evolució de les lesions ateroscleròtiques. Inicialment es van proposar dues hipòtesis alternatives, la teoria trombogènica i la lipídica. La teoria trombogènica de Carl von Rostansky el 1852 suggereix que el factor determinant de la lesió és la deposició de fibrina amb la subsegüent organització i acumulació de lípids. La teoria lipídica es basa en els experiments de Anitskchow el 1913 on conills alimentats amb una dieta rica en colesterol patien lesions ateroscleròtiques. Això va suggerir que l'acumulació de lípids a les artèries era la causa fonamental de la formació de les lesions. Actualment aquestes dues teories s'han fusionat i ampliat i es considera que l'aterosclerosi és una malaltia

inflamatoria-fibroproliferativa que parteix d'un determinat dany que ha patit l'artèria [151]. Tal i com podem observar en la Figura 4 en aquest procés es produeix un increment de mida de la túnica íntima on es dipositen diferents tipus de cèl·lules així com matriu extracel·lular i calci.

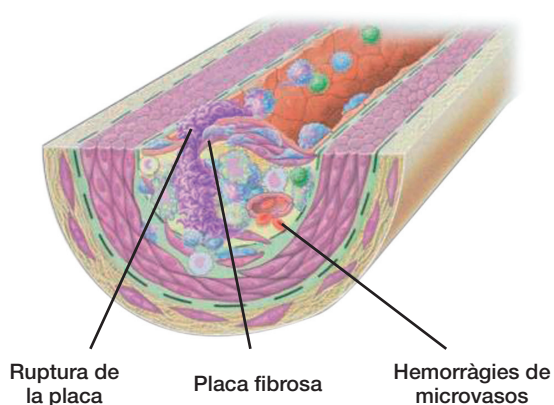


Figura 4. Placa ateroscleròtica. Una vegada formada l'ateroma, pot patir un trencament de la placa fibrosa i es pot donar la formació del trombe que podria obturar la llum del vas. Adaptat de *Ross R* 1999

1.3.3.2 Calcificació vascular

El terme de calcificació descriu el procés normal de mineralització que ocorre en els ossos i les dents. En diversos tipus de malalties és possible observar que s'està donant lloc a calcificacions en zones anormals i es dona de manera molt similar al procés fisiològic. Estudis epidemiològics i clínics mostren que el dany en les artèries es el factor de major contribució a l'alta morbimortalitat CV i mortalitat en pacients MRC. La complicació arterial més freqüent és l'oclusió i/o disminució de l'elasticitat causada, majoritàriament, per l'increment del contingut de calci i les calcificacions vasculares. En els vasos sanguinis podem trobar els dipòsits de calci en diferents capes de la paret arterial i això està relacionat amb la patologia:

- calcificació de la túnica íntima: relacionat amb les lesions ateroscleròtiques [26;79].
- calcificació de la túnica mitja: associat a l'increment de la rigidesa de la paret vascular i a l'arteriosclerosi observada amb l'edat, diabetis i MRC [53;106].

Els dos tipus de calcificació poden donar-se independentment l'un de l'altre, però en el cas dels pacients MRC aquest procés implica, generalment, ambdós tipus de calcificació vascular [80;158].

1.3.3.2.1 Mecanismes de calcificació vascular

El mecanisme de calcificació vascular encara no està molt clar. Anteriorment predominava la idea que aquest era un procés passiu sense cap tipus de regulació físico-química degut als elevats nivells de calci, fosfat i producte calci-fòsfor (CaXP) al sèrum. Actualment hi ha diferents teories, que no s'exclouen mútuament, del procés de calcificació [65]:

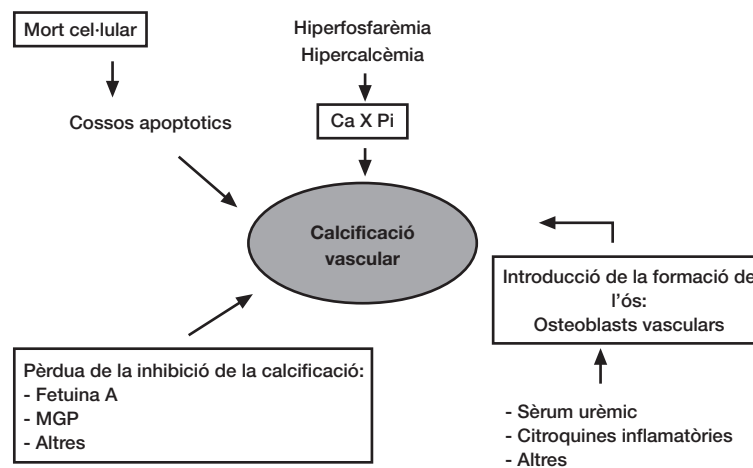


Figura 5. Teories del mecanisme de calcificació vascular. La hiperfosfatèmia i hipercalcèmia presents en els pacients amb MRC és el principal estimulador de la calcificació. A part, altres processos poden ser també inductors de la calcificació com: la pèrdua d'inhibidors de calcificació, l'inducció del procés de formació d'os i la mort cel·lular. Adaptat de Giachelli, 2004.

a) Calci i fosfat

Alguns estudis suggereixen que en els pacients amb MRC els quals tenen alta concentració de calci, fosfat i producte CaXP tenen incrementada la calcificació vascular de manera significativa ja que els nivells elevats de calci i fosfat promouen la formació de cristalls de bioapatita (principal component mineral de l'os, espines

i closques) [14]. Paral·lelament trobem treballs *in vitro* que donen suport a aquests resultats. Quan exposem CMLV a elevades concentracions de fosfat o calci observem la presència de precipitats Ca-P a la matriu extracel·lular i quan les incubem amb els dos elements a la vegada, observem un efecte sinèrgic de la calcificació [150;198]. A més a més, es coneix que aquest procés no és senzillament degut a la precipitació dels ions bivalents, sinó que es tracta d'un procés completament regulat. Acompanyat d'aquesta mineralització, les cèl·lules pateixen un canvi fenotípic caracteritzat per la pèrdua de l'expressió de gens específics de les cèl·lules de múscul llis, com SM22 α i SM α , i un increment en l'expressió de gens comunament associats amb el procés de diferenciació de l'os [124]. L'efecte més important que observem és sobre el gen del “*core binding factor*” (Cbaf-1), un factor de transcripció crític en la diferenciació dels osteoblasts i en la regulació de l'osteocalcina, l'osteopontina i altres proteïnes de la matriu òssia [123;172].

b) Mort cel·lular i apoptosi

Tant en el procés de formació de l'os com en el cas de les aortes calcificades en humans, s'ha observat la presència de petites vesícules de matriu (derivades de cèl·lules) que semblen actuar com a llocs iniciadors de la formació de cristalls d'apatita. Durant el procés de mort cel·lular i d'apoptosi en la paret vascular es podria iniciar la calcificació per la presència de “cossos apoptòtics”, similars a aquestes vesícules de matriu, que incrementarien la permeabilitat de la paret cel·lular facilitant l'entrada de calci i fosfat, i sembla ser que també actuen com a estructures nuclears per la formació dels cristalls de calci [144].

c) Inhibidors de la calcificació

Quan combinem calci i fosfat a les concentracions que podem trobar al sèrum humà s'observen precipitacions d'apatita que en condicions normal *in vivo* no observaríem. Això suggereix la presència d'inhibidors naturals de la calcificació. Es coneixen la Fetuina, la proteïna Matrix Gla (*Matrix Gla Protein*, MGP), l'osteoprotegerina i l'osteopontina com a inhibidors naturals de la calcificació en situacions normals [43;67;191]. El cas de pèrdua o inhibició d'aquestes substàncies podria conduir a una mineralització espontània. Per exemple, la Fetuina A inhibeix la calcificació per la unió amb les estructures d'hidroxiapatita i es troba, en humans, a una concentració molt baixa en el sèrum de pacients en diàlisi [90].

d) Estimuladors de la calcificació vascular en el sèrum urèmic

Les calcificacions vasculares en la urèmia no són induïdes exclusivament per la hiperfosfatèmia, alguns estudis suggereixen la presència d'altres substàncies estimuladores de la calcificació en el sèrum de pacients amb MRC [123]. Per exemple, CMLV bovines en presència de sèrum urèmic incrementen la expressió de gens relacionats amb el procés de calcificació, com el *Cbfa1* que es un factor de transcripció osteoblastic essencial pel procés de diferenciació. Uns altres interessants candidats son les proteïnes morfogenètiques de l'os (*bone morphogenetic protein*, BMP) que són factors de diferenciació osteogènica i que en artèries humanes calcificades s'ha trobat incrementada l'expressió [48]. S'han identificat un gran nombre de factors de la urèmia que són capaços d'induir l'expressió de gens osteogènics, de transformació osteoblastica i de secreció d'algunes proteïnes de matriu òssia en la paret dels vasos i altres teixits tous. Alguns d'aquest factors són: el factor de necrosis tumoral α (*tumor necrosis factor*, TNF- α) [185], citoquines inflamatores [173], fibronectina [196], col·lagen tipus I [196], 25-hidrocolesterol [195] i la 1,25(OH)₂D₃ [71].

1.3.3.2.2 Diferenciació de les CMLV durant la calcificació

Les CMLV, els perícits i les cèl·lules osteoblàstiques deriven de les cèl·lules mesenquimàtiques indiferenciades totipotents de la medul·la. Mentre que els osteoblasts madurs arriben a un estat irreversible al final de la diferenciació, de manera que no són capaços de re-entrar al cicle cel·lular, els perícits i les CMLV retenen la capacitat de pluripotència i poden transformar-se en osteoblasts [27;161]. Aquesta transformació implica una modulació fenotípica de les cèl·lules vasculares residents en un entorn de matriu permissiu. Els factors que regulen aquesta transició fenotípica encara no estan molt ben estudiats. S'han identificat diferents factors de transcripció que són importants en les funcions de l'osteoblast i condrocits en les zones calcificades de la paret arterial com BMP-2, osteonectina, osteocalcina i MGP [186]. Hruska *et al* [76] proposen un possible paper de BMP-2/Msx2 com a inductors del canvi fenotípic de les CMLV en cèl·lules semblants a osteoblast. El Msx2 es un factor de transcripció que promou l'expressió de gens osteogènics com la fosfatasa alcalina, l'osteopontina i altres [32;155]. El BMP-2 es un potent morfogenètic de l'os que també s'ha trobat que s'expressa en les plaques arterioscleròtiques [15]. Com podem observar a la Figura 6 el BMP-2 indueix l'expressió de Msx2 i Runx/Cbfa1

ser un gen crític en la calcificació vascular i es troba regulat per l'acció del BMP-2. L'efecte d'aquest és a través de l'estimulació en la regulació de la proteïna Osterix (Osx), un regulador transcripcional global de la mineralització i diferenciació osteoblàstica.

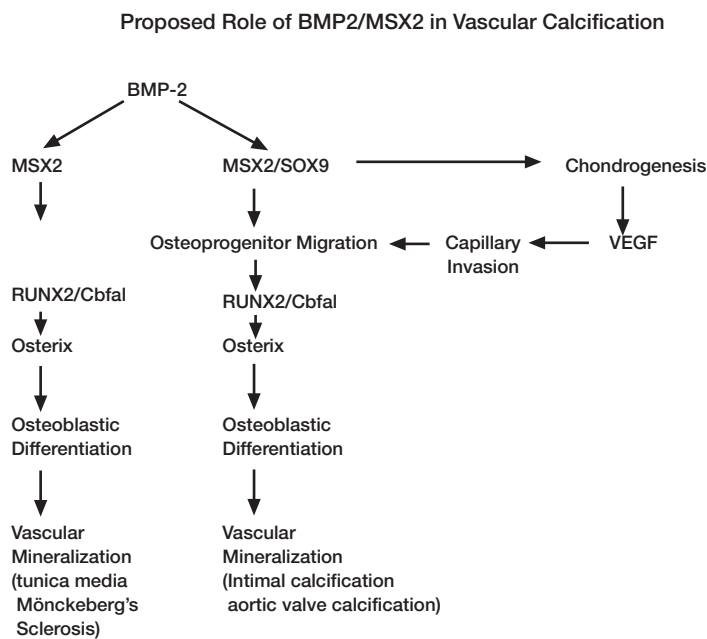


Figura 6. Possible paper de BMP-2/Msx2 en la calcificació vascular. Adaptat de Hruska *et al* 2005.

A més a més dels marcadors anteriors, existeixen estudis que involucren factors de regulació osteoclàstica, com l'osteoprotegerina (OPG), el receptor activador del factor nuclear κB (*receptor activator of nuclear factor κB* , RANK) i el seu lligand RANKL. OPG es produeix en un ampli rang de teixits, incloent el sistema cardiovascular. Tant les cèl·lules endotelials com les CMLV expressen OPG i particularment es troben nivells alts d'expressió en l'arteria renal i aorta. En comparació, RANK i RANKL són gairebé indetectables en vasos normals, però podem detectar lleument expressió de RANKL en lesions aòrtiques en humans [48]. En el sistema ossi, RANKL es produeix per les línees cel·lulars osteoblàstiques, activa les cèl·lules T i promou la formació, fusió, diferenciació, activació i supervivència dels osteoclasts, conduint a un increment de la reabsorció i pèrdua d'os. RANKL, estimula també l'expressió del seu propi receptor,

el RANK, el qual s'expressa en els progenitors i osteoclasts madurs [130] i cèl·lules dendrítiques [6]. L'OPG té efectes biològics oposats als efectes produïts pel RANKL, actua com a inhibidor soluble prevenint la interacció de RANKL amb el seu receptor i per tant, inhibint la estimulació d'aquest receptor. Les primeres evidències de què OPG està involucrat amb la calcificació arterial es troben en el moment que Bucay *et al* [25] treballant amb ratolins "Knockout" observen que aquests presenten osteoporosis i calcificació arterial de la capa mitja de les arteries renal i aorta. A més a més, també s'ha observat que l'OPG inhibeix la calcificació vascular induïda per vitamina D *in vivo* [141]. A partir d'aquests resultats Schoppet *et al* [156] mostren una hipòtesis del paper de RANK-OPG en la relació entre el sistema esquelètic i el vascular. Com es pot observar en la Figura 7, les cèl·lules endotelials i CMLV de la paret arterial produeixen OPG el qual actua com a factor de supervivència per les mateixes cèl·lules endotelials [112]. A més a més, l'OPG podria intervenir inhibint el procés de calcificació ja sigui induït per la vitamina D o per altres tipus d'estimuladors de la calcificació. La interacció del RANKL en aquest sistema podria venir donada per l'estimulació de les cèl·lules dendrítiques les quals expressen el receptor de RANKL.

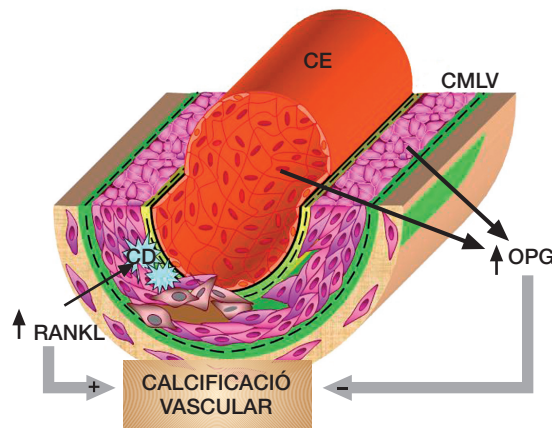


Figura 7. Paper hipotètic de RANKL i OPG en el sistema vascular. Les CMLV i les cèl·lules endotelials (CE) produeixen OPG que inhibeix el procés de calcificació de la paret vascular. La possible relació de RANKL amb el sistema vascular podria venir per les cèl·lules dendrítiques (CD) que expressen el receptor RANK. Adaptat de Schoppet *et al* 1998.

1.4.3.3 Proliferació cel·lular

Ja hem comentat anteriorment que els pacients amb MRC pateixen enduriment de la paret arterial, aquesta característica es deu en part per l'increment de gruix de la paret per un increment de la proliferació de les CMLV [4]. El procés de proliferació cel·lular es porta a terme incrementant el contingut de molècules i orgànuls (creixement cel·lular) i duplicant el material genètic per a posteriorment dividir-se en dues cèl·lules filles que seran genèticament idèntiques. Aquest procés té lloc d'una manera molt controlada. Segons el tipus cel·lular la regulació del cicle pot ser diferent, per exemple, les cèl·lules nervioses perden la capacitat de dividir-se una vegada diferenciades, en canvi, les cèl·lules de múscul llis conserven la capacitat de dividir-se però no la utilitzen en situacions normals. Depenent de les condicions de l'entorn, les CMLV madures poden patir un canvi fenotípic cap a l'estat "sintètic" on recuperen la propietat proliferativa i es transformen en cèl·lules semblants als fibroblasts (*fibroblast-like cells*) [184]. Aquests tipus de CMLV activades tenen propietats funcionals i morfològiques semblants a les CMLV embrionàries, les quals tenen la capacitat de proliferar, migrar i produir matriu extracel·lular. De la mateixa manera, aquestes cèl·lules modificades, poden intervenir en les patologies que afecten a la paret vascular, tant per la propietat de proliferar i per tant d'incrementar el gruix de la paret, com per la propietat avançada de produir calcificació vascular a partir de l'habilitat d'aquestes mateixes cèl·lules de convertir-se en cèl·lules semblants als osteoblasts.

1.4.3.3.1 Regulació del cicle cel·lular

En tots els organismes, el procés de divisió i proliferació està finament regulat. Generalment les cèl·lules es divideixen quan reben senyals que ordenen entrar en la fase activa del cicle cel·lular, la fase G1. Durant aquesta fase la cèl·lula adquireix la grandària suficient i l'energia necessària en forma d'ATP per iniciar la fase S, fase de síntesi d'DNA. Com a resultat d'aquesta fase de replicació la cèl·lula conté l'original i una replica de l'DNA destinats a les dues cèl·lules que obtindrem al final del cicle. Donat que aquest procés gasta molta energia, la cèl·lula necessita una altre etapa G2 on recupera ATP i incrementa el volum cel·lular. Finalment la cèl·lula es divideix en la última etapa, la mitosi. Aquest procés està finament regulat, l'instant crucial del cicle és el punt de restricció (punt R) al final de la fase G1, moment en el qual la cèl·lula decideix si deu o no avançar a la divisió cel·lular. Generalment les senyals

que dirigeixen a les cèl·lules per entrar al cicle cel·lular s'anomenen factors de creixement, citoquines o mitògens.

1.4.3.3.2 Factors de creixement:

Els factors de creixement són un conjunt de proteïnes que juntament amb les hormones i neurotransmissors intervenen en la comunicació entre cèl·lules. Generalment s'uneixen a receptors específics en la superfície de la cèl·lula diana per promoure la proliferació, diferenciació i, fins i tot l'apoptosis. Trobem factors de creixement molt versàtils que poden actuar sobre diferents tipus cel·lulars i d'altres són específics:

Factor	Principal cèl·lula diana	Activitat principal
PDGF	Plaquetes i cèl·lules endotelials i placenta	Promou la proliferació del teixit connectiu i cèl·lules de múscul llis
VEGF	Cèl·lules endotelials vasculares	Angiogènesi
FGF	Ampli rang de tipus cel·lulars	Promou la proliferació de diferents tipus cel·lulars, inhibeix la proliferació d'algunes "stem cells" i indueix el mesoderm a formar els embrions primaris
NGF	Cèl·lules neuronals	Promou el creixement de les neurites i la supervivència de les cèl·lules neuronals

Taula 3. Factors de creixement. Alguns exemples de factors de creixement, la cèl·lules diana on actuen i la funció principal que efectuen.

1.4.3.3.2.1 Factor de creixement endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF)

El factor de creixement endotelial vascular (VEGF) és un membre de la família dels factors de creixement angiogènics els quals juguen un paper important per a determinar l'estructura i funció dels vasos sanguinis. La família del VEGF consta de 5 membres, el VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D i el factor de creixement de la

placenta (*placenta growth factor*, PlGF). Membres individuals d'aquesta família són essencials per a la diferenciació de les cèl·lules endotelials, la formació dels túbuls, com els capil·lars, per les cèl·lules endotelials primitives, el manteniment de la matriu dels capil·lars, la diferenciació, generació i manteniment de l'endoteli limfàtic, i la resposta de cèl·lules endotelials als estímuls de proliferació [36;97;140]. Els factors de creixement angiogènics juguen un paper essencial en el desenvolupament dels vasos sanguinis. El procés d'angiogènesis està també implicat en la patogènesis d'una gran varietat de malalties: retinopaties proliferants [111], tumors [23;118;193], psoriasis [47] i altres [55]. Està molt ben documentat l'efecte del VEGF, també anomenat VEGF-A, com a potent mitogen de les cèl·lules endotelials derivades de les artèries, venes i limfes [55] i com a factor de permeabilitat vascular basat en la habilitat d'induir "fugues" vasculars [52;159]. Encara que es coneix que les cèl·lules endotelials són les cèl·lules diana del VEGF, alguns estudis identifiquen l'efecte mitogènic del VEGF en altres tipus cel·lulars [56] com les CMLV [138].

1.4.3.3.2.1.1 Isoformes del VEGF

El VEGF és una glicoproteïna homodimèrica d'unió a heparina d'uns 45 KDa. El gen, en humans del VEGF es troba organitzat en 8 exons. Existeixen diferents isoformes del gen del VEGF, el membre més conegut i estudiat de la família del VEGF és el VEGF-A, la seqüència del qual ja va ser descrita el 1989 [98]. En la mateixa revista es va descriure també una altra seqüència d'un factor anomenat factor de permeabilitat vascular (*vascular permeability factor*, VFP) amb la mateixa seqüència que el VEGF [88]. A partir d'aquests articles es va descobrir que el gen del VEGF-A pot produir diferents transcrits a partir del "splicing" alternatiu dels 8 exons que conté i cadascun d'ells tenen petites diferències en quant a propietats i funció. Les formes més comunes en humans són: VEGF-A₂₀₆, VEGF-A₁₈₉, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₂₁ (Fig 8). Les propietats bioquímiques de les diferents isoformes depenen de la capacitat d'unió a la heparina, i això ve determinat per la presència dels exons 6 i 7.

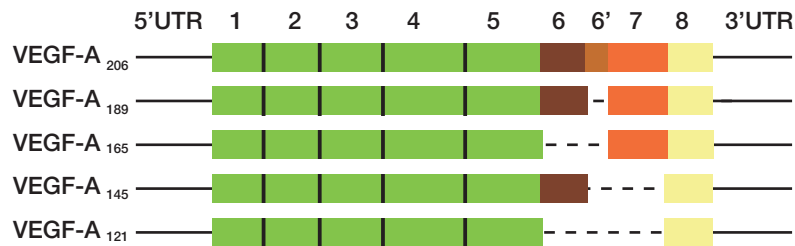


Figura 8. Isoformes del VEGF. Variants de "splicing" més comunes del VEGF.

Com podem observar en la Figura 8 la isoforma VEGF-A₁₂₁ manca dels 2 exons, el 6 i el 7 i per tant no pot unir-se a matriu extracel·lular de manera que es difon totalment. En canvi les isoformes VEGF-A₁₈₉ i VEGF-A₂₀₆ tenen una molt alta afinitat per la heparina, ja que mantenen els dos exons i es troben completament segrestades per la matriu extracel·lular. El VEGF-A₁₆₅ i VEGF-A₁₄₅ han perdut part o totalitat d'aquests exons, això els permet que una quantitat es mantingui unida a matriu i una altra es difongui lliurement. De tots les isoformes existents, el VEGF-A₁₄₅ és la que conté les característiques òptimes de biodisponibilitat i amb millor potència biològica.

1.4.3.3.2.1.2 Receptors del VEGF

S'han identificat 4 receptors diferents que poden unir-se als membres de la família del VEGF. Tres d'ells es troben relacionats amb els receptors tirosina quinasa, el VEGFR-1 (o Flt-1), VEGFR-2 (també anomenat Flk-1 ó Kdr) i el VEGFR-3(ó Flt-4). Tots ells tenen set dominis de similitud a la immunoglobulina en la part extracel·lular, una única regió transmembrana hidrofòbica i una seqüència consens tirosina quinasa en la part citoplasmàtica que es troba interrompuda per un domini d'inserció quinasa. A més d'aquests receptors tirosina quinasa, el VEGF interactua també amb una altre família de coreceptors, les neuropilines. Aquestes són proteïnes transmembrana, sense activitat tirosina quinasa, formades per 5 dominis extracel·lulars, un sol domini transmembrana i un domini citoplasmàtic molt curt. Originalment es van identificar com a receptors implicats en el creixement dels conus nerviosos [108].

Posteriorment s'ha trobat que poden actuar com a coreceptors per al VEGF₁₆₅ formant un complex amb els receptors tirosina quinasa del VEGF i potenciar l'activitat d'aquest [135].

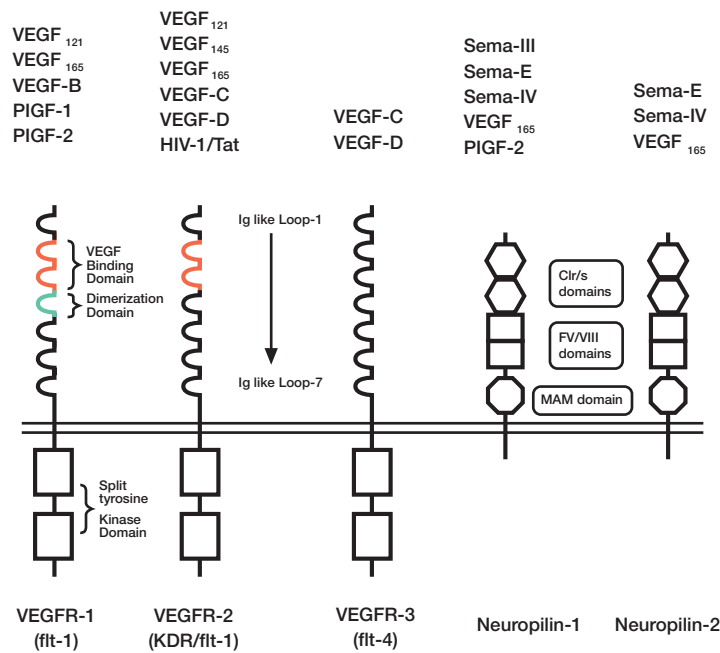


Figura 9. Receptors i factors de creixement de la família del VEGF. Adaptat de Neufeld *et al* 1999 [135]

Com podem observar en la Figura 9 no totes les isoformes del VEGF s'uneixen als diferents receptors amb la mateixa afinitat. Tant el VEGFR-1 i 2 poden unir-se a totes les isoformes del VEGF-A. Al VEGFR-3 s'hi uneixen altres membres de la família del VEGF, el VEGF- C i D. I finalment les neuropilines tenen la capacitat d'unir la isoforma VEGF₁₆₅ i altres membres de la família [135] .

2. VITAMINA D

2.1 Breu història de la vitamina D.

La història de la vitamina D és paral·lela a la història del raquitisme i de la osteomalàcia. La principal característica d'aquestes dues malalties és la falta de calci en els ossos a causa d'una manca de vitamina D. El raquitisme afecta als nens que encara estan en creixement i la osteomalàcia a adults que ja tenen els ossos formats. Ja en el segle I i II, Soranus, un físic romà, va observar deformitats òssies més freqüents en nens romans que en nens grecs, això ho va atribuir a la desnutrició i a la falta d'higiene dels nens romans. En aquest mateix segle Galen va descriure les deformitats òssies clàssiques que s'observen en el raquitisme. A la primera meitat del segle XVII, els casos de raquitisme a Gran Bretanya van passar a ser cada vegada més freqüents i diversos metges de l'època van estudiar la malaltia, descrivint-la amb detall, encara que sense trobar-ne la causa. Un d'ells, Francis Glisson [66], el 1650 va publicar el primer tractat sobre raquitisme, "De Rachitide", on descriu els símptomes i la patologia clínica de diversos estats de malnutrició que va induir en animals d'experimentació. A partir d'aquest tractat, altres investigadors del mateix segle van començar a preguntar-se per l'origen de la malaltia. Van Siweten i posteriorment Levacher de la Feutrie i Bouvier, van relacionar el raquitisme amb una etiologia alimentària, comencen a relacionar el paper patogènic de l'alimentació "deficient". El 1918, McCollum i els seus col·laboradors, John Howland, Edward Park i Paul Shipley van estudiar dietes de cereals deficients en la vitamina A liposoluble i calci en rates joves i van observar canvis esquelètics semblants al raquitisme infantil. D'aquests estudis van deduir que la causa de la malaltia podria tenir relació amb la deficiència de la vitamina A o del calci o bé amb l'alteració del metabolisme d'aquests factors. Posteriorment van estudiar l'efecte de l'oli de fetge de bacallà (s'havia usat ocasionalment amb la finalitat de tractament del raquitisme des de 1789) en aquestes rates raquítics. Suplementant la dieta entre 2-7 dies van induir un patró uniforme de curació del raquitisme. A partir d'aquestes investigacions McCollum compartia la mateixa qüestió que Mellanby, si la vitamina A era antiraquítica per si mateixa o si existia alguna altra substància amb funció específica antiraquítica i una distribució similar a la vitamina A. McCollum i els seus col·laboradors van concloure que la substància antiraquítica era diferent a la vitamina A i aquesta tenia

propietats específiques per a regular el metabolisme de l'os. En seqüència de vitamines descobertes, aquesta era la quarta, per això la van anomenar vitamina D. Amb anterioritat a aquests resultats, ja es coneixia l'efecte preventiu de la llum solar sobre el raquitisme (Armand Trousseau 1861), per tant, a partir del descobriment de la vitamina D i el raquitisme, es va establir que aquesta substància es produeix a la pell per l'acció de la llum solar. I finalment Adolf Windaus va descobrir l'estructura química de la vitamina D i la seva relació amb els esterols, va rebre per aquests resultats el premi Nobel de 1928 [83].

2.2 Biosíntesi de la vitamina D

La vitamina D és una hormona esteroide important que intervé en l'homeòstasi mineral i per tant, en la formació i manteniment de l'estructura òssia [136]. També se li han atribuït altres funcions relacionades amb la regulació del creixement, maduració i diferenciació cel·lular [69], la secreció hormonal [33] i la funció immune [101.]

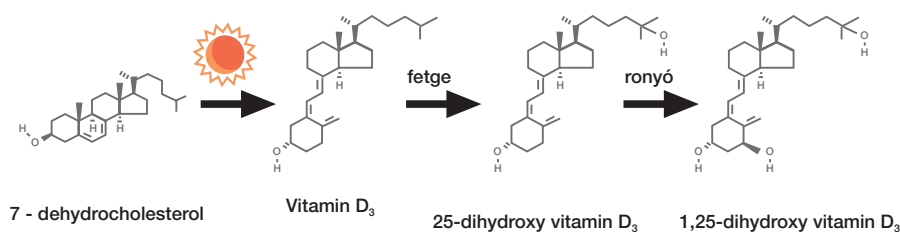


Figura 10. Síntesi de la vitamina D. El precursor de la vitamina D provinent de la dieta o de la bioactivació del 7-dehidrocolesterol per les radiacions solars pateix una sèrie de hidroxilacions per obtenir la forma

Com a hormona esteroide deriva del colesterol, concretament del 7-dehidrocolesterol que per l'exposició de la pell a la radiació ultraviolada (UV) pateix la conversió fotolítica a vitamina D₃ [19]. Els metabòlits de la vitamina D són molècules liofíliques amb molt baixa solubilitat en aigua, per tant deuen ser transportades en circulació per proteïnes plasmàtiques. El mecanisme responsable del transport de la vitamina D₃ de la pell a la sang encara no es coneix, però una

vegada a la circulació sanguínia, la vitamina D₃ generalment es transporta unida a una proteïna lligadora de vitamina D (DBP) [19]. La vitamina D₃ en aquesta forma no té activitat biològica i per això necessita ser metabolitzada fins a la forma activa. Aquesta transformació es porta a terme en diferents passos: una primera hidroxilació té lloc en el fetge on l'enzim mitocondrial 25-hidroxilasa produeix 25-hidroxivitamina D₃ (25(OH)D₃) a partir de la vitamina D₃ [19]. Aquest és el metabòlit circulant més abundant i té una llarga vida mitja, pel que es considera l'índex de l'estatus nutricional en vitamina D. A partir de la 25(OH)D₃ es forma la 1,25(OH)₂D₃ (forma activa de la vitamina D₃) per l'acció de la 1 α -hidroxilasa [19]. Aquest enzim es troba fonamentalment en el ronyó, però s'han descrit altres llocs d'hidroxilació extrarenal per la 1 α -hidroxilasa com en les cèl·lules endotelials [201], cèl·lules de la mucosa del colon [41], macròfags [2] i queratinocitos [78]. L'activitat d'aquest enzim mitocondrial està controlada per la pròpia 1,25(OH)₂D₃ i l'hormona paratiroidea (PTH) així com per la concentració de calci i fosfat [146]. Els nivells del metabòlit actiu de la vitamina D₃ es regulen tant a nivell de síntesi com de degradació [146]. En la degradació, l'enzim 24-hidroxilasa és responsable de la hidroxilació de la 25(OH)D₃ i de la 1,25(OH)₂D₃ per a formar 24,25(OH)₂D₃ i 1,24,25(OH)₂D₃, respectivament [146]. L'enzim 24-hidroxilasa s'expressa fonamentalment en el túbul renal, però la seva distribució tissular és molt més àmplia. L'afinitat per la 1,25(OH)₂D₃ és major que per a la 25(OH)D₃, pel que es considera a l'enzim 24-hidroxilasa com un mecanisme per a eliminar l'excés de 1,25(OH)₂D₃, i per tant evitar la seva toxicitat (15). Tots els metabòlits de la vitamina D tenen alta afinitat per la proteïna transportadora, la DBP, en l'ordre 25(OH)D₃ = 24,25(OH)₂D₃ > 1,25(OH)₂D₃ > vitamina D₃. La unió de la DBP-metabòlit limita l'accés d'aquest a les cèl·lules diana, de manera que no podrà ser metabolitzat i per tant incrementa la vida mitja dels metabòlits. Les hormones esteroidees, com els metabòlits de la vitamina D, poden entrar dins les cèl·lules diana per difusió en la membrana plasmàtica per ser metabolitzats o exercir la seva acció biològica. Per un altre banda, s'ha descrit que en les cèl·lules dels túbuls proximals, la 25(OH)D₃ necessita un receptor endocític, la megalina, per poder entrar dins la cèl·lula i ser metabolitzat a 1,25(OH)₂D₃ [137]. Nykjaer *et al* [137] mostren que la filtració a través del glomèrul i la reabsorció en els túbuls proximals de la 25(OH)D₃ unida a la DBP es dona gràcies a aquest receptor anomenat megalina.

2.3 Receptor de la vitamina D (VDR)

L'acció biològica de la vitamina D₃ es porta a terme a través del seu propi receptor, el VDR. El VDR és un receptor nuclear membre de la superfamília de receptors de les hormones esteroidees/tiroidees. Com altres membres de la superfamília de receptors de les hormones esteroidees/tiroidees, el VDR actua com a factor de transcripció en unir-se el lligand. Podem observar en la Figura 11 l'estructura bàsica del VDR. Consta de diverses regions ben definides que poden funcionar de forma autònoma. El domini d'unió al lligand (*Ligand binding domain*, LBD) és el responsable de la unió del receptor amb la 1,25(OH)₂D₃ amb una gran afinitat. La 25(OH)D₃ i la 24,25(OH)₂D₃ poden unir-se amb una afinitat 100 vegades menor [24;119]. En l'extrem C-terminal observem el domini d'activació de la funció-2 (*Activation function-2*, AF2). Aquest transmet el major canvi conformacional de l'estructura en tres dimensions del VDR en unir-se el lligand necessari per reclutar les proteïnes responsables de la translocació del citoplasma al nucli a través dels microtúbuls. El domini més conservat en diferents espècies és el domini d'unió a l'DNA (*DNA-binding domain*, DBD) en la part N-terminal i que conté dos dits de zinc. Aquest nom deriva del complex tetraèdric format per 4 cisteïnes amb una molècula de zinc de manera que es crea un llaç o dit d'aminoàcids que estableixen la unió amb l'DNA per mitjà de contactes amb fosfats de l'esquelet de l'DNA. El primer dit de zinc (pròxim a N-terminal) és el responsable de què el VDR pugui unir-se als promotors dels gens dependents de vitamina D, específicament en les seqüències anomenades elements de resposta de la vitamina D (*vitamin D response elements*, VDRE) que es troben a la part 5' del promotor dels gens diana de la vitamina D. El segon dit de zinc és, en canvi, el responsable de la heterodimerització necessària amb el RXR (receptor de l'àcid cis- retinoic). Aquest és un procés indispensable perquè el VDR adquireixi la conformació essencial per tenir alta afinitat cap a l'DNA i exercir la seva funció transactivadora o transrepressora, per això necessita interaccionar amb proteïnes nuclears coreguladores que donaran la modulació positiva o negativa de la transcripció en la qual intervé el VDR. Dos dels dominis anteriors serveixen com superfície adaptada per la unió dels coreguladors. El domini d' heterodimerització del RXR conté 246 residus molt conservats entre els receptors nuclears que serveixen d'unió dels coreguladors. L'altre regió es troba en el domini AF-2 que permet la unió de proteïnes del complex iniciador de la transcripció com l'RNA polimerasa.

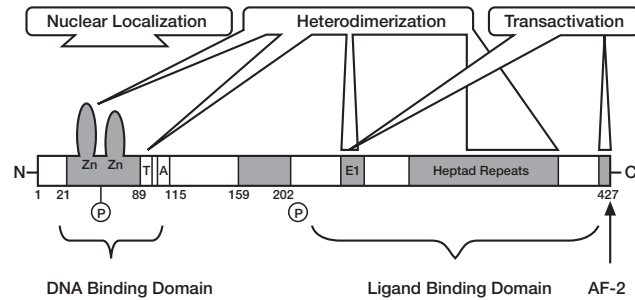


Figura 11. Dominis funcionals del receptor de la vitamina D (VDR): domini d'unió a l'ADN el qual té la funció de localització nuclear i heterodimerització, domini d'unió al lligand que també es responsable de l'heterodimerització i de la transactivació del receptor. Adaptat Dusso, Brown and Slatopolsky, 2005 [50].

Com podem observar en la taula 4, el potencial d'acció de la 1,25(OH)₂D₃ via el seu receptor nuclear VDR s'extén més enllà del regne de l'homeòstasi mineral en l'os. Trobem presència de VDR en el sistema nerviós, immune i altres.

TABLE 1. NEOCLASSICAL 1,25(OH)₂D₃ TARGET SITES

Classification	Target tissue or cell*	Specific effects†
Immune system	monocytes/macrophages ⁽⁵³⁾ and T-lymphocytes (helper type 1) ^(53,57)	suppression of γ -interferon ⁽²⁰²⁾ and IL-1 through IL-6 ^(53,159,203)
Central nervous system	dorsal root ganglia, ⁽²⁰⁴⁾ glial cells, and hippocampus ^(70,107)	production of NGF, ^(65,66,205) neurotrophin-3, ⁽⁶⁴⁾ and leukemia inhibitory factor ⁽⁶³⁾
Epithelium	epidermal skin/keratinocyte ⁽²⁰⁶⁾ hair follicle ⁽²⁰⁷⁾ female reproductive tract ⁽²⁰⁸⁾	differentiation ^(17,211) differentiation ^(16,17,212) uterine development ⁽¹⁶⁾
	mammary ⁽¹⁰⁸⁾ prostate ⁽²⁰⁹⁾ colon ⁽²¹⁰⁾ lung ⁽¹⁰⁸⁾	\downarrow cell growth ⁽²¹³⁾ \downarrow cell growth ⁽¹⁷³⁾ \downarrow cell growth ^(170,214) surfactant ⁽²¹⁵⁾
Endocrine system	thyrotrope ⁽²¹⁶⁾ thyroid ⁽¹⁰⁸⁾ pancreatic β -cell ⁽²¹⁷⁾ ovary ⁽²⁰⁸⁾ heart ⁽²²¹⁾	TRH receptor ⁽²¹⁸⁾ \downarrow TSH action ⁽²¹⁹⁾ insulin secretion ⁽⁵¹⁾ folliculogenesis ⁽¹⁶⁾ and \downarrow cell growth ⁽²²⁰⁾ \downarrow ANP ^(222,223)
Muscle	adipocyte ⁽²²⁴⁾	lipoprotein lipase ⁽²²⁵⁾
Adipose		
Many systems	diverse cells and cancer cell lines ^(173,226,227)	\downarrow cell growth (c-fos ⁽¹⁷⁹⁾ , \downarrow c-myc ^(58,157)), differentiation (p21 ⁽²²⁸⁾ , p27 ⁽²²⁹⁾ , Mad-1 ⁽²³⁰⁾) and apoptosis ⁽²¹³⁾ (\downarrow Bcl-2 ^(231,232))

*Detected by autoradiographic ligand localization in the nucleus, VDR immunocytochemistry, or responsiveness of cultured cells.

†Effects of 1,25(OH)₂D₃ are positive unless otherwise noted and are selected examples rather than a comprehensive list.

Taula 4. Nous teixits diana de la vitamina D. S'han usat tres metodologies independents per detectar els teixits diana: 1) localització per autoradiografia del lligand després de l'administració de vitamina D, 2) detecció per immunohistoquímica del VDR en el nucli de les cèl·lules diana, 3) Resposta específica en cultius de diferents tipus cel·lulars després del tractament per 1,25(OH)₂D₃. Adaptat de Haussler *et al*, 1998 [70].

2.4 Acció de la vitamina D

2.4.1. Acció genòmica de la vitamina D a través del VDR

La magnitud de la resposta biològica del VDR moderada per la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ depèn de diferents factors: l'accessibilitat de lligand, el contingut de VDR, modificacions genètiques i posttraduccionals i la disponibilitat i l'estat d'activació dels coreguladors genètics. La resposta biològica de la vitamina D en les cèl·lules diana ocorre segons el model de transactivació de gens de les hormones esteroides. Per tant, quan la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ s'uneix al VDR pateix un canvi conformacional que permetrà que el receptor sigui translocat al nucli on forma l'heterodímer generalment amb el receptor de l'àcid retinoic (RXR) [19]. Aquest heterodímer s'uneix a regions promotores de gens específics en els teixits diana, els VDREs i la unió del heterodímer a aquests VDRE forma complexos amb proteïnes addicionals anomenades coactivadores o corepressores de la transcripció, de manera que poden incrementar o disminuir l'expressió dels gens diana [19].

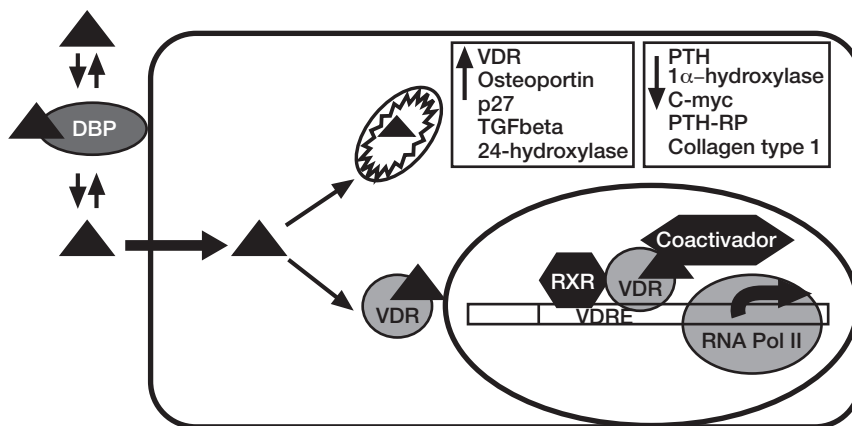


Figura 12. Acció de la vitamina D a través del seu receptor (VDR). El metabòlit actiu de la vitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) entra a les cèl·lules diana per difusió passiva i pot ser degradat o unir-se al VDR que entrarà al nucli i després d'heterodimeritzar amb el RXR, activarà o inhibirà l'expressió genètica dels gens diana que contenen VDREs.

El model clàssic de VDRE està format per 2 seqüències hexamèriques d'DNA d'unió a receptors nuclears: RGKTCA (R= A o G, K= G o T) [49] que es classifiquen segons l'orientació i el nombre de bases que trobem entre les dues seqüències:

- DR (direct repeat): DR3, DR4
- IP (inverted palindrome): IP7, IP9

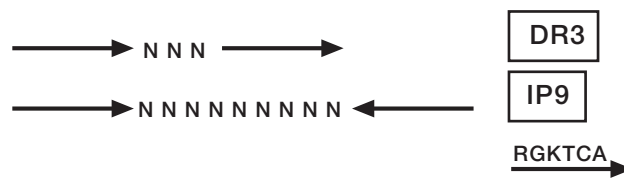


Figura 13. Tipus més comuns de elements de resposta de la vitamina D (VDRE): DR3 que consisteix en la repetició de la seqüència consens en el mateix sentit separada per 3 bases i IP9 que conté la repetició de les seqüències en sentits contraris i separada per 9 bases.

Els tipus de VDRE més comuns són el DR3 i IP9. Segons el model de múltiples vies de la vitamina D de Carlberg et al [29], el caràcter pleiotròpic de la vitamina D podria atribuir-se als diferents tipus d'unions que es poden donar entre els dímers de VDR i els diferents VDREs. En relació amb aquest model, s'han estudiat anàlegs de la vitamina D que mostren una tendència alhora d'activar l'heterodímer VDR-RXR per que s'uneixi a VDREs, de manera que segons l'anàleg s'unirà amb més freqüència a un VDRE tipus IP9 ó DR3 [42;132]. A més, aquesta selectivitat de promotor també es podria correlacionar amb els estudis de Schröder *et al* [157] on troben que el VDRE de tipus IP9 es més freqüent en el gens involucrats en la regulació del cicle cel·lular. El VDR es distribueix àmpliament en molts tipus cel·lulars i no es troba restringit en teixits diana clàssics de la vitamina D, com l'os, el que justifica la varietat d'accions de la 1,25(OH)₂D₃ en l'organisme [16]. Aquesta acció en els gens diana pot afectar a diferents processos o respostes:

- respostes clàssiques de la vitamina D: processos fisiològics clàssics com la regulació de la concentració del calci i fòsfor en la sang per l'acció de la vitamina D en els intestins, l'os i el ronyó.
- respostes no clàssiques de la vitamina D: efecte de la vitamina D en els processos de proliferació i diferenciació de diversos tipus cel·lulars com en cèl·lules epitelials de la pell, cèl·lules intestinals...

2.4.2. Acció no-genòmica de la vitamina D

Trobem diferents respostes dels metabòlits de la vitamina D, igual que altres hormones esteroidees, massa ràpides per implicar canvis en l'expressió genètica. En aquestes respostes podrien intervenir receptors de superfície cel·lular. El paper d'aquestes accions no-genòmiques de la vitamina D encara no està molt clar. En la Taula 5 descrivim algunes d'aquestes accions no-genòmiques.

Resposta	Tipus cel·lular /òrgan	Referència
Transport ràpid del Ca ²⁺	Intestí	[134]
Activació del metabolisme del fosfoinositol	Cél. Paratiroides	[17]
	Enteròcits	[100]
	Mioblasts	[127]
Increment de la concentració de Ca ²⁺ al citosol	Monòcits	[75]
	Osteoblasts	[99]
	Enteròcits	[107]
Increment dels nivells de cGMP	Intestí	[68]
	Cél. Renals corticals	[192]
Activació de la via PKC	Condròcits	[177]
Activació de les MAP quinases	Cél hepàtiques	[9]
Estimulació de l'obertura dels canals de Clor	Cél osteoblàstiques	[200]

Taula 5. Resposta ràpida de la 1,25(OH)₂D₃. Algunes de les respostes ràpides de la vitamina D i el tipus cel·lular on actua.

La naturalesa dels receptors que intervenen en aquestes respostes ràpides encara es troba en controvèrsia. Tot i així s'ha caracteritzat un receptor associat a membrana, la proteïna d'unió als esterols de resposta ràpida (*rapid-response steroid-binding protein*, 1,25D₃-MARRS) que Nemere *et al* [133] van aïllar de les membranes de les cèl·lules d'intestí de pollastre i es va aconseguir fer un anticòs que bloquejava les accions no-genòmiques de la 1,25(OH)₂D₃.

2.5 Funcions de la vitamina D

El sistema endocrí de la vitamina D és un component essencial d'interacció entre el ronyó, l'os, les glàndules paratiroides i l'intestí que permet el manteniment dels nivells de calci extracel·lular d'una manera molt controlada, aquest és un procés vital per la integritat de l'esquelet i la fisiologia cel·lular. Específicament, la vitamina D incrementa l'absorció de calci i fòsfor en el duodè proximal, promovent el pas a través de la vora en raspall al interior de la cèl·lula i la seva sortida per la membrana basolateral [72]. El mecanisme d'acció per a promoure aquest transport de calci en el intestí implica la síntesi de la proteïna d'unió al calci (*calcium binding protein*, CaBP)[21]. La síntesi d'aquesta proteïna és depenent de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i es troba regulada tant a nivell transcripcional com post-transcripcional. També es coneix que la vitamina D és essencial per al manteniment i desenvolupament de l'esquelet. La deficiència de vitamina D té com a resultat el raquitisme en humans joves en edat de creixement i l'osteomalàcia en adults. Com a regulador de la transcripció de proteïnes relacionades amb l'os, la vitamina D induïx l'expressió de proteïnes com l'osteocalcina, RANKL i suprimeix la síntesi de col·lagen tipus I i la producció de OPG [93], una proteïna que s'uneix al mateix receptor que RANKL (el RANK) inhibint la seva funció de promoure la osteoclastogènesis. Per tant, s'ha demostrat tant *in vivo* com *in vitro* que la vitamina D estimula la diferenciació dels osteoclasts i per tant l'alliberament de calci i fòsfor. El sistema endocrí de la vitamina D és també un potent modulador de la funció paratiroïdica. La deficiència de vitamina D provoca una hiperplàsia de la glàndula paratiroïdica i un increment de la síntesi i secreció de PTH. L'administració de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibeix la síntesi de PTH i el creixement cel·lular, per això aquest compost s'usa com a tractament del hiperparatiroidisme secundari. Pel que fa al ronyó, el principal efecte de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ és el control sobre la seva pròpia síntesi i degradació al inhibir la 1α -hidroxilasa i estimular l'expressió de la 24-hidroxilasa, a més a més d'induir l'expressió de megalina en el túbul proximal [137].

Posteriorment, s'ha observat que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ té accions en altres òrgans diana com en la pell, pàncrees, fetge, etc [19]. Aquestes accions se les anomena accions no clàssiques de la vitamina D i estan lligades a la presència de VDR en molts tipus cel·lulars. Entre aquestes accions no clàssiques es troben la regulació de la proliferació i diferenciació cel·lular, així com la regulació de la secreció hormonal

i de la funció immune. Els macròfags i limfòcits, a més a més de tenir VDR expressen 1α -hidroxilasa i per tant tenen la capacitat de sintetitzar $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ de forma local en determinades circumstàncies [126;128]. També existeixen estudis epidemiològics que demostren que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ disminueix el risc de càncer de colon [63;116], pit [63;152] i pròstata [109], i per això s'ha estudiat *in vitro* els efectes de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en cèl·lules cancerígenes i s'ha demostrat que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ té la capacitat d'inhibir la proliferació i estimular la diferenciació cel·lular en aquests tipus de cèl·lules. Contràriament a aquests resultats, existeixen altres tipus cel·lulars, com cèl·lules de l'endometri [44] i condrocits [94] on la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ estimula la proliferació cel·lular. Per tant, les respostes de la vitamina D poden ser moltes i encara queda molt per estudiar. La presència del VDR en les cèl·lules endotelials i CMLV, i el descobriment de que les cèl·lules endotelials sintetitzen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ localment ens fa preguntar sobre el paper paracrí de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en la paret dels vasos.

2.6 Anàlegs de la vitamina D

Les diferents funcions de la vitamina D van atraure l'atenció a l'industria farmacèutica cap als anys 80 i 90, de manera que van intentar separar les dues funcions principals de la vitamina D: agent calcèmic i agent de diferenciació cel·lular. D'aquest tipus de recerca apareixen alguns anàlegs de la vitamina D "poc-calcemians" com el calcipotriol, OCT, 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ (o paricalcitol) i 1α -OH- D_2 , els quals s'han usat molt en dermatologia (tractament per la psoriasis) i pel tractament de l'hiperparatiroidisme secundari [11;18]. La vitamina D i tots els seus metabòlits són inusualment de conformació flexible (Fig 14) de manera que aquesta flexibilitat intrínseca dóna un gran nombre de canvis conformacionals que ocorren en milers per segon. Aquesta capacitat de mobilitat genera una ampla varietat de formes que poden disposar-se per unir-se al VDR, a la DBP i en el lloc d'unió del substrat dels enzims que metabolitzen la vitamina D amb diferents afinitats.

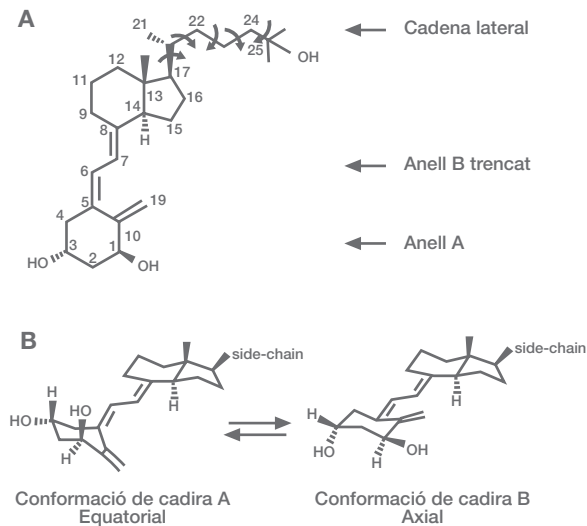


Figura 14. Flexibilitat conformacional de 1,25(OH)₂D₃. (A) Estructura de la 1,25(OH)₂D₃, podem observar les 3 parts de la molècula que li consenten aquesta conformació flexible: la cadena lateral pot rotar 360° en el carboni 5, el anell B també pot rotar 360° en els carbonis 6 i 7 i el anell A pot patir canvis d'orientació entre equatorial i axial. (B) Diferents conformacions que pot tenir la 1,25(OH)₂D₃ depenent de el anell A.

La síntesi d'anàlegs de la vitamina D es centra en aquesta propietat dels metabòlits de la vitamina D. La majoria dels anàlegs els van dissenyar de manera que interactuessin directament amb la maquinaria de transcripció de tal manera que no requereixin els passos anteriors d'activació de la vitamina D. Per tot això, els criteris més importants que influencien el disseny dels anàlegs són:

a) Interacció amb el VDR/RXR/VDRE

L'afinitat dels anàlegs pel VDR, comparat amb la vitamina D₃ activa, és un punt important ja que pot ser la causa de la disminució o fins i tot el bloqueig de la resposta. Aquest podria ser un dels motius de la resposta diferencial del OCT, ja que l'afinitat pel VDR es unes 8 vegades menor que la 1,25(OH)₂D₃, en canvi en el cas del 19-nor-1,25(OH)₂D₂ sembla ser que tenen una afinitat similar [168]. En unir-se el lligand natural al VDR, aquest pateix el canvi conformacional precís per poder interaccionar tant amb el VDRE del gen diana com amb els coactivadors encarregats de formar el complex transcripcional. Els anàlegs de la vitamina D imiten

a la forma activa de la vitamina D, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, i actuen a través del mateix mecanisme. Per tant, podria ser que les diferències de biopotència que podem trobar entre els anàlegs de la vitamina D i la seva forma activa podria ser degut en part en canvis d'acoblament a l'hora de dimeritzar-se i/o dels coactivadors. És a dir, que al unir-se els anàlegs al VDR provoquessin un canvi conformacional més o menys afí a la dimerització i/o a la unió amb els coactivadors de la transcripció. A més, també s'han trobat anàlegs de la vitamina D que indueixen un canvi conformacional específic del VDR que incrementa l'estabilitat del receptor i el protegeix contra el procés de proteòlisis [131].

b) Enzims catalítics de la cèl·lula diana

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ es troba subjecte al catabolisme per l'enzim 24-hidroxilasa en les cèl·lules diana produint l'àcid calcitroic. Aquest enzim es troba en quasi totes, si no en totes, les cèl·lules diana de la vitamina D, i a més a més s'ha descrit la presència de VDRE en el promotor del gen de la 24-hidroxilasa [188;203]. Això ens fa pensar que l'existència d'aquesta via catabòlica és per fer menys sensible les cèl·lules diana després del estímul hormonal. L'acció d'aquest enzim sobre els anàlegs de la vitamina D encara no està massa estudiat, però es pot pensar que el catabolisme de les cèl·lules diana sobre aquests anàlegs podria contribuir a l'activitat farmacocinètica i biològica observada tant *in vitro* com *in vivo*. A més, Siu-Caldera *et al* [164] parlen de la possibilitat que alguns anàlegs de la vitamina D puguin ser activats més que catabolitzats per aquest mateix enzim.

c) Activació enzimàtica

La majoria d'anàlegs són actius com a tal, sense requerir cap pas d'activació, però s'ha demostrat que aquests anàlegs tenen activitat biològica a concentracions excessivament altes, ja que pateixen els efectes laterals i/o tenen menor vida mitja en el plasma degut a la baixa afinitat amb la DBP. Per tot això, seria millor dissenyar anàlegs que poguessin ser activats *in vivo* però els criteris estructurals que permeten als metabòlits de la vitamina D a ser substrat de la 25-hidroxilasa hepàtica encara no es coneixen. Aquest interès per dissenyar anàlegs que puguin ser activats per la 25-hidroxilasa ha incrementat des de que s'ha investigat la presència d'aquest enzim en altres teixits extra-hepàtics com: ronyó [64], os [81] i l'endoteli vascular [82], de manera que si les cèl·lules diana poguessin sintetitzar la forma activa a partir de

la pro-droga sense necessitat de què la hormona entrés al torrent sanguini, es podria incrementar la potencia d'actuació de l'anàleg.

d) Proteïnes d'unió a la vitamina D

La DBP és una glicoproteïna que té diferents funcions entre elles la d'unió i transport dels metabòlits de la vitamina D. A més a més, es l'encarregada de segrestar l'actina G per prevenir la polimerització en sang, actua com a lligand per la megalina per poder absorbir la forma $25(\text{OH})\text{D}_3$ al ronyó i sintetitzar la forma activa i també s'uneix a àcids grassos i agents quimiotàctics. Per tot això la DBP és important en la farmacocinètica dels anàlegs de la vitamina D que poden tenir major o menor afinitat per la DBP depenent de les modificacions en les cadenes dels diferents compostos. Els anàlegs amb baixa afinitat per la DBP tenen menor vida mitja ja que són eliminats més ràpidament de la circulació però també tenen major accessibilitat a les cèl·lules diana, això podria incrementar la resposta en el cas de teixits que requereixen una curta exposició del lligand. Això podria explicar també la resposta diferencial del OCT (té una afinitat per la DBP de 400 a 500 vegades menor que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), però en el cas del 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ observem valors molt semblants a la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en quant a afinitat a la DBP. A més, existeixen altres proteïnes, en un percentatge molt menor a la DBP, que poden actuar com a transportadors de l'anàleg i l'impacta d'aquestes en la resposta diferencial encara no es coneix.

Per tot això, la selectivitat dels anàlegs no és sempre específica del tipus cel·lular o teixit, també pot ser específic del procés o gen dins d'un mateix teixit. Tots aquests factors són importants a l'hora de dissenyar i estudiar els anàlegs de la vitamina D. Quan s'hagi identificat el mecanisme molecular exacte d'actuació de la vitamina D es podran dissenyar anàlegs no calcemiant amb avantatges transcripcionals sobre la forma activa, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

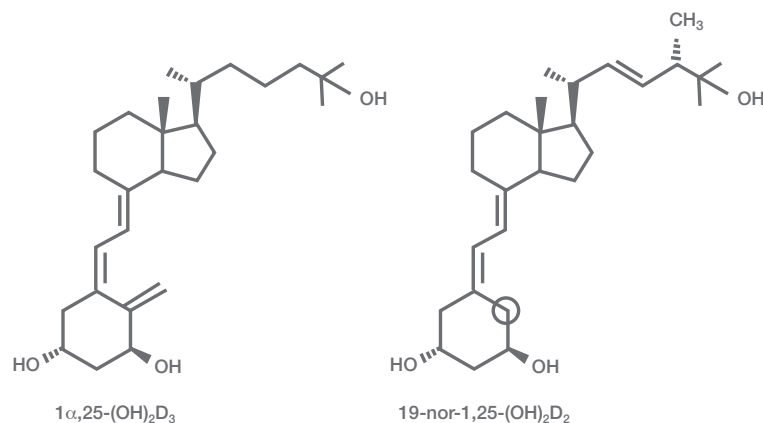


Figura 15. Estructura de la 1,25-dihidroxivitamin D₃ i del 19-nor-1,25-dihidroxivitamin D₂.
Adaptat de Finch, Brown and Slatopolsky, 1999

L'acció d'alguns d'aquest anàleg ja ha estat provada, tant en estudis experimentals com clínics. El 19-nor-1,25(OH)₂D₂ (Fig 15), Paricalcitol, és un anàleg de la vitamina D de tercera generació, desenvolupat el 1985, que té modificacions tant en la cadena lateral com en l'anell A. Es creu que aquestes modificacions causen una supressió efectiva de la PTH amb menys efectes calcèmics i fosfatèmics, per això, s'usa actualment com a tractament per el HPT2 [22;105;114;169;171;179]. Aquests efectes diferencials del 19-nor-1,25(OH)₂D₂ no solament es van trobar en els nivells plasmàtics de calci i fòsfor, existeixen estudis amb rates insuficients renals on s'ha demostrat que el 19-nor-1,25(OH)₂D₂ no incrementa l'expressió del VDR en el intestí, contràriament a l'efecte que té la 1,25(OH)₂D₃[179]. També s'ha demostrat que l'efecte sobre l'os és diferent, el 19-nor-1,25(OH)₂D₂ té un efecte menor sobre l'activitat osteoclàstica i osteoblàstica que la 1,25(OH)₂D₃ [73;114]. Tots aquests resultats indueixen a pensar que la 1,25(OH)₂D₃ i el 19-nor-1,25(OH)₂D₂ tenen efectes diferencials sobre els òrgans diana. No obstant això, no existeixen dades que analitzin aquest possible comportament diferencial en altres òrgans, com el sistema cardiovascular.

— |

| —

— |

| —

Objectius

— |

| —

— |

| —

L'efecte de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre la paret vascular en la malaltia renal crònica (MRC) especialment en les cèl·lules de múscul llis vascular (CMLV) estan poc estudiats, per això els objectius d'aquesta tesi són:

1. Analitzar l'efecte de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ exògena sobre la proliferació de les CMLV.
2. Estudi del VEGF com a possible mediador de la resposta de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre les CMLV.
3. Anàlisi del promotor del VEGF per determinar la presència d'un possible element de resposta de la vitamina D (VDRE).
4. Estudi dels efectes diferencials de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i el seu anàleg, el 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$, en el procés de proliferació i calcificació de les CMLV. Estudis *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*.

— |

| —

— |

| —

Resultats

— |

| —

— |

| —

- 1. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through a VEGF-mediated pathway**
- 2. A forgotten method to induce experimental chronic renal failure in the rat by ligation of the renal parenchyma**
- 3. Differential cardiovascular effects of calcitriol and paricalcitol**
- 4. 1,25-dihydroxyvitamin D3 stimulates vitamin d receptor DNA binding to the vegf promoter**

— |

| —

— |

| —

1,25-Dihydroxyvitamin D₃ stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through a VEGF-mediated pathway

A Cardús¹, E Parisi¹, C Gallego², M Aldea², E Fernández^{1,3} and JM Valdivielso³

¹Department of Medicine, University of Lleida, Lleida, Spain; ²Department of Basic Medical Sciences, University of Lleida, Lleida, Spain and ³Research Laboratory, Laboratorio de Investigación HUAU-UDL, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, Spain

Atherosclerosis is a complex process characterized by an increase in the wall thickness owing to the accumulation of cells and extracellular matrix between the endothelium and the smooth muscle cell wall. This process is associated with different pathologies and it is accelerated in patients with chronic renal failure. In these patients, decreased synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) leads to secondary complications, like hyperparathyroidism, and treatment with 1,25(OH)₂D₃ is a common practice. The effect of 1,25(OH)₂D₃ on vascular smooth muscle cells (VSMCs) calcification has been widely studied, but the role of 1,25(OH)₂D₃ on VSMC proliferation remains obscure. We have analyzed the effects of 1,25(OH)₂D₃ in the proliferation of VSMC. We found that 1,25(OH)₂D₃ (5–100 nm) induces a dose-dependent increase in VSMC proliferation in quiescent cells and in cells stimulated to grow. This increase in proliferation is achieved by shortening the G1 phase. The effect of 1,25(OH)₂D₃ on VSMC proliferation is mediated by an increase of the expression of vascular endothelial growth factor A (VEGF), as the inhibition of VEGF activity totally blunted the 1,25(OH)₂D₃-induced VSMC proliferation. We found this increase in proliferation *in vitro*, *ex vivo* in aortic rings incubated with 1,25(OH)₂D₃, and *in vivo* in animals with a model of chronic renal failure (5/6 nephrectomy) treated with 1,25(OH)₂D₃ (1 µg/kg three times a week for 8 weeks). Thus, we conclude that 1,25(OH)₂D₃ induces increases in VSMC proliferation through an increase on VEGF expression.

Kidney International advance online publication, 22 March 2006; doi:10.1038/sj.ki.5000304

KEYWORDS: calcitriol smooth muscle; proliferation chronic kidney disease

Patients with chronic kidney disease (CKD) and dialysis patients show an increased mortality despite measures to optimize the dialysis treatment.^{1,2} One of the causes of this increase in mortality seems to be related to changes in the cardiovascular system.^{3,4} Lindner *et al.*⁵ concluded that accelerated atherosclerosis, with proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs), was the major cause of this increased cardiovascular mortality. However, in patients with CKD, another arteriopathy has been described, characterized by an increase in the thickness of the arterial wall with intimal proliferation and endovascular fibrosis with calcification.^{6,7} This arteriosclerotic process leads to a stiffening of the arteries, abnormal coronary perfusion, and left ventricular hypertrophy.⁸ Thus, unregulated proliferation of VSMC may play a central role in both arteriopathies. Under normal circumstances, VSMCs have very reduced proliferation rates, but different physiopathological stimuli can induce their growth.⁹ A number of factors have been involved in the calcification process,^{10,11} but the mediators involved in VSMC proliferation are unknown.

In CKD, impaired production of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃), is a major contributor to the occurrence of parathyroid hyperplasia and to the increased synthesis and secretion of parathyroid hormone. Thus, 1,25(OH)₂D₃ is widely used to treat secondary hyperparathyroidism. Several studies have demonstrated that an excess of 1,25(OH)₂D₃ is arteriotoxic¹² and that 1,25(OH)₂D₃ induces vascular calcifications in humans and experimental animals.^{13,14} Thus, the effects of 1,25(OH)₂D₃ on vascular calcification have been widely studied, but its effects on vascular cell proliferation remain unclear. Furthermore, the presence of vitamin D receptor (VDR) in endothelial cells and VSMCs, and the finding that endothelial cells synthesize 1,25(OH)₂D₃ raises new questions about its paracrine role.^{15,16} Recent studies suggest that 1,25(OH)₂D₃ may have further implications in the atherosclerotic process. In this line of reasoning, Zhender *et al.*¹⁶ postulated that the synthesis of 1,25(OH)₂D₃ by endothelial cells has a paracrine/autocrine function and acts at a local level promoting leukocyte adhesion. Furthermore, Rebsamen *et al.*¹⁷ found that 1,25(OH)₂D₃ induced a dose-dependent increase in VSMC migration.

Correspondence: JM Valdivielso, Laboratorio de Investigación HUAU-UDL, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Rovira Roure 80, Lleida 25198, Spain. E-mail: Valdivielso@medicina.udl.es

Received 19 September 2005; revised 5 January 2006; accepted 12 January 2006

Although it is known that 1,25(OH)₂D₃ acts on many cell lines to decrease the proliferation rate, the few studies aimed at analyzing the effect of 1,25(OH)₂D₃ on VSMCs showed controversial results.^{18,19} Therefore, we decided to investigate whether 1,25(OH)₂D₃ exerts an effect on VSMC proliferation *in vitro*, in aortic rings *ex vivo*, and in a model of CKD in rats. We also analyzed the mediators involved in this process.

RESULTS

Effect of 1,25(OH)₂D₃ on VSMC proliferation

We investigated the effect of crescent concentrations of 1,25(OH)₂D₃ (5–100 nM) on proliferation of serum-starved VSMCs. 1,25(OH)₂D₃ stimulated VSMC proliferation in a dose-dependent manner (Figure 1a).

To determine if 1,25(OH)₂D₃ could increase the proliferative effect induced by growth factors, quiescent cells were treated for 24 h with basic fibroblast growth factor (bFGF) (20 ng/ml) with increasing concentrations of 1,25(OH)₂D₃ (5–100 nM). Figure 1b shows that 1,25(OH)₂D₃ increased proliferation in a dose-dependent manner, with significant stimulatory effects at doses as low as 5 nM. Then, we tested the effect of fetal bovine serum (FBS) addition to the 1,25(OH)₂D₃-induced proliferation. As expected, FBS had a strong effect on the proliferation and, at high concentrations, FBS was able to mask the effects mediated by 1,25(OH)₂D₃ (Figure 1c).

We decided to perform flow cytometry analysis to further characterize the effect of 1,25(OH)₂D₃ on VSMC proliferation by bFGF. Fluorescence-activated cell sorter analysis showed an increase in the percentage of cells in S phase in the 1,25(OH)₂D₃-treated culture, indicating that 1,25(OH)₂D₃ advanced S-phase entry by 6 h (Figure 2).

Then, we examined the effect of 1,25(OH)₂D₃ on VSMC proliferation in aortic rings *ex vivo* (Figure 3). 1,25(OH)₂D₃ induced an increase in proliferating cells with respect to the control. These cells were identified as VSMCs by labeling for α -actin.

Finally, the effect of 1,25(OH)₂D₃ *in vivo* was assessed in a model of CKD. Animals with 5/6 renal mass reduction and treated with 1,25(OH)₂D₃ for 8 weeks did not gain weight during the treatment (200 ± 24 g), whereas animals treated with saline increased their weight (280 ± 20 g). Total calcium

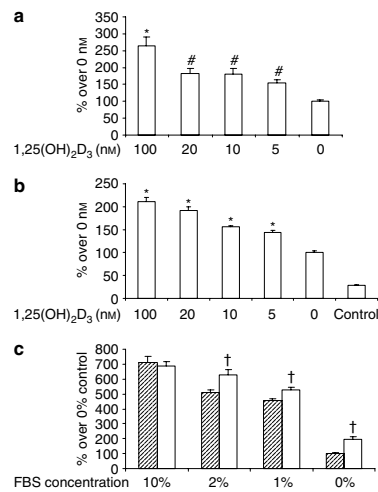


Figure 1 | Effects of 1,25(OH)₂D₃ on VSMC proliferation. VSMCs were made quiescent by serum starvation (0.2% FBS) for 48 h, then cells were treated with increasing concentrations of 1,25(OH)₂D₃ for another 48 h in the (a) absence or (b) presence of 20 ng/ml of bFGF. Cell proliferation was assayed by BrdU incorporation with an enzyme-linked immunosorbent assay technique. (c) Crescent concentrations of serum were added to the culture media of cells incubated with (100 nM) (open bars) or controls (dashed bars). Bars represent means \pm s.e.m. of three independent experiments. # $P < 0.05$, * $P < 0.01$ vs 0 nM; † $P < 0.01$ vs no 1,25(OH)₂D₃ and same serum concentration.

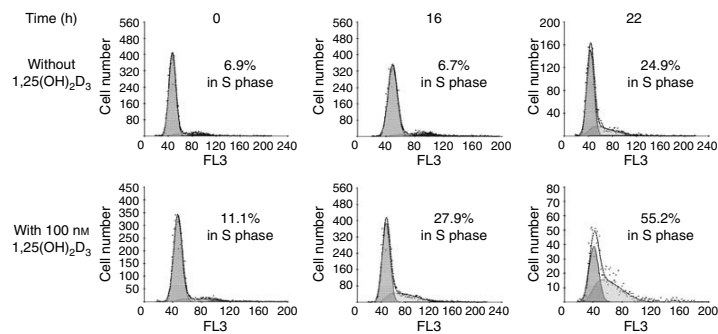


Figure 2 | Analysis of cell cycle progression in VSMCs treated with 1,25(OH)₂D₃. Quiescent cells stimulated to grow with bFGF were incubated with or without 100 nM 1,25(OH)₂D₃ for 22 h. DNA content distributions were determined by fluorescence-activated cell sorter analysis at 0, 16, and 22 h. The percentages of cells in S phase are shown.

levels were significantly increased in animals receiving 1,25(OH)₂D₃ compared with control animals (control: 11.02 ± 0.14 mg/dl; 1,25(OH)₂D₃: 12.14 ± 0.3 mg/dl. $P < 0.01$). We also observed an increase in phosphate levels that did not reach statistical significance (control: 6.06 ± 0.27 mg/dl; 1,25(OH)₂D₃: 6.68 ± 0.35 mg/dl). In addition, levels of calcium phosphorous product (CaXPO₄) product were significantly higher in rats receiving 1,25(OH)₂D₃ compared with control animals (control: 66.83 ± 3 mg²/dl²; 1,25(OH)₂D₃: 81.3 ± 5.2 mg²/dl²; $P < 0.01$). Animals with 5/6 renal mass reduction presented a decreased creatinine clearance (control: 1.6 ± 0.19; 5/6 nephrectomy: 1.047 ± 0.17 ml/min). Treatment with 1,25(OH)₂D₃ further aggravated the renal failure (5/6 nephrectomy + 1,25(OH)₂D₃: 0.58 ± 0.09 ml/min; $P < 0.05$ vs 5/6 nephrectomy). Animals with 5/6 renal mass reduction and treated with 1,25(OH)₂D₃ for 8 weeks had a higher number of proliferative nuclei (stained for Ki67) than animals untreated (3J). The proliferative cells were identified as VSMC by α -actin immunofluorescence.

Effect of 1,25(OH)₂D₃ on gene expression in VSMCs

Treatment with 1,25(OH)₂D₃ significantly increased the VDR mRNA levels in VSMC (Figure 4a). Results of the Western blot analysis showed that VDR protein increased by more than 10-fold after 12 h of treatment (Figure 4b).

In Figure 4, we show the effects of 1,25(OH)₂D₃ treatment in VSMC on vascular endothelial growth factor A (VEGF) mRNA and protein expression. We found that treatment with 1,25(OH)₂D₃ significantly increased the levels of VEGF mRNA and protein (Figure 4c and d). The expression of fms-like tyrosine kinase 1 (FLT-1) receptor was slightly increased by *real-time* polymerase chain reaction (PCR) and Western blot (Figure 4e and f). No expression of FLK-1 was detected either by *real-time* PCR or Western Blot.

To determine if an increase in VEGF was responsible for the increase in proliferation, we incubated VSMC with 1,25(OH)₂D₃ and a VEGF receptor antagonist (VGA1102). In Figure 5a, we can see that co-incubation with VGA1102 totally blunted the proliferative effect induced by 1,25(OH)₂D₃.

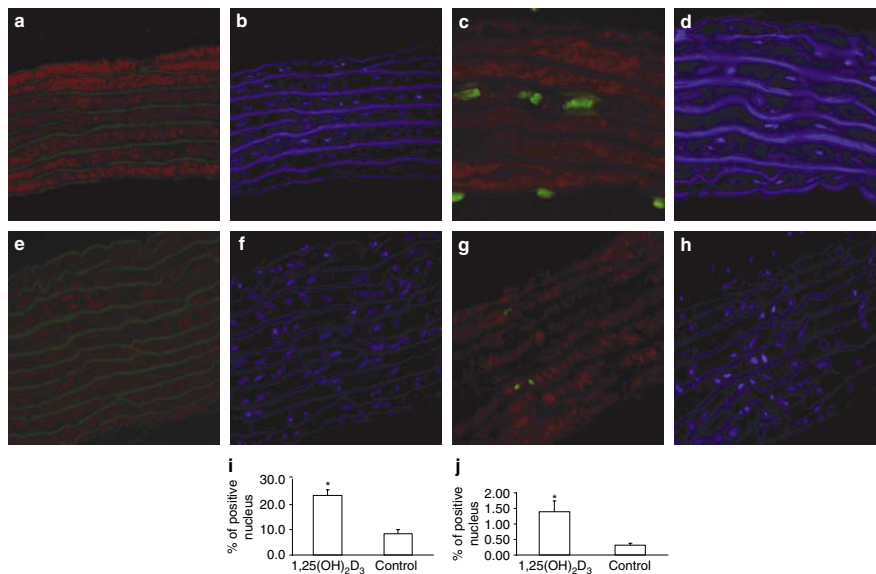


Figure 3 | Immunofluorescence analysis of the proliferative effect of 1,25(OH)₂D₃ on VSMC in aortic rings *ex vivo* and *in vivo*. Explants were cultured in DMEM–20% FBS for 8 days, then medium was replaced and BrdU at 10 μ M was added. Explants were then incubated with or without 100 nM 1,25(OH)₂D₃ for 4 days. Immunofluorescence of BrdU-positive nucleus was performed in aortic ring sections (green), total nucleus was stained with Hoechst 33342 (blue), and VSMC were identified by α -actin immunofluorescence (red). (a and b) Explants control (original magnification, $\times 30$) (c and d) Explants treated with 1,25(OH)₂D₃ (original magnification, $\times 60$). Animals with 5/6 nephrectomy were treated with 1 μ g/kg of 1,25(OH)₂D₃ three times a week for 8 weeks or with a saline injection. Aortas were included in paraffin and sliced. Immunofluorescence of Ki67-positive nucleus was performed in aortic ring sections (green), total nucleus was stained with Hoechst 33342 (blue), and VSMC were identified by α -actin immunofluorescence (red). (e and f) Immunofluorescence of aorta samples of control rats and (original magnification, $\times 30$) (g and h) rats treated with 1,25(OH)₂D₃ (original magnification, $\times 30$). (i) Quantification of the proliferation induced by 1,25(OH)₂D₃ on aortic explants *ex vivo*. (j) Quantification of the proliferation induced by 1,25(OH)₂D₃ on aortic sections *in vivo*. Bars represent means \pm s.e.m. ($n = 10$ sections). * $P < 0.01$ vs control.

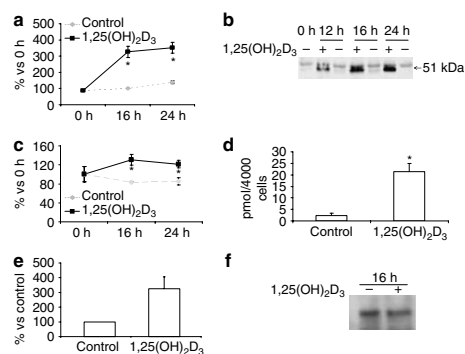


Figure 4 | VDR and VEGF expression and protein levels in VSMCs treated with 1,25(OH)₂D₃. Total RNA was isolated at 0, 16, and 24 h after treatment with or without 100 nM 1,25(OH)₂D₃. Expression levels of (a) VDR, (c) VEGF, and (e) FLT-1 (16 h after 1,25(OH)₂D₃ addition) were analyzed by real-time reverse transcriptase-PCR. Average values and s.e.m. of three independent experiments are shown. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) was used as an internal control. Total protein was isolated from VSMCs treated with or without 100 nM 1,25(OH)₂D₃ at specific time points. A representative Western blot for (b) VDR or (f) FLT-1 is shown. (d) VEGF levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay in the supernatant of control cells and treated with 1,25(OH)₂D₃ (100 nM). Average values and s.e.m. of three independent experiments are shown. **P* < 0.01 vs control.

D₃. No toxic effect was detected in VSMC at the dose used (Figure 5b).

We also incubated VSMC with 1,25(OH)₂D₃ and VEGF-neutralizing antibody. The addition of the antibody eliminated the increase in proliferation induced by 1,25(OH)₂D₃ (Figure 5c).

DISCUSSION

The biological actions of 1,25(OH)₂D₃ are mediated by its specific receptor, the VDR.²⁰ Therefore, to study the effect of 1,25(OH)₂D₃ in VSMCs, first we determined whether VSMCs show a functional and coherent response to vitamin D. It has been described that VDR levels are upregulated by 1,25(OH)₂D₃.²¹ We have found that 1,25(OH)₂D₃ increased VDR mRNA and protein levels in VSMC, indicating that the VDR pathway is fully functional in these cells. The content of VDR is a very important factor in the transcriptional activity in target cells. An increase in VDR number could 'sensitize' vascular cells to vitamin D action, as it occurs in other tissues (parathyroid glands, bowel mucosa, etc.).^{22,23} However, increases in VDR could also stimulate the expression of 24-hydroxylase, the enzyme that initiates the degradation of 1,25(OH)₂D₃, in order to regulate its local concentrations and, therefore, the response to 1,25(OH)₂D₃. In addition, in this work, we have found that 1,25(OH)₂D₃ has a clear proliferative effect. As the first report stating that

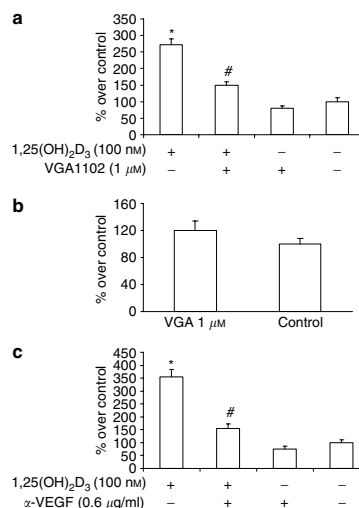


Figure 5 | Effect of VEGF receptor antagonist (VGA1102) and VEGF-neutralizing antibody on proliferation induced by 1,25(OH)₂D₃. VSMCs were cultured in DMEM-0.2% FBS with 100 nM 1,25(OH)₂D₃ and with or without 1 μM VGA1102 or antibody against α-VEGF (0.6 μg/ml). BrdU incorporation was detected with an enzyme-linked immunosorbent assay technique to determine cell proliferation on cells treated with (a) VGA 1102 or antibody against (c) α-VEGF. (b) The effect of 1 μM VGA1102 on cell viability was analyzed using the MTT test. Bars represent means ± s.e.m. of three independent experiments. **P* < 0.01 vs non-treated cells. #*P* < 0.01 vs cells treated with 1,25(OH)₂D₃.

1,25(OH)₂D₃ inhibited proliferation and induced the differentiation of murine myeloid leukemia M1 cells into monocyte macrophages,²⁴ many studies have demonstrated that 1,25(OH)₂D₃ is a potent suppressor of proliferation and an inductor of the differentiation in numerous cell types.^{25,26} However, the few studies aimed at analyzing the effect of 1,25(OH)₂D₃ on VSMC proliferation showed conflicting results, most likely owing to the different experimental conditions used.^{18,27} Furthermore, the discovery of the VDR in VSMC raises new questions about its function in this particular cell type. We have used quiescent cells to prevent saturating effects of other growth factors. Furthermore, no serum was added in the experiment. This is particularly important because it demonstrates that 1,25(OH)₂D₃ alone, in the absence of any other stimuli, is able to induce an increase in VSMC proliferation. Thus, the effect of 1,25(OH)₂D₃ on VSMC proliferation is direct, and independent of serum-related factors.

In a second approach, the effect of 1,25(OH)₂D₃ on the proliferation of VSMC already stimulated to grow was assessed. We found that the effects of 1,25(OH)₂D₃ were

additive to those of bFGF, demonstrating that the effect of 1,25(OH)₂D₃ on VSMC proliferation is not dependent on the status of the cell (quiescent vs not quiescent). Thus, in pathological conditions in which VSMCs are already stimulated to grow, the addition of 1,25(OH)₂D₃ could lead even to a higher increase of the proliferation rate. This could be especially important in patients with CKD, in which treatment with 1,25(OH)₂D₃ is a common medical practice. It is known that patients with CKD have an increase in VSMC proliferation, leading to arterial complications and uremic arteriopathy.⁶ Therefore, treatment with 1,25(OH)₂D₃ could lead to a further stimulus in VSMC proliferation.

In a third approach, we added crescent amounts of serum to the cells stimulated with 1,25(OH)₂D₃. In this case, 1,25(OH)₂D₃ was not able to increase further proliferation rates when cells were strongly stimulated to proliferate by high concentrations of serum. However, 1,25(OH)₂D₃ was able to increase the proliferation rate in cells incubated with lower levels of serum. This could be explained by the fact that cells incubated *in vitro* have a differential uptake of 1,25(OH)₂D₃ compared to that of VSMCs surrounded by an intact arterial structure.

A further evidence of the increase in proliferation induced by 1,25(OH)₂D₃ was obtained by fluorescence-activated cell sorter analysis. Our results indicate that VSMCs enter S phase earlier in the presence of 1,25(OH)₂D₃, suggesting that the higher proliferation rates caused by 1,25(OH)₂D₃ are probably owing to a shortening of the G1 phase.

These *in vitro* results must be taken with caution, because of the absence of inhibitory factors present in the *in vivo* situation, when other cell types are present. However, the proliferative effect of 1,25(OH)₂D₃ has also been demonstrated *ex vivo* in arterial rings and *in vivo* in animals with CKD. This *in vivo* effect could also be an indirect effect mediated by the increase in serum calcium and phosphate levels. Nevertheless, we must point out that the doses used *in vivo* in our experimental settings are higher than the ones used in patients, reflecting the effect of 1,25(OH)₂D₃ overdosing. Extrapolating this effect to the clinical field, 1,25(OH)₂D₃ might be an important mediator of arterial remodelling induced by atherogenic factors, direct injury, uremia, and hemodynamic burden. Furthermore, the fact that VDR is upregulated by 1,25(OH)₂D₃ in VSMC raises new concerns. Thus, if 1,25(OH)₂D₃ is overdosed in chronic renal failure²⁸ or osteoporosis,²⁹ the beneficial effects of the therapy might be shadowed by an increase of the susceptibility of vessels to 1,25(OH)₂D₃-induced proliferation.

The concentration of 1,25(OH)₂D₃ used in this study (5–100 nM) is higher than the normal serum levels, but it falls within the range which induces biological response in other tissues and cell types analyzed *in vitro*.^{18,30–33} Furthermore, in the clinical settings, the levels of 25-hydroxyvitamin D are used to determine the vitamin D status. The normal range of 25-hydroxyvitamin D-circulating levels is 40–180 nM. Thus, knowing that endothelial cells possess the capacity to

transform 25-hydroxyvitamin D in 1,25(OH)₂D₃ and that this activity seems to be only related to substrate availability,¹⁶ we can suggest that local levels at the vascular bed could be much higher than in serum. Furthermore, in renal failure, extrarenal synthesis and degradation of 1,25(OH)₂D₃ seems to be altered. Dusso *et al.*³⁴ demonstrated that macrophages showed an increased synthesis of 1,25(OH)₂D₃ in uremic conditions. Gallieni *et al.*³⁵ showed that monocytes also had an increase 1- α hydroxylase activity in uremia. In addition, Hsu *et al.*³⁶ studied the effect of uremic toxins on 24 and 25 hydroxylase activities. This study concluded that, in uremic conditions, metabolic degradation of 1,25(OH)₂D₃ is decreased. There is no direct evidence that the synthesis of 1,25(OH)₂D₃ by endothelial cells is increased in renal failure. However, it has been published that the synthesis of 1,25(OH)₂D₃ by human endothelial cells is increased by inflammatory cytokines¹⁶ and that in renal failure there is a systemic inflammatory condition with an increase in tumor necrosis factor- α and interleukin-8.^{16,37} In addition, advanced glycation end products, which accumulate in renal failure, increase tumor necrosis factor- α expression in endothelial cells.^{16,38} Thus, in renal failure conditions, the endothelial synthesis of 1,25(OH)₂D₃ could be increased, leading to high local levels.

There is now a consensus that VEGF is crucial in pathological processes both in embryo and in adults. Alterations of VEGF expression have been involved in several pathologies, like tumor growth,³⁹ pre-eclampsia,⁴⁰ etc. Furthermore, a recent paper stated the involvement of VEGF in neointimal proliferation in pig arteries following stent implantation.⁴¹ Also, Parenti *et al.*⁴² demonstrated that VSMC proliferation induced by monocyte chemoattractant protein-1 was mediated by endogenous production of VEGF-A. Taken together, these results show that VSMC can both produce and respond to VEGF. Our results also indicate that 1,25(OH)₂D₃ induces an increase in the expression of VEGF. These results are in agreement with those of Yamamoto *et al.*,⁴³ which showed an increase in VEGF release from a stable line of smooth muscle cells in culture. Furthermore, VSMC express VEGF receptors,⁴⁴ making them a possible target for the effects of VEGF. We also found that the addition of the VEGF receptor-binding antagonist VEGFR1102⁴⁵ or VEGF-neutralizing antibodies blunted the increase in 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) incorporation levels in 1,25(OH)₂D₃-stimulated cells, suggesting that 1,25(OH)₂D₃-induced VSMC proliferation is mediated by VEGF.

The mechanism by which 1,25(OH)₂D₃ increases VEGF production in VSMC is not clear, but the presence of a sequence that resembles the DR3 type of vitamin D-responsive elements⁴⁶ in the promoter of the rat VEGF gene may provide an explanation. Further experiments are needed to determine whether this sequence binds VDR and enhances transcription in a vitamin D-dependent manner.

As VSMCs play a key role in the development of vascular pathologies with great impact on mortality, we found it

necessary to clarify the role of 1,25(OH)₂D₃ on VSMC proliferation. This work demonstrates that VSMCs respond to 1,25(OH)₂D₃ increasing the proliferation rate through a VEGF-mediated pathway, suggesting that vitamin D may be an important mediator of arterial physiopathology. We also showed that treatment with high doses of 1,25(OH)₂D₃ *in vivo* induces an increase in the proliferation of VSMC in animals with a model of chronic renal failure. This suggests that 1,25(OH)₂D₃ overdosing in patients with chronic renal failure could lead to an increase in VSMC proliferation.

Whether this increase in proliferation will be deleterious or beneficial needs further investigation. The increase of VSMC proliferation *in vivo* could be a way of attenuating the apoptotic process observed in high resorptive bone conditions produced with high parathyroid hormone or 1,25(OH)₂D₃ levels. These apoptotic bodies act as inducers of calcium deposition and are the main cause of calcification of the vasculature.⁴⁷ Therefore, the increase in proliferation of the adjacent VSMC could reduce the space occupied by the apoptotic bodies and, thus, the calcified area. This could partly explain the recently reported increase in survival observed in dialysis patients treated with 1,25(OH)₂D₃.⁴⁸ Furthermore, control of VSMC proliferation is only one of the many effects of 1,25(OH)₂D₃ on the vasculature. Therefore, the beneficial effects of 1,25(OH)₂D₃ in the cardiovascular system, like the modulation of hypertension and inflammatory responses, could overcome the potential deleterious effects and provide an overall protection to the patient. Nonetheless, the impact of 1,25(OH)₂D₃ on VSMC proliferation is a potential disadvantage on 1,25(OH)₂D₃ therapy. The use of vitamin D analogs that retain the beneficial effects and have no impact on VSMC proliferation could shed some light on the complex role of vitamin D in the cardiovascular system.

MATERIALS AND METHODS

All the experiments performed in this study followed the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

VSMC culture and extraction of aortic rings

Primary aortic VSMCs of 2-month-old Sprague-Dawley rats were obtained by explants culture as described previously⁴⁹ and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% FBS, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin.

Cells obtained by this method were identified as VSMCs by the following criteria: (1) the cells grew in the characteristic hill and valley pattern and (2) by positive immunostaining for monoclonal anti- α -smooth muscle actin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Primary cultures with less than 95% VSMCs were discarded.

To enrich the population in G0/G1 before each experiment, cells were serum starved for 2 days in DMEM with 0.2% FBS.

In order to obtain the aortic rings, abdominal aortas were extracted from Sprague-Dawley rats and stored in ice-cold sterile phosphate-buffered saline. After three washes with phosphate-

buffered saline and excision of lateral vessels, aortic rings of 2–4 mm wide were cut and placed in culture plates.

CKD animal model

Sprague-Dawley rats were anesthetized with isoflurane and right nephrectomy was performed. After 1 week, animals suffered 2/3 nephrectomy in the left kidney by excision of both poles. Animals with 5/6 nephrectomy were divided into two groups. One group received 1,25(OH)₂D₃ (1 µg/kg three times a week for 8 weeks), whereas the second group received a saline injection. The day before euthanasia, blood and 24 h urine was collected.

After being killed, abdominal aortas were collected, fixed, included in paraffin, and sliced.

Biochemistry data

Blood obtained at the end of the experiment was analyzed for calcium, phosphate, and creatinine levels. Serum and urine biochemistries were analyzed using a multichannel autoanalyzer (Roche/Hitachi Modular Analytics, Somerville, NJ, USA). The method used for creatinine, calcium, and phosphate were the Jaffé reaction, the *o*-cresolphthalein complexone method, and the ammonium molybdate method, respectively.

Analysis of VSMC proliferation

To test whether VSMC growth might be stimulated by 1,25(OH)₂D₃ (Sigma-Aldrich), we analyzed the rate of DNA synthesis by BrdU incorporation and fluorescence-activated cell sorter analysis. VSMCs were serum starved for 48 h and then stimulated with 1,25(OH)₂D₃ at 5, 10, 20, and 100 nM in DMEM-0.2% FBS. In some experiments, the effect of the addition of FBS in the proliferation of VSMC induced by 1,25(OH)₂D₃ was also tested. In some of the wells, we added a new VEGF receptor inhibitor (VGA1102, 1 µM)⁴⁵ and in others we added neutralizing VEGF antibody (0.6 µg/ml; R&D systems, Minneapolis, MN, USA) to eliminate the effect of VEGF in the proliferation induced by 1,25(OH)₂D₃. The possible toxic effect of the VGA1102 in VSMC was tested by MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay.

Also, quiescent cells were stimulated for 24 h with 20 ng/ml bFGF and with or without 1,25(OH)₂D₃ at 5, 10, 20, and 100 nM to test for a possible additive effect in cells already stimulated to proliferate.

Furthermore, aortic rings were incubated for 72 h in DMEM-20% FBS with or without 100 nM of 1,25(OH)₂D₃ and proliferation was assessed by BrdU incorporation.

BrdU incorporation. Cells were cultured in 96-well plates (4×10^3 cells/well) under the conditions described above and incubated with 10 µM BrdU for 6 h. BrdU incorporation into DNA was detected using a commercial kit (Roche Diagnostics, Somerville, NJ, USA).

BrdU incorporation in aortic rings was assessed by immunofluorescence. BrdU was added to the wells 24 h before 1,25(OH)₂D₃ addition. Rings were fixed with 4% paraformaldehyde, included in paraffin, and sliced in 4 µm sections. After blocking, incubation with primary antibody anti-BrdU (1:200; DakoCytomation, Glostrup, Denmark) was performed overnight at 4°C. Secondary antibody (1:200; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) was added for 1 h at room temperature. Slides were mounted with antifade (Molecular Probes) and 1% Hoechst-33342 and visualized using a fluorescence microscope (LEICA Microsystems DFC 480). Proliferation rates were determined as the percentage of positive nuclei for BrdU per total nuclei.

Ki67 immunofluorescence. Immunofluorescence was performed as described above. Primary antibody anti-Ki67 (NeoMarkers, Fremont, CA, USA) was used at a 1:200 dilution and secondary antibody was used in a 1:200 dilution.

Fluorescence-activated cell sorter analysis. Cells were cultured in six-well plates (2×10^5 cells/well) with 20 ng/ml bFGF and with or without 1,25(OH)₂D₃ 100 nM. After 16 or 22 h, cells were trypsinized and fixed with 70% ethanol overnight at 4°C. Ethanol was removed and cells were incubated in 1 mg/ml RNase for 30 min at 37°C, and then stained for 30 min with 50 µg/ml propidium iodide. Cell fluorescence distributions were obtained using an Epics XL flow cytometer (Coulter, Fullerton, CA, USA).

MTT analysis. VSMC were incubated with 1 µM VEGF1102 for 24 h. Then, 100 µl of 0.5 g/l MTT solution was added. Cells were incubated at 37°C for 45–60 min, and thereafter, 100 µl of 20% sodium dodecyl sulfate in *N,N*-dimethylformamide:H₂O 1:1 solution was added. Plates were incubated overnight at 37°C and absorbances were measured at 570 nm. The levels in the control wells were designated as 100% viability.

Analysis of gene expression levels in VSMCs

Real-time PCR analysis. Total cellular RNA was extracted using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and reverse transcription was performed with a first-strand DNA synthesis Kit for reverse transcriptase-PCR (Roche Diagnostics). We used the Taqman real-time PCR method. The forward, reverse, and Taqman middle primers for rat VEGF, VDR, FLT-1, FLK-1, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase were purchased from Applied Biosystems. Each real-time PCR reaction was performed using 0.5 µg total RNA. For reverse transcription, a 1 h period at 42°C was run before inactivating the reverse transcriptase at 99°C for 10 min. Forty cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min were performed with an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). All experiments were carried out three times; triplicate readings were taken; and the average was calculated. The relative RNA amount was calculated by standard formulae. Average and s.e. from three experiments were calculated.

Western blot and ELISA analysis. Western blot analysis of cell and aortic extracts were performed as described previously.⁵⁰ We used 20 µg of total protein per well or, in the case of FLT-1, 1 mg of total protein was immunoprecipitated as described previously.⁵¹ After boiling 5 min in 1 × loading buffer (0.06 M Tris-Cl, pH 6.8, 2% sodium dodecyl sulfate, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 0.002% bromophenol blue) samples were loaded in sodium dodecyl sulfate gels. After running, transfer to polyvinylidene fluoride membranes (Millipore), and blocking blots were incubated with primary antibody for VDR (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), FLT-1 or FLK-1 (Neomarkers). After washing with Tris-buffered saline with 0.1% Tween, horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:12500; Amersham Biosciences, Fairfield, CT, USA) was added for an extra hour. Binding was detected with the ECLTM Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences) and the VersaDoc Imaging system Model 4000 (BioRad). Signals were quantified with the Quantity One software (BioRad, Hercules, CA, USA).

Levels of VEGF were determined in culture media supernatants of control cells and cells treated with 1,25(OH)₂D₃ (100 nM) with a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (R&D Systems).

Statistical analysis

Differences between means of two groups were assessed by Student's *t*-test. For three or more groups, we performed a one-way analysis of variance. A *P* < 0.05 was considered statistically significant.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by grants from 'Fundació Marató de TV3' no. 003310, 'Fondo de Investigaciones Sanitarias' CP03/00055, and 'Sociedad Española de Nefrología' PI 1/00. Elvira Fernandez and Jose M Valdivielso are senior co-authors. We thank Taisho Pharmaceuticals for the kind donation of VEGF1102.

REFERENCES

- Raine AEG, Margreiter R, Brunner FP *et al.* Report on management of renal-failure in Europe, Xxii, 1991. *Nephrol Dial Transplant* 1992; **7**: 7–35.
- Levin A. Cardiac disease in chronic kidney disease: current understandings and opportunities for change. *Blood Purif* 2004; **22**: 21–27.
- Amann K, Rychlik I, Miltenberger-Milteny G *et al.* Left ventricular hypertrophy in renal failure. *Kidney Int* 1998; **54**: S78–S85.
- Foley RN, Parfrey PS. Anemia in predialysis chronic renal failure: what are we treating? *J Am Soc Nephrol* 1998; **9**: S82–S84.
- Lindner A, Charra B, Sherrard DJ *et al.* Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. *N Engl J Med* 1974; **290**: 697–701.
- Amann K, Wolf B, Nichols C *et al.* Aortic changes in experimental renal failure – hyperplasia or hypertrophy of smooth muscle cells? *Hypertension* 1997; **29**: 770–775.
- Essary LR, Wick MR. Cutaneous calciphylaxis – an underrecognized clinicopathologic entity. *Am J Clin Pathol* 2000; **113**: 280–287.
- London GM. Left ventricular hypertrophy: why does it happen? *Nephrol Dial Transplant* 2003; **18**: 2–6.
- Berk BC. Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol Rev* 2001; **81**: 999–1030.
- Speer MY, Giachelli CM. Regulation of cardiovascular calcification. *Cardiovasc Pathol* 2004; **13**: 63–70.
- Parhami F, Bostrom K, Watson K *et al.* Role of molecular regulation in vascular calcification. *J Atheroscler Thromb* 1996; **3**: 90–94.
- Rajasree S, Rajpal K, Kartha CC *et al.* Serum 25-hydroxyvitamin D-3 levels are elevated in South Indian patients with ischemic heart disease. *Eur J Epidemiol* 2001; **17**: 567–571.
- Bajwa GS, Morrison LM, Ershoff BH. Induction of aortic and coronary athero-arteriosclerosis in rats Fed A Hypervitaminosis-D, cholesterol-containing diet. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971; **138**: 975.
- Liu LB, Taylor CB, Peng SK *et al.* Experimental arteriosclerosis in rhesus-monkeys induced by multiple risk-factors – cholesterol, vitamin-D, and nicotine. *Paroi Arterielle-Arterial Wall* 1979; **5**: 25–31.
- Merke J, Milde P, Lewicka S *et al.* Identification and regulation of 1,25-dihydroxyvitamin-D₃ receptor activity and biosynthesis of 1,25-dihydroxyvitamin-D₃ – studies in cultured bovine aortic endothelial-cells and human dermal capillaries. *J Clin Invest* 1989; **83**: 1903–1915.
- Zehnder D, Bland R, Chana RS *et al.* 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* 2002; **13**: 621–629.
- Rebsamen MC, Sun JX, Norman AW *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D-3 induces vascular smooth muscle cell migration via activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Circ Res* 2002; **91**: 17–24.
- Maccarthy EP, Yamashita W, Hsu A *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin-D₃ and rat vascular smooth-muscle cell-growth. *Hypertension* 1989; **13**: 954–959.
- Koh E, Morimoto S, Fukuo K *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin-D₃ binds specifically to rat vascular smooth-muscle cells and stimulates their proliferation *in vitro*. *Life Sci* 1988; **42**: 215–223.
- Minghetti PP, Norman AW. 1,25(OH)₂-vitamin-D₃ receptors – gene-regulation and genetic circuitry. *FASEB J* 1988; **2**: 3043–3053.
- Beckman MJ, Horst RL, Reinhardt TA *et al.* Up-regulation of the intestinal 1,25-dihydroxyvitamin-D receptor during hypervitaminosis-D – a comparison between vitamin-D₂ and vitamin-D₃. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **169**: 910–915.
- Cross HS, Bareis P, Hofer H *et al.* 25-Hydroxyvitamin D(3)-1α-phosphohydroxylase and vitamin D receptor gene expression in human colonic mucosa is elevated during early cancerogenesis. *Steroids* 2001; **66**: 287–292.

23. Yano S, Sugimoto T, Tsukamoto T *et al.* Decrease in vitamin D receptor and calcium-sensing receptor in highly proliferative parathyroid adenomas. *Eur J Endocrinol* 2003; **148**: 403-411.
24. Miyaoura C, Abe E, Suda T. Extracellular calcium is involved in the mechanism of differentiation of mouse myeloid-leukemia cells (M1) induced by 1-alpha,25-dihydroxyvitamin-D₃. *Endocrinology* 1984; **115**: 1891-1896.
25. Weinreich T, Muller A, Wuthrich RP *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D-3 and the synthetic vitamin D analogue, KH 1060, modulate the growth of mouse proximal tubular cells. *Kidney Blood Pressure Res* 1996; **19**: 325-331.
26. Ylikomi T, Laaksi I, Lou YR *et al.* Antiproliferative action of vitamin D. *Vitamins Hormones – Adv Res Appl* 2002; **64**: 357-406.
27. Mitsuhashi T, Morris RC, Ives HE. 1,25-Dihydroxyvitamin-D₃ modulates growth of vascular smooth-muscle cells. *J Clin Invest* 1991; **87**: 1889-1895.
28. Fernandez E, Llach F. Guidelines for dosing of intravenous calcitriol in dialysis patients with hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant* 1996; **11**: 96-101.
29. Kitchin B, Morgan S. Nutritional considerations in osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* 2003; **15**: 476-480.
30. Brown AJ, Ritter C, Siatopolsky E *et al.* 1 Alpha,25-dihydroxy-3-epi-vitamin D-3, a natural metabolite of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3, is a potent suppressor of parathyroid hormone secretion. *J Cell Biochem* 1999; **73**: 106-113.
31. Canalejo A, Almaden Y, Torregrosa V *et al.* The *in vitro* effect of calcitriol on parathyroid cell proliferation and apoptosis. *J Am Soc Nephrol* 2000; **11**: 1865-1872.
32. Cordero JB, Cozzolino M, Lu Y *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D down-regulates cell membrane growth- and nuclear growth-promoting signals by the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 2002; **277**: 38965-38971.
33. Finch JL, Dusso AS, Pavlopoulos T *et al.* Relative potencies of 1,25-(OH)₂D-3 and 19-Nor-1,25-(OH)₂D-2 on inducing differentiation and markers of bone formation in MG-63 cells. *J Am Soc Nephrol* 2001; **12**: 1468-1474.
34. Dusso AS, Finch J, Brown A *et al.* Extrarenal production of calcitriol in normal and uremic humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; **72**: 157-164.
35. Gallieni M, Kamimura S, Ahmed A *et al.* Kinetics of monocyte 1-alpha-hydroxylase in renal-failure. *Am J Physiol – Renal Physiol* 1995; **37**: F746-F753.
36. Hsu CH, Patel SR, Young EW. Mechanism of decreased calcitriol degradation in renal-failure. *Am J Physiol* 1992; **262**: F192-F198.
37. Mezzano D, Pais EO, Aranda E *et al.* Inflammation, not hyperhomocysteinemia, is related to oxidative stress and hemostatic and endothelial dysfunction in uremia. *Kidney Int* 2001; **60**: 1844-1850.
38. Rashid G, Benchetrit S, Fishman D *et al.* Effect of advanced glycation end-products on gene expression and synthesis of TNF-alpha and endothelial nitric oxide synthase by endothelial cells. *Kidney Int* 2004; **66**: 1099-1106.
39. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 795-803.
40. Maynard SE, Min JY, Merchan J *et al.* Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003; **111**: 649-658.
41. Shibata M, Suzuki H, Nakatani M *et al.* The involvement of vascular endothelial growth factor and flt-1 in the process of neointimal proliferation in pig coronary arteries following stent implantation. *Histochem Cell Biol* 2001; **116**: 471-481.
42. Parenti A, Bellik L, Brogelli L *et al.* Endogenous VEGF-A is responsible for mitogenic effects of MCP-1 on vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol – Heart Circ Physiol* 2004; **286**: H1978-H1984.
43. Yamamoto T, Kozawa O, Tanabe K *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D-3 stimulates vascular endothelial growth factor release in aortic smooth muscle cells: role of p38 mitogen-activated protein kinase. *Arch Biochem Biophys* 2002; **398**: 1-6.
44. Ishida A, Murray J, Saito Y *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 2001; **188**: 359-368.
45. Ueda Y, Yamagishi T, Samata K *et al.* A novel low molecular weight VEGF receptor-binding antagonist VEGFR1102, inhibits the function of VEGF and *in vivo* tumor growth. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; **54**: 16-24.
46. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA *et al.* The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* 1998; **13**: 325-349.
47. Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L *et al.* Apoptosis regulates human vascular calcification *in vitro* – evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res* 2000; **87**: 1055-1062.
48. Teng M, Wolf M, Ofsthun MN *et al.* Activated injectable vitamin D and hemodialysis survival: a historical cohort study. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**: 1115-1125.
49. Pickering JG, Weir L, Rosenfield K *et al.* Smooth-muscle cell outgrowth from human atherosclerotic plaque – implications for the assessment of lesion biology. *J Am Coll Cardiol* 1992; **20**: 1430-1439.
50. Valdivielso JM, Perez-Barriocanal F, Garcia-Estan J *et al.* Role of nitric oxide in the early renal hemodynamic response after unilateral nephrectomy. *Am J Physiol – Regul Integr Comp Physiol* 1999; **276**: R1718-R1723.
51. Deng AH, Valdivielso JM, Munger KA *et al.* Vasodilatory N-methyl-D-aspartate receptors are constitutively expressed in rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**: 1381-1384.

A Forgotten Method to Induce Experimental Chronic Renal Failure in the Rat by Ligation of the Renal Parenchyma

Luis Perez-Ruiz^a Susana Ros-Lopez^a Anna Cardús^b Elvira Fernandez^b
Jose M. Valdivielso^b

^aSurgery Department and ^bNephrology Department, Hospital Universitario Arnau de Vilanova, Laboratorio de Investigación UDL-HUAV, Lleida, Spain

Key Words

Chronic renal failure · Experimental 5/6 nephrectomy · Renal mass reduction

Abstract

Background: Animal models of chronic renal failure have been widely used in the experimental nephrology laboratories. The most common technique used is the 5/6 reduction of renal mass, either by surgical resection or by infarction. **Methods:** In the present work, we describe a forgotten technique based in the ligation of the renal parenchyma in both renal poles. This technique combines the advantages of the resection model, like the reproducibility and homogeneity, with the ones of the infarction technique, like the absence of bleeding. **Results:** 8 weeks after the procedure, animals showed a decrease in creatinine clearance together with an increase in plasma creatinine. Furthermore, glomeruli of animals with 5/6 nephrectomy showed a marked hypertrophy, with a glomerular volume significantly higher than control animals. Serum levels of parathyroid hormone were also increased, consistent with the development of secondary hyperparathyroidism. **Conclusions:** We conclude that the present technique is a valid and improved tool for the study of chronic renal failure.

Copyright © 2006 S. Karger AG, Basel

Introduction

In a scientific arena where the advances in molecular and cellular biology have somehow eclipsed the whole animal studies, the use of in vivo models is still an important tool for the study of human pathologies. In the renal area, models that mimic the most common renal affections are used constantly. Several laboratory models of chronic renal failure have been described in the literature and, among them, the most commonly used is the 5/6 nephrectomy model. The 5/6 nephrectomy is achieved by unilateral nephrectomy and either surgical resection of the two poles of the contralateral kidney [1] or ligation of some of the renal artery branches just before the entrance in the renal parenchyma [2]. Each one of them has certain difficulties making them unavailable for some investigators. On the one hand, ligation of the renal artery branches is technically complicated and gives heterogeneous results due to anatomical variations of the renal artery among different rats [3]. Thus, this approach is rarely used by researchers who usually choose the resection method. On the other hand, surgical resection of the poles gives more reproducible results, but presents the risk of hemorrhage [4] and a higher probability of death due to surgical complications. This is especially important now, when the scientific community is under increasing pressure to minimize the use of laboratory animals.

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2006 S. Karger AG, Basel
1660-2129/06/0000-0000\$23.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/nee

Jose M. Valdivielso, PhD
Laboratorio de Investigación UDL-HUAV, Rovira Roure 80
ES-■ ■ ■ ■ Lleida (Spain)
Tel. +34 97324 8100/ext. 2686, Fax +34 97370 2435
E-Mail valdivielso@medicina.udl.es

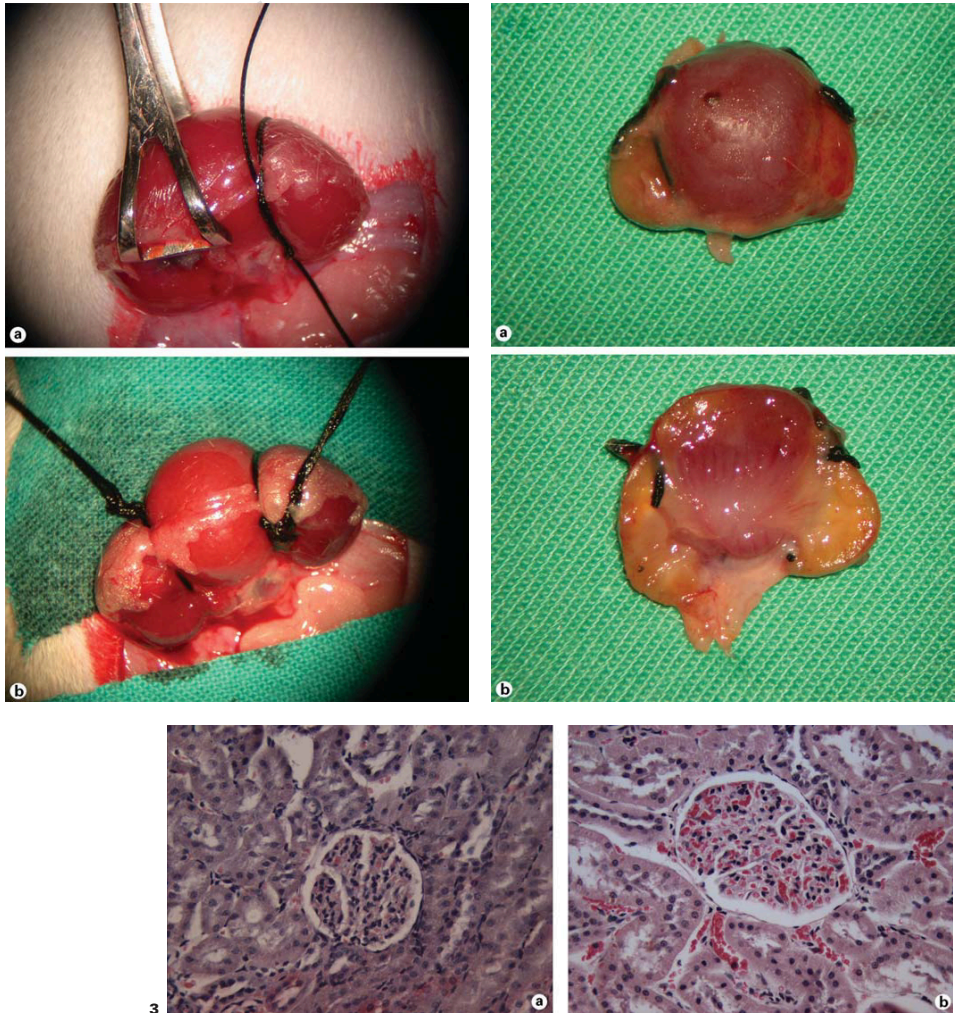


Fig. 1. a Ligation of the poles of the kidney. A thick thread should be placed in the upper and lower poles of the kidney, perpendicular to the longest axis. **b** After tightening the threads, achievement of the ischemia can be observed by changes in the kidney color.

Fig. 2. a Macroscopic view of the kidney 8 weeks after ligation of the poles. Atrophy of the poles and hypertrophy of the remaining 1/3 of the kidney is observed. **b** Longitudinal section of the same kidney.

Fig. 3. a Microscopic view of a glomeruli from a control rat. **b** Microscopic view of a glomeruli from a rat with 5/6 renal mass reduction. $\times 400$.

In the present paper, we describe a method for the 5/6 nephrectomy model. It combines the homogeneity and lack of technical difficulty of the resection technique with the better survival of the infarction technique, making it an ideal method for the study of chronic renal failure.

Methods

Sprague-Dawley rats (225 g) were anesthetized with isoflurane. The anesthetized rat is placed on its ventral surface and a dorso-ventral incision is made into the abdominal cavity. The right kidney localized by palpation and pulled out of the abdominal cavity. The kidney then is freed of connective tissue and removed after ligation of the renal pedicle.

One week after the unilateral nephrectomy, the subtotal nephrectomy of the contralateral kidney is performed. First, we should eliminate the connective tissue with special care in the upper pole to avoid damage to the adrenal gland. Then, two surgical threads are placed at both poles of the kidney perpendicular to the major axis. The ligatures should be placed next to the renal pedicle and in a parallel way one to another (fig. 1a). Special care should be taken to leave the ureter free of the ligature. Then, the ligatures must be heavily compressed, but without sectioning the kidney so a thick thread must be used (3/0). The achievement of the ischemia can be assessed by the change of color in the poles of the kidney (fig. 1b). Thus, we can visually monitor that 1/3 of the remaining kidney is left functioning, whereas the other 2/3 are annulated after suppression of both, its blood supply and its intrarenal excretory pathways.

Eight weeks after the 5/6 nephrectomy was performed, animals were placed in metabolic cages and 24-hour urine, free of food and feces, was collected. At the end of the 24-hour period, animals were euthanized and blood and kidneys were collected and fixed in 4% formaldehyde. After inclusion in paraffin and slicing, 4 μ m sections were dyed with the hematoxylin-eosin technique. A group of sham-operated animals was used as control. A computer-assisted morphometric unit (IM50, Leica, Heerbrugg, Schweiz) was used to measure the mean glomerular cross-sectional areas of at least 50 glomeruli contained in one kidney section in each animal. The mean volume (Vg) of the glomeruli was calculated from the respective mean glomerular area (Ag) as: $Vg = \beta/k (Ag^{3/2})$ where $\beta = 1.38$ is the size-distribution coefficient and $\kappa = 1.1$ is the shape coefficient for glomeruli idealized as a sphere [5].

Blood samples were used to biochemistry analysis. Electrolytes and creatinine were measured in an automated system (Modular Analytics, Roche, Barcelona, Spain). Serum iPTH levels were measured by ELISA (Immutopics, ■■■■).

Differences between means of two groups were assessed by Student's t test. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

In figure 2a, we show a macroscopic view of the kidneys 8 weeks after ligation of the poles. As we can see, both poles are atrophic and the remaining functional 1/3

Table 1. Renal function parameters

	Control	5/6 nephrectomy
Mean arterial pressure, mm Hg	106 \pm 2.8	88 \pm 3.6
Urine volume, ml/day	15.3 \pm 2.1	15.4 \pm 3.4
Plasma creatinine, mg/dl	0.47 \pm 0.01	0.7 \pm 0.01*
Creatinine clearance, ml/min	1.51 \pm 0.18	0.80 \pm 0.08*
Serum calcium, mg/dl	10.42 \pm 0.09	11.02 \pm 0.14*
Serum phosphate, mg/dl	8.15 \pm 0.28	6.24 \pm 0.34*
Serum potassium, mEq/l	5.80 \pm 0.19	5.16 \pm 0.26
Serum sodium, mEq/l	137.41 \pm 0.82	138.60 \pm 0.98
Urinary excretion of albumin, mg/day	0.09 \pm 0.03	0.68 \pm 0.03*
Glomerular volume, $\mu\text{m}^{-3} \times 10^{-6}$	0.88 \pm 0.06	1.67 \pm 0.24*
iPTH levels, pg/ml	37 \pm 5	151 \pm 27*

* $p < 0.01$ vs. control.

has suffered a hypertrophic process. These findings are confirmed in figure 2b, where we can see a macroscopic view of a longitudinal section of the kidney.

In the figure 3, we can see a picture of a glomerulus from a control rat and from a rat with renal mass reduction. The glomerular volume of rats with 5/6 renal mass reduction is presented in table 1, showing a significant increase 8 weeks after the procedure.

We also studied the effects of the technique on renal function. As is shown in table 1, ligation of the poles induced a significant decrease in creatinine clearance compared with controls, suggesting the development of renal failure. Mean blood pressure did not suffer a statistically significant change. Serum levels of iPTH were significantly increased in animals with 5/6 nephrectomy. Serum calcium significantly increased and serum phosphorus decreased in animals with 5/6 renal mass reduction. The other electrolytes measured did not change with reduction of renal mass. Furthermore, the urinary excretion of albumin, a marker of glomerular damage, was increased in animals with 5/6 nephrectomy.

Discussion

In the present paper, we describe an improvement of the technique of 5/6 nephrectomy used widely in experimental nephrology. The technique mimics the reduction in functional renal mass observed in patients with chronic renal failure. As we stated in the introduction, each one of the two approaches used to eliminate 2/3 of the rem-

nant kidney has some limitations. The ligation of artery branches is a complicated technique which requires special equipment (like magnifying lenses). Furthermore, the heterogeneity of the arterial tree makes this technique inaccurate. In a recent paper, Liu et al. [3] compared the two current models of 5/6 renal mass reduction and found a bigger degree of variation in the infarction model. In that paper, they show that the variation in creatinine clearance in the infarction model ranged from 0.3 to 75% of the normal values. These values showed animals with severe renal failure together with some others in which creatinine clearance was almost normal.

The pole resection model, in contrast to the artery ligation model, is more accurate with respect to the amount of renal mass eliminated. In this model, both of the renal poles are eliminated by resection. The downside of the model is the high probability of death due to the technique and the length of the procedure, due to the fact that stopping the bleeding takes a long time. The kidney is a highly irrigated organ and surgical resection of the poles creates a very important bleeding wound in the renal parenchyma. Furthermore, even if the bleeding is controlled, cutting off the renal pole may damage the renal calices, allowing filtered urine to flow freely to the peritoneum.

Furthermore, some functional differences have been described between the two methods which can interfere with the interpretation of the results. Griffin et al. [6] demonstrated that hypertension was developed only in animals with renal mass reduction due to infarction but not in animals with resection of the poles. In our model, no hypertension developed 8 weeks after the reduction of renal mass.

A third approach was described several years ago by Kumano et al. [7] by cryosurgery of the renal parenchyma. The technique eliminated the risk of hemorrhage by freezing the renal parenchyma and achieved a stable and reproducible level of renal failure. However, the main disadvantage was the need of special equipment which made the technique unavailable for some investigators.

The achievement of the chronic renal failure was confirmed by the reduction in the creatinine clearance in the animals with 5/6 renal mass reduction. The decrease in creatinine clearance was about 50%, which will correspond to a stage 3 in chronic kidney disease patients. As we can see in figure 3 and table 1, glomerular volume increased in animals with 5/6 renal mass reduction respect to the control animals. This glomerular hypertrophy is one of the primary factors involved in progression to end-stage renal disease and is consisted with data observed by

other investigators [6, 8]. Furthermore, urinary excretion of albumin, another marker of kidney disease, also increased in the animals with 5/6 renal mass reduction.

At the end of the experiment, PTH levels were elevated as a result of the development of secondary hyperparathyroidism (2HPT), a typical finding in animals with renal mass reduction [9]. Phosphorus levels decreased in animals with 5/6 nephrectomy in parallel with a slight increase in calcium levels. Increases in serum calcium are not typically found in 2HPT. It is widely accepted that a decrease in serum calcium plays a role in the development of 2HPT. However, Lopez-Hilker et al. [10] demonstrated that a decrease in calcium is not necessary, and that some other factors may be involved. Furthermore, increases in serum calcium in animals with 2HPT have been described before [11]. In addition, strategies that reduce the phosphorus levels (low phosphorus diet) will increase serum calcium levels. In our study, we used a typical diet with no phosphorus restriction. Therefore, the decrease in phosphorus, and the parallel increase in calcium, was not induced by the diet. Thus, this model could reflect a different progression of the development of 2HPT and could be useful to further characterize its development.

In conclusion, the technique presented in this paper eliminates the weakness and combines the advantages of the techniques used so far. To the advantages stated previously, we should add the easiness of the technique, with a short learning period, the use of common and cheap material and the quickness of the process, which eliminates surgical complications due to excessive manipulation. For all these reasons, we believe that the method of 5/6 renal mass reduction by ligation of renal parenchyma could be a useful tool in the study of chronic renal affections.

References

- 1 Shimamura T, Morrison AB: Progressive glomerulosclerosis occurring in partial 5/6 nephrectomized rats. *Am J Pathol* 1975;79:95-106.
- 2 Purkerson ML, Hoffsten PE, Klahr S: Pathogenesis of glomerulopathy associated with renal infarction in rats. *Kidney Int* 1976;9:407-417.
- 3 Liu ZC, Chow KM, Chang TMS: Evaluation of two protocols of uremic rat model: partial nephrectomy and infarction. *Renal Failure* 2003;25:935-943.
- 4 Boudet J, Man NK, Pils P, Sausse A, Funck-brentano JL: Experimental chronic renal-failure in rat by electrocoagulation of renal cortex. *Kidney Int* 1978;14:82-86.
- 5 Miller PL, Rennke HG, Meyer TW: Glomerular hypertrophy accelerates hypertensive glomerular injury in rats. *Am J Physiol* 1991;261:F459-F465.
- 6 Griffin KA, Picken M, Bidani AK: Method of renal mass reduction is a critical modulator of subsequent hypertension and glomerular injury. *J Am Soc Nephrol* 1994;4:2023-2031.
- 7 Kumano K, Kogure K, Tanaka T, Sakai T: A new method of inducing experimental chronic-renal-failure by cryosurgery. *Kidney Int* 1986;30:433-436.
- 8 Brenner BM: Nephron adaptation to renal injury or ablation. *Am J Physiol* 1985;249:F324-F337.
- 9 Sancho JJ, Duh QY, Oms L, Sitgeserra A, Hammond ME, Arnaud CD, Clark OH: A new experimental model for secondary hyperparathyroidism. *Surgery* 1989;106:1002-1008.
- 10 Lopezhilker S, Galceran T, Chan YL, Rapp N, Martin KJ, Slatopolsky E: Hypocalcemia may not be essential for the development of secondary hyperparathyroidism in chronic-renal-failure. *J Clin Invest* 1986;78:1097-1102.
- 11 Peerce BE, Weaver L, Clarke RD: Effect of 2'-phosphophloretin on renal function in chronic renal failure rats. *Am J Physiol* 2004;287:F48-F56.

— |

| —

— |

| —

DIFFERENTIAL CARDIOVASCULAR EFFECTS OF CALCITRIOL AND PARICALCITOL

Running Headline: Vitamin d analogues and the vasculature

Subject: Mineral metabolism and bone disease

Anna Cardús¹, Sara Panizo¹, Eva Parisi¹, Elvira Fernandez^{1,2}, Jose M Valdivielso²

¹Department of Medicine University of Lleida. ²Research Laboratory, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, Spain.

Correspondence to: Dr. Jose M Valdivielso, Laboratorio de Investigación HUAV-UDL. Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Rovira Roure 80, 25198 Lleida, Spain.

Phone +34-973-702212, fax +34-973-702435,

e-mail: Valdivielso@medicina.udl.es

Word count: 3222

Abstract

In the present work we compared the effects of calcitriol and its analogue paricalcitol on vascular smooth muscle cells. Calcitriol increased calcification of vascular smooth muscle cells cultured in calcification media. This effect was not present when cells were incubated with paricalcitol. Animals with renal failure treated with hypercalcemic doses of calcitriol and paricalcitol showed an increase in systolic blood pressure. However, diastolic blood pressure only raised significantly in the animals treated with paricalcitol. This effect led to a significant increase in pulse pressure in animals treated with calcitriol. The increase in pulse pressure was likely due to the extensive calcification observed in arteries of animals treated with calcitriol. This increase in calcification was not seen in arteries of animals treated with paricalcitol, despite to have similar levels of serum calcium and phosphorus than animals treated with calcitriol. Furthermore, the decreases in serum PTH levels were similar with both treatments. We conclude that paricalcitol has a different effect than calcitriol in vascular smooth muscle cells calcification and that this could explain part of the differences observed in the clinical settings.

Key Words: Calcitriol, paricalcitol, vitamin D, calcification, proliferation

INTRODUCTION

In chronic kidney disease (CKD), high circulating levels of parathyroid hormone (PTH) cause several complications that increase morbidity and mortality. Impaired production of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol), is a major contributor to the generation and maintenance of parathyroid hyperplasia and to the increased synthesis and secretion of PTH. Calcitriol represses both parathyroid cell proliferation and PTH synthesis (1). Furthermore, the absence of calcitriol could further stimulate the development of secondary hyperparathyroidism (2HPT) indirectly through decreased calcium absorption. This will lead to hypocalcemia which is a very strong stimulus for rapid synthesis and release of PTH (1;2). Thus, calcitriol treatment in patients with moderate renal failure is the therapy of choice in order to revert the 2HPT and normalize PTH levels.

Treatment with calcitriol to stop the progression of 2HPT has been extensively used in the last years. Its effectiveness has been recently demonstrated in a paper showing a clear improvement of survival in renal patients (3). However, one of its main problems is the appearance of unwanted secondary effects which will shadow the benefits of a reduction of PTH levels. One of the more common side effects is the appearance of hypercalcemic episodes (4). High serum levels of calcium-phosphorus product are associated with increases in soft tissue calcifications and can even lead to cardiac arrest (5). Therefore, the search for calcitriol analogues with smaller effect in serum calcium levels and similar effect on PTH release, uncovered new therapeutics agents. One of the analogues of calcitriol used to treat 2HPT is the 19-Nor-1,25(OH)₂D₂ (paricalcitol). In previous studies it was demonstrated that

paricalcitol is three times less effective in suppressing PTH levels but 10 times less potent in increasing calcium absorption in the gut (6-8). Therefore, the therapeutic window for paricalcitol seems to be bigger than the one for calcitriol. Furthermore, a retrospective analysis of renal patients treated either with calcitriol or paricalcitol showed that the treatment with paricalcitol was associated with an even better survival (9). However, the advantages of the treatment with paricalcitol seemed not to be related to calcium metabolism, but to some other effects of the vitamin D.

The so called non-classical effects of vitamin D are a group of different effects not related to mineral metabolism. Among them we can find effects on the immune system, cell proliferation, insulin secretion, etc (1). The discovery of VDR in vascular smooth muscle cells (VSMC) (10) and endothelial cells (EC) (11) raised the possibility that the vascular wall is a target for vitamin D actions. The fact that the vasculature is not directly implicated in mineral metabolism points to a non classical effect of vitamin D in the vascular bed. It is known that patients with CKD and dialysis patients have an accelerated atheromatous process with increased VSMC proliferation and calcification of the vessels (12), but the mechanisms involved are poorly understood. Furthermore, the risk of cardiovascular mortality in the dialysis population has been shown to be 10-30 fold higher than in the general population due to pathological changes in the vessels and heart (13;14). Thus, the use of treatments that could further increase the calcification processes in the vessel is not recommended. Here we compare the effects of calcitriol with those of paricalcitol *in vitro*, and in an *in vivo* model of chronic renal failure in order to determine the effects of both compounds in vascular biology.

MATERIAL AND METHODS

All the experiments performed in this study followed the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

In vitro studies

Primary rat aortic VSMCs of Sprague-Dawley rats were obtained as described previously by Pickering et al (16) and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Cells were incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

Cells obtained by this method were identified as VSMCs by the following criteria: the cells grew in the characteristic hill and valley pattern; and by positive immunostaining for monoclonal anti smooth muscle α -actin.

To enrich the population in G0/G1, cells were serum-starved for 2 days in DMEM supplemented with 0.2% FBS before each experiment. All the experiments were performed in triplicate. In each experiment, at least 8 wells were used per condition.

Analysis of VSMC proliferation

To compare the differences in VSMC proliferation between calcitriol or paricalcitol treatment, we analyzed the rate of DNA synthesis of quiescent cells incubated for 48 hours with crescent concentrations (10-300 nM) of calcitriol or paricalcitol.

DNA synthesis was assessed by the level of 5-Bromo-2'-deoxy-uridine incorporation (BrdU Labeling and Detection Kit III, Roche). Cells were cultured in 96-well plates ($4 \cdot 10^3$ cells/well) under the conditions described above and incubated with 10 μ M BrdU for 6 h prior to fixation.

Analysis of VSMC calcification

To compare the differences in VSMC proliferation between calcitriol or paricalcitol treatment, we analyzed the rate of calcium incorporation of quiescent cells incubated for 5 days with 100 nM of calcitriol or paricalcitol. Briefly, BVSMCs were cultured in the growing medium. After confluence, the cells were inoculated for 5 days in DMEM (high glucose, 4.5 g/L) containing 15% FBS and 10 mmol/L sodium pyruvate in the presence of 10 mmol/L β -GP supplemented with 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin (calcification medium). Quantification of calcium deposits and Von Kossa staining were performed as previously described (17) (18).

Statistical Analysis

Differences between groups were assessed by ANOVA. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Ex vivo studies

Lower aortas were extracted from Sprague-Dawley rats and stored in ice-cold sterile PBS. After three washes with PBS and excision of lateral vessels, aortic rings of 2 to 4 mm wide were cut and placed in culture plates.

We placed 2-3 rings per well in 6-well plates and we used 10 explants

per condition. Explants were allowed to adhere to the plate for 5 days prior to addition of experimental agents. $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ or paricalcitol at 100nM were added (day 1) and the medium changed every three days. $10\mu\text{M}$ BrdU was added 24 h prior to the end of the experiment on day 9. Explants were fixed with 4% paraformaldehyde, paraffin embedded and sliced in $4\mu\text{m}$ sections.

Analysis of VSMC proliferation

To analyze the proliferation rate we performed immunofluorescence localization for BrdU incorporated in aortic rings. After blocking the unspecific binding, incubation with primary antibodies anti BrdU (1:100, DakoCytomation) and anti α -actin (1:50, Sigma) was performed overnight at 4°C . After washing with PBS, secondary antibodies (1:200, Molecular Probes) were added for 1 h at r.t. Slides were mounted with anti fade (Molecular Probes) and 1% Hoechst-33342. Slides were visualized using a fluorescence microscope (LEICA Microsystems DFC 480) and proliferation rates were determined as percentage of positive nuclei for BrdU per total nuclei. Staining for α -actin was used as control for VSMC phenotype.

In vivo studies

Sprague-Dawley rats (200-225 g) were anesthetized with Isoflurane and right nephrectomy was performed. After 1 week, animals suffered 2/3 nephrectomy in the left kidney by ligation of both poles. Animals with 5/6 nephrectomy were divided in three groups. One group received calcitriol ($1\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 times a week for 8 weeks, $n=8$), another group received paricalcitol ($3\mu\text{g}/\text{Kg}$ 3 times a week for 8 weeks, $n=8$) whereas the third group received a

vehicle injection (n=9). During the last week, systolic (SAP) and diastolic arterial pressure (DAP) were measured by the tail-cuff method (LSI Letica, Barcelona). At sacrifice, a blood sample was extracted and blood biochemistry data were obtained. After sacrifice, abdominal aortas were collected, fixed, included in paraffin and sliced to determine proliferative nuclei.

Analysis of VSMC proliferation

To analyze proliferation rate we performed immunofluorescence for Ki67 in aortic slices. Immunofluorescence was performed as described above. Primary antibodies anti Ki67 (NeoMarkers) and anti α -actin (Sigma) were used at a 1:200 dilution and secondary antibodies were used at a 1:200 dilution. Slides were mounted with anti fade (Molecular Probes) and 1% Hoechst-33342. Nuclei were counted in a fluorescence microscope (LEICA Microsystems) and results are expressed in percentage of Ki67 positive nucleus with respect to total nucleus. The staining for α -actin was used as a control for VSMC phenotype. We counted 3 aortic sections per rat.

Analysis of aortic changes

To study the changes in the aortas, we performed Von Kossa staining in aortic slices. Briefly, sections were soaked in 5% silver nitrate solution, placed under UV light for 15 minutes, and incubated in 5% sodium thiosulphate solution for 2 minutes and washed with water. Tissue was counterstained with hematoxilin-eosin. After capturing the images with a digital microscope (LEICA Microsystems), histomorphometric studies were performed. We determined the

area of the media, the area of the lumen and the calcified area with image analysis software (Leica IM50 Image Manager).

Biochemistry data

Blood obtained at the end of the experiment was analyzed for calcium, phosphate and creatinine levels. 24 hours urine was collected in metabolic cages to determine creatinine clearance. Serum and urine biochemistries were analyzed using a multichannel autoanalyzer (Roche/Hitachi Modular Analytics), using the following methods: 1) for creatinine, the Jaffé reaction, 2) for calcium the o-cresolphthalein complexone method, 3) for Phosphate the ammonium molybdate method. Serum iPTH levels were analyzed by Elisa (Immutopics).

RESULTS

Effects of calcitriol and paricalcitol on VSMC proliferation

We first investigated BrdU incorporation in VSMC treated with different concentrations of calcitriol and paricalcitol (10nM – 300nM). In Figure 1a we can see that paricalcitol had no effect on VSMCs proliferation in any of the concentrations used *in vitro*. However, calcitriol showed a dose-dependent increase in proliferation.

Then, we determined the effect of calcitriol and paricalcitol in VSMCs proliferation *ex vivo*. We can see in Figure 1b that calcitriol increases incorporation of BrdU in VSMCs but this increase is not present in explants treated with paricalcitol. Finally, we decided to study the effect of calcitriol and paricalcitol in animal model of CDK. We observed an increase of nucleus

positive to Ki67 in animals treated with calcitriol compared control animals (Fig 1c). Treatment with paricalcitol caused a small but significant increase in VSMC proliferation. Representative pictures of a positive nuclei are shown in Fig 2.

Effects of the treatment with calcitriol or paricalcitol on aortic architecture *in vivo*

In figure 1d we show the effects of the different *in vivo* treatments on the aortic structure. Treatment with calcitriol increased the ratio area of the media/area of the lumen. The treatment with paricalcitol did not significantly modify this parameter.

Effects of calcitriol and paricalcitol on VSMC calcification *in vitro*

In figure 3 we show the effect of calcitriol (3c, d) and paricalcitol (3b, d) on rat VSMC calcification. Calcitriol induced a significant increase in calcium incorporation in the cells, compared with cells incubated only in the calcification media. Paricalcitol did not have a statistically significant effect in calcium content in rat VSMC.

Effects of the treatment with calcitriol or paricalcitol on aortic calcification *in vivo*

In figure 4 we show the effects of the different *in vivo* treatments on the aortic calcification. The treatment with calcitriol dramatically increased the calcified areas in the abdominal aorta (4c, d). The calcification of the medial area of the artery was only seen sporadically (arrows) in rats treated with paricalcitol (4b, d).

Effects of the treatment with calcitriol or paricalcitol on blood pressure

Both treatments at the doses used increased SBP significantly. However, only treatment with paricalcitol increased DBP significantly (Fig 5a). This led to a significant increase in pulse pressure only in the group of animals treated with calcitriol (Fig 5b).

Effects of the treatment with calcitriol or paricalcitol on serum calcium and phosphorus

As it is shown in Fig 6a, both treatments increased significantly calcium levels. No differences were observed among the calcium levels in both treatments. The product Ca X PO₄ followed a similar pattern (6c). Phosphorus level increased also in both groups, but the rise did not reach statistical significance (6b).

Effects of the treatment with calcitriol or paricalcitol on PTH levels

Both treatments, at the doses used, decreased PTH levels significantly (Fig 6d). No differences in the serum levels of PTH were found between both treatments.

Discussion

As we stated in the introduction, vitamin D therapy is widely used to treat 2HPT in dialysis patients. The positive effect of vitamin D treatment in hemodialysis patients has been recently demonstrated (3). Thus, the use of vitamin D analogues that keep its beneficial effects, and lack the unwanted secondary effects, is likely to improve the patients' health. It has also been shown that, in dialysis patients, treatment with paricalcitol shows even better results (9) (19). Furthermore, the differential effect seems to be independent of serum calcium and phosphorus levels (9), so a direct effect of vitamin D in VSMCs has been suggested. In the present paper we have demonstrated that calcitriol and paricalcitol have different effects in the biology of VSMCs. On the one hand, paricalcitol does not have the proproliferative effect seen in the treatment with calcitriol. This effect was demonstrated *in vitro* in VSMCs in culture, *ex vivo* in aortic rings, and *in vivo* in animals with renal failure. The increase in VSMCs proliferation could be responsible, among other factors, of the increase in the area of the media/area of the lumen ratio found in the animals treated *in vivo* with calcitriol. Patients with renal failure are characterized by abnormal elasticity of the large arteries. In 1997, Amann et al (20) demonstrated that, in animals with renal failure, increased aortic wall thickness results from an increase in aortic extracellular matrix and proliferation of aortic vascular smooth muscle cells. Therefore, treatment with calcitriol could induce an even higher increase in VSMC proliferation, aggravating the cardiovascular problems. Furthermore, it has also been published that calcitriol increases VSMC migration (21). This effect could further aggravate the atherosclerotic process, increasing the growing rate of the plaque. Thus, the

beneficial effects of the calcitriol therapy can be shadowed by a deleterious side effect in the vessels. As we demonstrated in the results section, paricalcitol treatment did not increase VSMCs proliferation. On the other hand, the direct *in vitro* effect of calcitriol increasing the calcium content in rat VSMCs is not seen in cells treated with paricalcitol. This effect was first demonstrated by Jono et al in 1998 (17). However, in our experiments the levels of calcium incorporated into the cells are much lower. This divergence could be explained by the different origin of the cells (bovine versus rat).

In the present paper we also compared the *in vivo* effects of both analogues in uremic animals. In order to rule out the effect of high calcium and phosphorus levels in the calcification process, we deliberately chose a hypercalcemic dose of paricalcitol and the clinically comparable dose of calcitriol (following the 1:3 ratio). Thus, after 8 weeks of treatment, animals treated either with calcitriol or paricalcitol showed similar levels of serum calcium, phosphorus and calcium-phosphorus product. However, the effect on vascular calcification was different. Whereas animals treated with paricalcitol showed little aortic calcification areas, calcitriol-treated animals had extensive medial calcification in their aortas. It has been described that increases in serum calcium-phosphorus product induce aortic calcification in uremic patients (22). Therefore, the increase in calcium-phosphorus product in the animals treated with paricalcitol could be responsible for the increase in aortic calcification observed. However, animals treated with calcitriol that reached similar levels of calcium-phosphorus product had a much more extensive aortic calcification. This effect on calcification has been also reported with non-hypercalcemic doses of calcitriol (23). This *in vivo* effect could be partially

explained by the different effect we observed in the VSMCs calcification *in vitro*. Furthermore, both treatments were equally efficient in suppressing the increase in PTH secretion induced by the 5/6 nephrectomy.

Treatment with both analogues had a significant effect in blood pressure. However, whereas both treatments increased significantly the systolic blood pressure, the diastolic blood pressure only raised in the paricalcitol-treated group. This led to a significant increase in pulse pressure only in the animals treated with calcitriol. The increase in blood pressure after treatment with vitamin D analogues has been previously reported both in animals (23-25) and in hypertensive patients (26). In our study, the increase on pulse pressure can be explained by the stiffness of the artery caused by the calcification process. This increase in pulse pressure could be also a deleterious side effect of the calcitriol treatment, because it has been previously demonstrated that pulse pressure is a strong predictor of cardiovascular and cerebrovascular mortality (27;28).

In summary, we have shown in the present article that calcitriol and paricalcitol have different effects in the biology of VSMCs. Thus, whereas calcitriol increases proliferation and calcification of cells *in vitro* and *in vivo*, paricalcitol does not. The different effect on calcification *in vivo* is independent of levels of calcium-phosphate product. This effect of calcification and proliferation could lead to aggravate the cardiovascular problems associated with uremic conditions. Therefore, extrapolating these results to the clinical settings, treatment with paricalcitol could maintain all the positive effects of vitamin D therapy and avoid some of the downsides. Furthermore these results may explain, at least in part, the differences in survival observed in the clinical

settings. However, more studies in humans are needed to confirm these results, and to further delineate the advantages and disadvantages of different vitamin D analogues.

Acknowledgements

This work was partially supported by grants from Ministerio de Ciencia y Tecnología SAF2003-08548, “Fondo de Investigaciones Sanitarias” CP03/00055, and “Sociedad Española de Nefrología” PI 1/00. Elvira Fernandez and Jose M Valdivielso are senior coauthors.

References

1. Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E: Vitamin D. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 277:F157-F175, 1999
2. Slatopolsky E, Brown A, Dusso A: Pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* 56:S14-S19, 1999
3. Teng M, Wolf M, Ofsthun MN, Lazarus JM, Hernan MA, Camargo CA, Jr., Thadhani R: Activated injectable vitamin D and hemodialysis survival: a historical cohort study. *J Am Soc Nephrol* 16:1115-1125, 2005
4. Andress DL: Vitamin D Treatment in Chronic Kidney Disease. *Seminars In Dialysis* 18:315-321, 2005
5. Qunibi WY, Nolan CA, Ayus JC: Cardiovascular calcification in patients with end-stage renal disease: A century-old phenomenon. *Kidney Int* 62:S73-S80, 2002
6. Llach F, Yudd M: Paricalcitol in dialysis patients with calcitriol-resistant secondary hyperparathyroidism. *Am J Kidney Dis* 38:S45-S50, 2001
7. Martin KJ, Gonzalez EA, Gellens ME, Hamm LL, Abboud H, Lindberg J: Therapy of secondary hyperparathyroidism with 19-nor-1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-2. *Am J Kidney Dis* 32:S61-S66, 1998
8. Finch JL, Brown AJ, Slatopolsky E: Differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D-3 and 19-nor-1,25-dihydroxyvitamin D-2 on calcium and phosphorus resorption in bone. *Journal of the American Society of Nephrology* 10:980-985, 1999
9. Teng M, Wolf M, Lowrie E, Ofsthun N, Lazarus JM, Thadhani R: Survival of patients undergoing hemodialysis with paricalcitol or calcitriol therapy. *N Engl J Med* 349:446-456, 2003
10. Kawashima H: Receptor for 1,25-Dihydroxyvitamin-D in A Vascular Smooth-Muscle Cell-Line Derived from Rat Aorta. *Biochem Biophys Res Commun* 146:1-6, 1987
11. Merke J, Milde P, Lewicka S, Hugel U, Klaus G, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, Rauterberg EW, Ritz E: Identification and Regulation of 1,25-Dihydroxyvitamin-D3 Receptor Activity and Biosynthesis of 1,25-Dihydroxyvitamin-D3 - Studies in Cultured Bovine Aortic Endothelial-Cells and Human Dermal Capillaries. *J Clin Invest* 83:1903-1915, 1989
12. Lindner A, Charra B, Sherrard DJ, Scribner BH: Accelerated Atherosclerosis in Prolonged Maintenance Hemodialysis. *N Engl J Med* 290:697-701, 1974

13. Amann K, Rychlik I, Miltenberger-Milteny G, Ritz E: Left ventricular hypertrophy in renal failure. *Kidney Int* 54:S78-S85, 1998
14. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ: Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 32:S112-S119, 1998
15. Cardús, A., Parisi, E., Gallego, C., Aldea, M., Fernandez, E., and Valdivielso, J. M. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through a VEGF-mediated pathway. *Kidney Int. in press.*
16. Pickering JG, Weir L, Rosenfield K, Stetz J, Jekanowski J, Isner JM: Smooth-Muscle Cell Outgrowth from Human Atherosclerotic Plaque - Implications for the Assessment of Lesion Biology. *J Am Coll Cardiol* 20:1430-1439, 1992
17. Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, Morii H: 1,25-dihydroxyvitamin D-3 increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide. *Circulation* 98:1302-1306, 1998
18. Qi YF, Wang SH, Zhang BH, Bu DF, Shu TC, Du JB: Changes in amount of ADM mRNA and RAMP2 mRNA in calcified vascular smooth muscle cells. *Peptides* 24:287-294, 2003
19. Dobrez DG, Mathes A, Amdahl M, Marx SE, Melnick JZ, Sprague SM: Paricalcitol-treated patients experience improved hospitalization outcomes compared with calcitriol-treated patients in real-world clinical settings. *Nephrology Dialysis Transplantation* 19:1174-1181, 2004
20. Amann K, Wolf B, Nichols C, Tornig J, Schwarz U, Zeier M, Mall G, Ritz E: Aortic changes in experimental renal failure - Hyperplasia or hypertrophy of smooth muscle cells? *Hypertension* 29:770-775, 1997
21. Rebsamen MC, Sun JX, Norman AW, Liao JK: 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3 induces vascular smooth muscle cell migration via activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Circ Res* 91:17-24, 2002
22. Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK: Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: A national study. *Am J Kidney Dis* 31:607-617, 1998
23. Haffner D, Hocher B, Muller D, Simon K, Konig K, Richter CM, Eggert B, Schwarz J, Godes M, Nissel R, Querfeld U: Systemic cardiovascular disease in uremic rats induced by 1,25(OH)(2)D-3. *J Hypertens* 23:1067-1075, 2005
24. Bukoski RD, Li JY, Bo J: Effect of Long-Term Administration of 125 (Oh)2 Vitamin-D(3) on Blood-Pressure and Resistance Artery Contractility in the Spontaneously Hypertensive Rat. *Am J Hypertens* 6:944-950, 1993

25. Bukoski RD, Xue H: On the Vascular Inotropic Action of 1,25-(Oh)₂ Vitamin-D₃. *Am J Hypertens* 6:388-396, 1993
26. Jespersen B, Randlov A, Abrahamsen J, Fogh-Andersen N, Olsen NV, Kanstrup IL: Acute cardiovascular effect of 1,25-dihydroxycholecalciferol in essential hypertension. *Am J Hypertens* 11:659-666, 1998
27. Mazza A, Pessina AC, Gianluca P, Tikhonoff V, Pavei A, Casiglia E: Pulse pressure: An independent predictor of coronary and stroke mortality in elderly females from the general population. *Blood Press* 10:205-211, 2001
28. Fang J, Madhavan S, Alderman MH: Pulse pressure: A predictor of cardiovascular mortality among young normotensive subjects. *Am J Hypertens* 12:12A, 1999

Figure legends

Figure 1: Differential effects of calcitriol and paricalcitol on VSMCs proliferation rate. **A)** Effect of *in vitro* incubation with crescent concentrations of calcitriol (open bars) and paricalcitol (dashed bars). Data are represented as percentage over control values (no treatment). **B)** Effect of the incubation with 100 nM of calcitriol or paricalcitol on VSMCs proliferation in aortic rings *ex vivo*. Data are represented as percentage of proliferating nuclei. **C)** Effect of treatment with calcitriol (1 µg/kg 3 times a week for 8 weeks) or paricalcitol (3 µg/kg 3 times a week for 8 weeks) on VSMCs proliferation in animals with 5/6 nephrectomy. Data are represented as percentage of proliferating nuclei. **D)** Effect of treatment with calcitriol (1 µg/kg 3 times a week for 8 weeks) or paricalcitol (3 µg/kg 3 times a week for 8 weeks) on the aortic ratio (area of the media/area of the lumen) in animals with 5/6 nephrectomy. Data are mean ± sem. *: p<0.01 vs. control.

Figure 2: Representative pictures of a proliferative cell. **A)** Staining for Ki67 in the nuclei is seen in green. In red, the staining for α-actin identifies the cell as a VSMC. **B)** Staining of total nuclei with Hoechst-33342 is shown in blue.

Figure 3: Effect of the *in vitro* incubation of rat VSMCs with calcitriol (100 nM) or paricalcitol (100 nM) on calcification. Representative photographs of Von Kossa staining of **A)** control cells, **B)** cells incubated with paricalcitol or **C)** cells incubated with calcitriol. **D)** Quantification of calcium incorporation in VSMCs.

Data are ng of calcium per mg of protein. Data are mean \pm sem.*: $p < 0.01$ vs. control.

Figure 4: Effect of the *in vivo* treatment of 5/6 nephrectomized rats with calcitriol (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 times a week for 8 weeks) or paricalcitol (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 times a week for 8 weeks) on aortic calcification. Representative photographs of Von Kossa staining of **A)** control animals, **B)** animals treated with paricalcitol or **C)** animals treated with calcitriol. **D)** Quantification of calcified areas in the aorta. Data are percentage of the media presenting calcification. Data are mean \pm sem. *: $p < 0.01$ vs. control

Figure 5: Evolution of blood pressure in 5/6 animals treated with calcitriol (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 times a week for 8 weeks) or paricalcitol (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 times a week for 8 weeks). **A)** Effect of treatment in systolic and diastolic blood pressure. In the left hand side we present the values of untreated 5/6 nephrectomized animals at the end of the study. In the right hand side we represent the values for animals treated with calcitriol (solid lines) or paricalcitol (dotted lines).*: $p < 0.01$ vs. no treatment. #: $p < 0.05$ vs. no treatment. **B)** Effect of treatment with calcitriol or paricalcitol on pulse pressure on 5/6 nephrectomized animals. Data are mean \pm sem. *: $p < 0.01$ vs. no treatment (A) or control (B). #: *: $p < 0.05$ vs. no treatment.

Figure 6: Effect of the *in vivo* treatment of 5/6 nephrectomized rats with calcitriol (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 times a week for 8 weeks) or paricalcitol (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 times a week for 8 weeks) on **A)** serum calcium levels, **B)** serum phosphorus levels, **C)**

serum calcium-phosphorus product and **D)** serum iPTH levels. Data are mean \pm sem. *: $p < 0.01$ vs. control.

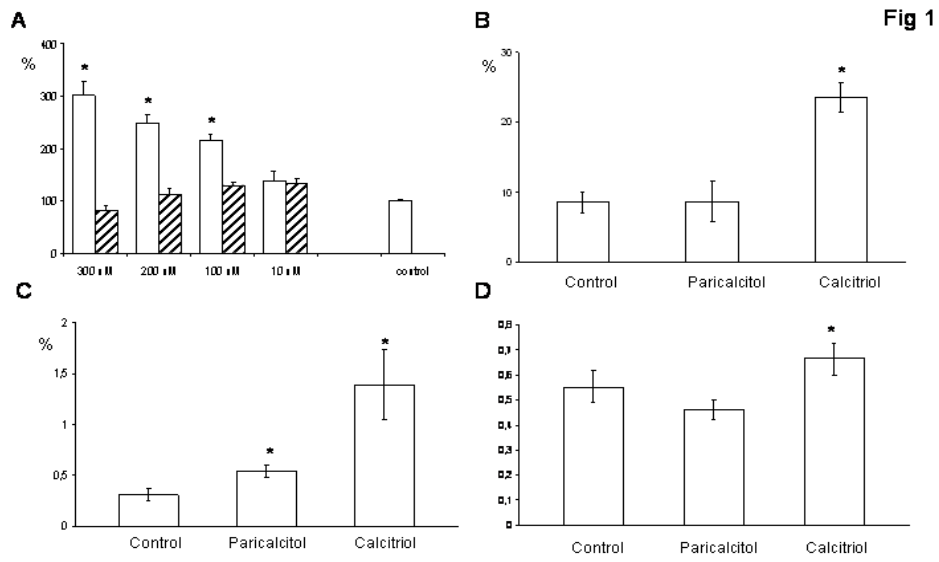


Fig 2

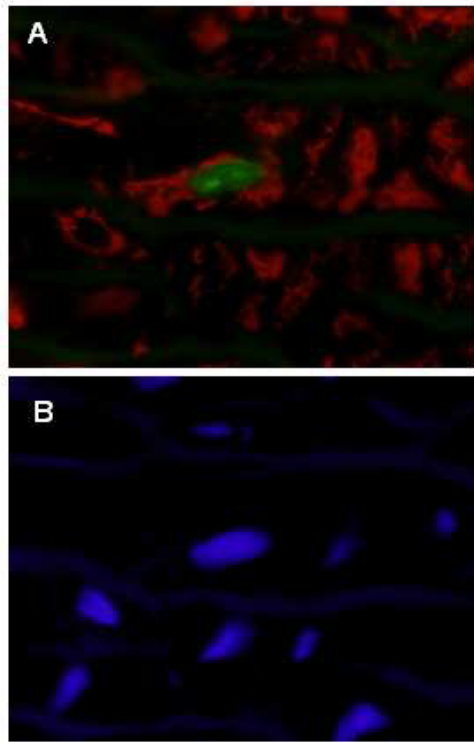


Fig 3

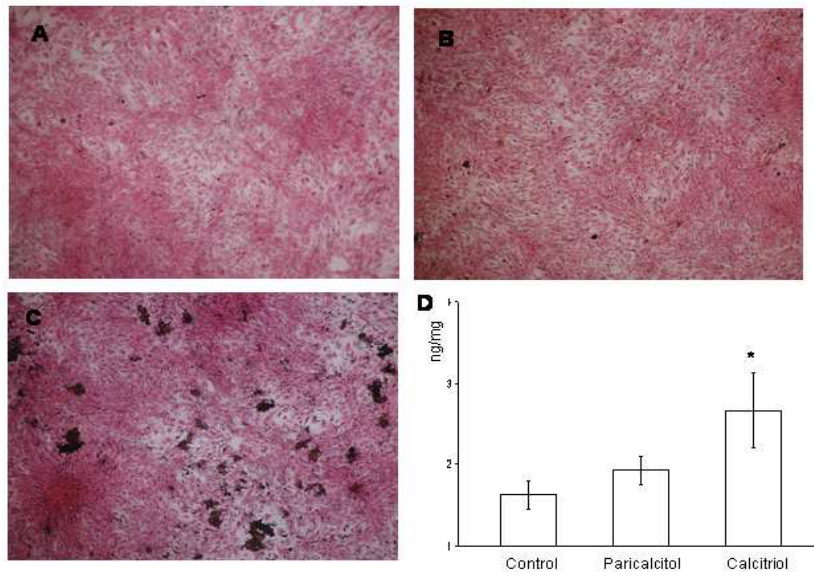


Fig 4

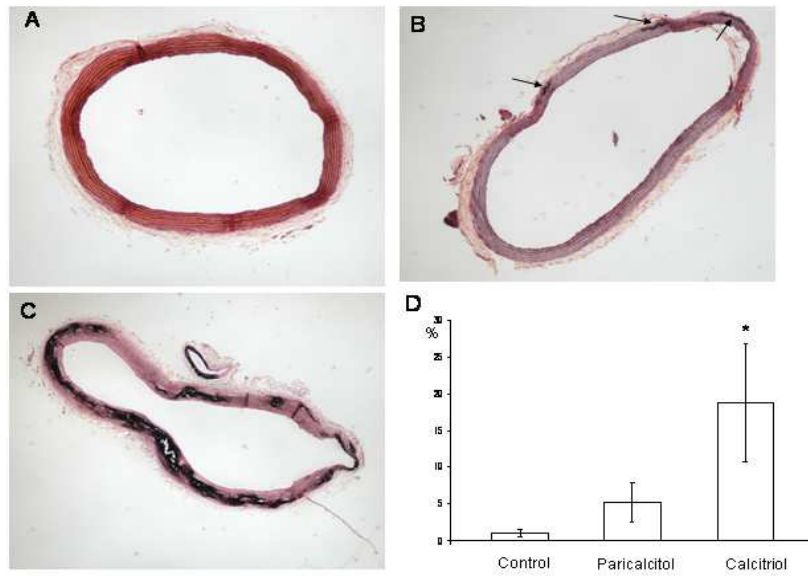


Fig 5

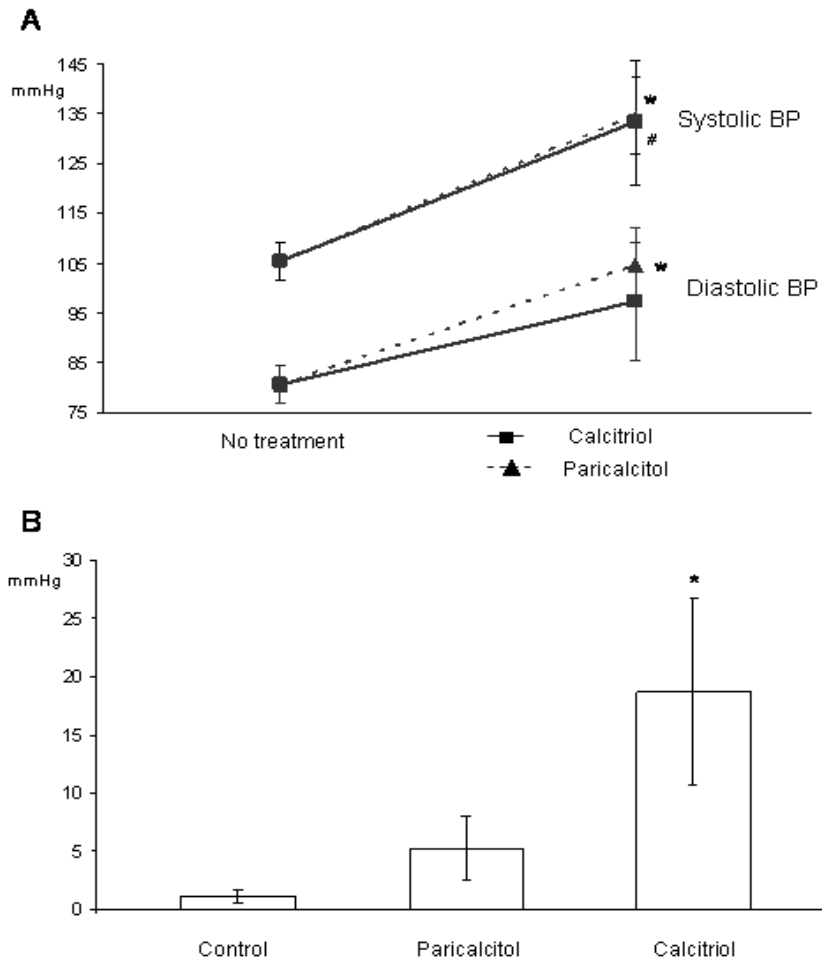
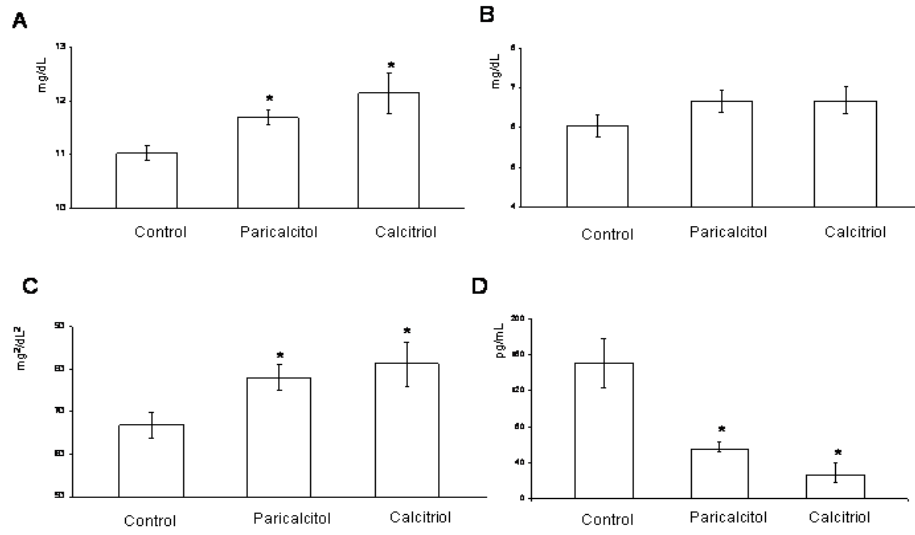


Fig 6



**1,25-DIHYDROXYVITAMIN D₃ STIMULATES VITAMIN D RECEPTOR
DNA BINDING TO THE VEGF PROMOTER.**

Cardus A¹, Gallego C², Aldea M², Fernandez E^{1,3}, JM Valdivielso³

¹ Department of Medicine University of Lleida. ² Department of Basic Medical Sciences. ³ Research Laboratory, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, Spain.

This work was partially supported by grants from Ministerio de Ciencia y Tecnología SAF2003-08548, “Fondo de Investigaciones Sanitarias” CP03/00055 and “sociedad Española de Nefrología” PI1/00.

Running title: vitamin d response element in VEGF gene

anna.cardus@medicina.udl.es; sara.panizo@medicina.udl.es;

carme.gallego@cmb.udl.es; marti.aldea@cmb.udl.es;

efernandez@arnau.scs.es

Correspondence to: Dr. Jose M Valdivielso, laboratorio de Investigación HUAV-UdL. Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Rovira Roure 80, 25198 Lleida, Spain.

Phone: +34 973 702212, Fax: +34 973 702435

e-mail: valdivielso@medicina.udl.es

ABSTRACT

In previous studies we demonstrate that $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimulates vascular smooth muscle cells (VSMC) proliferation in a dose dependent manner and this stimulation occurred through a VEGF-mediated pathway. The mechanism by which $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ increases vascular endothelial growth factor (VEGF) production is not clear.

We have identified the presence of 3 possible sequences (BOX1, BOX2 and BOX3) in the promoter of the VEGF gene that are similar to the vitamin D response element (VDRE). We tested VDR binding to VEGF gene sequences by chromatin immunoprecipitation (ChIP) in VSMC treated with 100nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and 10 μM retinoic acid, and we found that VDR binds the VEGF promoter specifically in BOX2 and BOX3. Thus, the increase in VEGF expression and secretion by $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ can be explained by the direct binding of VDR, as a transcription factor, to VEGF promoter.

INTRODUCTION

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a vascular permeability factor which is typically considered to be an endothelia-specific growth factor with angiogenic activity [1]. There is now a consensus that VEGF is crucial in pathological processes both in embryo and in adult. Overexpression of VEGF has been involved in several pathologies, inducing tumor growth [2], preeclampsia [3], etc. It is well known the effect of VEGF as a potent mitogen in endothelial cells from arteries, vein, and lymphatics vessels. Although it has been demonstrated that endothelial cells are a target of VEGF, some papers identify significant mitogenic activity for other cell types [4], like VSMCs [5].

Shibata *et al* [6] demonstrated the involvement of VEGF in neointimal proliferation in pig arteries following stent implantation. In a previous works we have shown that $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimulates vascular smooth muscle cells (VSMC) proliferation in a dose dependent manner and that this stimulation occurred through a VEGF-mediated pathway [7]. Thus, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimulated VEGF mRNA expression and protein secretion in VSMC.

The biologically most active vitamin D metabolite, 1,25-dihydroxyvitamin D_3 ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), is essential for mineral homeostasis and skeletal integrity [8], but it also has important roles in the control of the cell growth and differentiation in normal and malignant tissues [9]. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ can exert its functions through the vitamin D receptor (VDR) leading to gene expression, either up regulation or down regulation of gene products, so VDR acts as a ligand-activated transcription factor. In order to bind with sufficient affinity to DNA, VDR forms homodimers [10] and also heterodimers with RAR [11], which is a nuclear

receptor for all-trans retinoic acid, although its main partner is RXR [12], a nuclear receptor for 9-cis-retinoic acid (RA). These dimers bind to VDR specific sequences in promoter regions of the $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ target genes, commonly referred to as vitamin D response elements (VDRE). VDREs consist of two hexameric half-sites whose consensus sequence are RGKTCA (R=A or G, K=G or T) [13] in a direct repeat, a palindromic or an inverted palindromic arrangement with a specific number of spacing nucleotides. Simple VDRE are often formed by direct repeat of two hexameric core binding motifs spaced by three nucleotides (DR3-type VDRE). This type of VDRE has been reported in the proximal promoter of a number of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ responding genes including human and rat vitamin D3 24-hydroxylase (CYP24) and p21 [14;15]. There is another important type of VDRE, the IP9-type, that has an inverted palindromic structure with nine intervening nucleotides [16]. Moreover, VDREs with direct repeats spaced by four nucleotides (DR4-type) [17] and six nucleotides (DR6-type) [18] have been described. According to the model of multiples pathways of vitamin D by Carlberg et al [19], the pleiotropic character of vitamin D can be due to different combinations of VDR dimers and VDRE types.

The mechanism by which $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ increases vascular endothelial growth factor (VEGF) production is not clear. We have identified 3 putative sequences in the promoter of the VEGF gene that are similar sequence to DR3-type vitamin D response elements (VDRE).

MATERIALS AND METHODS

VSMC culture

Primary aortic VSMCs of 2 months old Sprague-Dawley rats were obtained by explants culture as described previously [20] and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Cells obtained by this method were identified as VSMCs by (1) the characteristic hill and valley pattern growth and, (2) a positive immunostaining by monoclonal anti- α -smooth muscle actin (Sigma-Aldrich).

ChIP assay

Cells were cultured in 150mm dishes (15×10^6 cells /dish) with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ at 100nM and 10 µM of 9-cis-retinoic acid (RA). After 2 hours, cells were crosslinked by adding 1% formaldehyde during 10 minutes at 37°C. Crosslinking was stopped by adding glycine to a final concentration of 0.125M during 5 minutes at room temperature on a rocking platform. The medium was removed and cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS). Cells were then collected by scraping in ice-cold PBS plus phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF) and protease inhibitor cocktail (P-2714, Sigma Aldrich) and, after centrifugation, cell pellets were resuspended in lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.1). Chromatin was sonicated to an average length of about 600 bp (3 x 30 sec, 10% power, BRANSON Digital Sonifier) while keeping samples on ice. Cellular debris were removed by centrifugation and the lysate was diluted 1:10 in IP dilution buffer

(1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl pH 8, and 167 mM NaCl). Cells extracts (500µl) were mixed with complexes of rabbit α-VDR antibody (sc-1008, Santa Cruz Biotechnology, inc) or rabbit α-β-galactosidase antibody (A-11132, Molecular Probes), as a negative control, coupled to IgG beads (Dynabeads M-280 sheep ant-rabbit IgG, prepared according the manufacturer's instruction) suspended in 50µl of washing buffer (0.1%BSA in PBS), and immunoprecipitation was carried out at 4°C overnight. Beads were washed 3 times in IP wash buffer (0.1% deoxycholic acid, 1% NP40, 500 mM LiCl, 100 mM Tris-HCl pH 8) and once in TE (10 mM EDTA, 1 mM Tris-HCl pH 8). Precipitates were extracted twice with elution buffer. Crosslinks were reversed overnight at 65°C in 0.3M NaCl and 50µg of RNase A/ml. Remaining proteins were digested by 75µg/ml protein K (final concentration) and for 1 hour at 45°C. Samples were then extracted with phenol-chloroform, and precipitated overnight with ethanol in the presence of 5 µg of glycogen and 5 µg of tRNA as carrier in -20°C. Immunoprecipitated material was used as template for PCR amplification.

PCR of chromatin templates

For each region of the VEGF promoter primer pairs were designed (Table 1). We used CYP24 primers as a positive control and exon 7 of the VEGF primers pairs as a negative control. To optimize the PCR we used input sample with total sonicated chromatin. The following PCR profile was used: preincubation for 10 min at 95°C, 40 cycles of 15 s at 95°C, 30 s at 55°C and 1 min at 72°C, and one final incubation for 10 min at 72°C. PCR products were separated by electrophoresis through 1,5% agarose with 1% SyberGreen.

RESULTS

We identified in the rat VEGF promoter three potential VDRE sites and designed them BOX1 (-181 to -166 of the ATG), BOX2 (-2242 to -2227) and BOX3 (-2745 to -2730) (Figure 1). Chromatin was extracted from VSMC treated during 2 hours with 100nM of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and 10 μM of RA. After immunoprecipitation with rabbit VDR antibody and rabbit β -galactosidase antibody, we analyzed by PCR the presence of DNA sequences corresponding to three putative boxes. Figure 2 shows that the region containing a VDRE in the CYP24 gene (as positive control) was amplified. On the contrary, the sequence in the exon 7 of the VEGF that was used as a negative control was not amplified. Finally, BOX2 and BOX3 sequences were clearly detected by PCR of immunoprecipitates with rabbit VDR antibody. Non-specific immunoprecipitation we tested with a rabbit β -galactosidase antibody, was negative and Figure 2 shows that for amplification was negative in all cases.

DISCUSSION

In a previous work we determined that $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimulates VSMC proliferation through a VEGF-mediated pathway [21] and we demonstrated that $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimulates VDR and VEGF expression in VSMC. How transcription of the rat VEGF gene was induced by $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, remained unknown. Most of the biological activities of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ require a VDR.

Careful analysis of the VEGF promoter identified three boxes in that are similar to the VDRE consensus. To determine if some of this boxes are bound by VDR we performed a ChIP analysis by VSMC treated with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and retinoic acid. After immunoprecipitation with αVDR antibody we used different sets of primers to amplify different regions of VEGF.

The results obtained by ChIP indicate that VDR associates to the region that contain BOX2 and BOX3. On the contrary, the proximal putative VDRE (BOX1) did not show interaction with VDR. Amplification of a region containing both BOX2 and BOX3 could suggest a synergistic interaction with the response elements. Its known that in many natural gene promoters the response elements are found in multiple copies or clustered together with binding sites for other transcription factors [22]. In this study they showed that VDR causes only a 2-fold activation from a single VDRE of the mouse osteopontin gene in the presence of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, but strongly activates (76-fold) when a second VDRE is introduced. Moreover, Kerry *et al* [23] demonstrated the presence of two synergic VDRE in the rat CY24 gene promoter. They observed that combined mutagenesis of VDRE1 and VDRE2 prevented induction and demonstrated the effectiveness of both mutations.

We have demonstrated that VDR binds the VEGF promoter, most likely at two closely spaced DR3-type VDRE, which would explain why $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ activates transcription of the VEGF gene and, hence, VSMC proliferation.

References

1. Ferrara N, Henzel WJ: Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 161:851-858, 1989
2. Shinkaruk S, Bayle M, Lain G, Deleris G: Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy. *Curr.Med.Chem.Anti.-Canc.Agents* 3:95-117, 2003
3. Chung JY, Song Y, Wang Y, Magness RR, Zheng J: Differential expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), endocrine gland derived-VEGF, and VEGF receptors in human placentas from normal and preeclamptic pregnancies. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 89:2484-2490, 2004
4. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* 9:669-676, 2003
5. Parenti A, Bellik L, Brogelli L, Filippi S, Ledda F: Endogenous VEGF-A is responsible for mitogenic effects of MCP-1 on vascular smooth muscle cells. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 286:H1978-H1984, 2004
6. Shibata M, Suzuki H, Nakatani M, Koba S, Geshi E, Katagiri T, Takeyama Y: The involvement of vascular endothelial growth factor and flt-1 in the process of neointimal proliferation in pig coronary arteries following stent implantation. *Histochem.Cell Biol.* 116:471-481, 2001
7. Cardus A, Parisi E, Gallego C, Aldea M, Fernandez E, Valdivielso JM: 1,25-dihydroxyvitamin D-3 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through a VEGF-mediated pathway. *Kidney International* 69:1377-1384, 2006
8. Sutton AL, MacDonald PN: Vitamin D: more than a "bone-a-fide" hormone. *Mol.Endocrinol.* 17:777-791, 2003
9. Hansen CM, Binderup L, Hamberg KJ, Carlberg C: Vitamin D and cancer: effects of 1,25(OH)2D3 and its analogs on growth control and tumorigenesis. *Front Biosci.* 6:D820-D848, 2001
10. Cheskis B, Freedman LP: Ligand Modulates the Conversion of Dna-Bound Vitamin D-3 Receptor (Vdr) Homodimers Into Vdr-Retinoid-X Receptor Heterodimers. *Molecular and Cellular Biology* 14:3329-3338, 1994
11. Schrader M, Muller KM, Becker-Andre M, Carlberg C: Response element selectivity for heterodimerization of vitamin D receptors with retinoic acid and retinoid X receptors. *J.Mol.Endocrinol.* 12:327-339, 1994
12. Carlberg C: The vitamin D-3 receptor in the context of the nuclear receptor superfamily - The central role of the retinoid X receptor. *Endocrine* 4:91-105, 1996

13. Dunlop TW, Vaisanen S, Frank C, Molnar F, Sinkkonen L, Carlberg C: The human peroxisome proliferator-activated receptor delta gene is a primary target of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and its nuclear receptor. *J.Mol.Biol.* 349:248-260, 2005
14. Chen KS, Deluca HF: Cloning of the Human 1-Alpha,25-Dihydroxyvitamin-D-3 24-Hydroxylase Gene Promoter and Identification of 2 Vitamin-D-Responsive Elements. *Biochimica et Biophysica Acta-Genes Structure and Expression* 1263:1-9, 1995
15. Hahn CN, Kerry DM, Omdahl JL, May BK: Identification of A Vitamin-D Responsive Element in the Promoter of the Rat Cytochrome P450(24) Gene. *Nucleic Acids Research* 22:2410-2416, 1994
16. Schrader M, Nayeri S, Kahlen JP, Muller KM, Carlberg C: Natural Vitamin-D-3 Response Elements Formed by Inverted Palindromes - Polarity-Directed Ligand Sensitivity of Vitamin-D-3 Receptor Retinoid-X Receptor Heterodimer-Mediated Transactivation. *Molecular and Cellular Biology* 15:1154-1161, 1995
17. Quack M, Carlberg C: Ligand-triggered stabilization of vitamin D receptor/retinoid X receptor heterodimer conformations on DR4-type response elements. *Journal of Molecular Biology* 296:743-756, 2000
18. Carlberg C, Bendik I, Wyss A, Meier E, Sturzenbecker LJ, Grippo JF, Hunziker W: 2 Nuclear Signaling Pathways for Vitamin-D. *Nature* 361:657-660, 1993
19. Carlberg C: The concept of multiple vitamin D signaling pathways. *J.Investig.Dermatol.Symp.Proc.* 1:10-14, 1996
20. Pickering JG, Weir L, Rosenfield K, Stetz J, Jekanowski J, Isner JM: Smooth muscle cell outgrowth from human atherosclerotic plaque: implications for the assessment of lesion biology. *J.Am.Coll.Cardiol.* 20:1430-1439, 1992
21. Cardus A, Parisi E, Gallego C, Aldea M, Fernandez E, Valdivielso JM: 1,25-dihydroxyvitamin D-3 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through a VEGF-mediated pathway. *Kidney International* 69:1377-1384, 2006
22. Liu M, Freedman LP: Transcriptional synergism between the vitamin D3 receptor and other nonreceptor transcription factors. *Mol.Endocrinol.* 8:1593-1604, 1994
23. Kerry DM, Dwivedi PP, Hahn CN, Morris HA, Omdahl JL, May BK: Transcriptional synergism between vitamin D-responsive elements in the rat 25-hydroxyvitamin D-3 24-hydroxylase (CYP24) promoter. *Journal of Biological Chemistry* 271:29715-29721, 1996

Figure legends

Table 1. Genomic PCR primers sequences and their location in the VEGF and CYP24 promoter regions.

Figure 1. Partial nucleotide sequence of the rat VEGF gene. Putative boxes for VDREs are indicated as *solid boxes*. An *arrow* indicates the upstream ATG codon.

Figure 2. ChIP assay to detect a VDRE in VEGF promoter. Representative agarose gel of the PCR products after ChIP assay using an antibody against VDR and an antibody against B-galactosidase as a negative control. Input lane confirm the detection sensitivity.

gene	Location	Primer sequences
VEGF Box1	-541 to -1030	5'-TGAGAAGCGCAGAGGCTTGG-3' 5'-ACTGGTCCGATGAAAGATCC-3'
VEGF Box2	-1905 to -2312	5'-GACAGAGCCACACAGGCTAAG-3' 5'-CGACCTGTGGAAGCCCACG-3'
VEGF Box3a	- 2158 to -2620	5'-AGTACTGTGTGCAGAGGGATG-3' 5'-GGATGGGAGTAGAGGTAAGGC-3'
VEGF Box3b	- 2552 to - 2840	5'-CATAGATTATAGATCAGGTGAGG-3' 5'-CCAACAGTCTTCCTACTGGTC-3'
VEGF Box3c	- 2981 to -3496	5'-TTCCTCTGACTCAGCTTCAG-3' 5'-CTCTACTCTTCAGTCACTCTC-3'
VEGF 3'UTR	+10443 to +10116	5'-GACGCTCTAGCTTAGATGTCTT-3' 5'-CCATGCAGGCAGCTAGAGGC-3'
CYP24	+8 to -260	5'-CTCTCCCCATAGCTGCCA-3' 5'-CAGCTCATAGTAGCAGGC-3'

Table 1

```

-2800 CTGGGC CCGTAAGCATTACTAACTACTCTCCCTGCTAAAAAGAGAGCCATCCGGGAGGTTG BOX3
-2740 ACTCAGGGCACTATGATAGGC CAGATGGGATGGGGTGGCTTTTTTTCCTCATAAGATCCT
-2680 CATAACATTGCTCCATTGAAATTTGGGTTTCCAAACAGGTACCCAGCATCCCACGGAGCCTC
-2620 AGTACTGTGTGCAGAGGGATGGAGATGGTGGAGTAACCTTTTCGGGGGAC CAGTAGGAAG
-2560 ACTGTTGGCTCCCTTTCTCAGAACTCAGCAGAC CTGGGTGAGGGCTGGGACTGTTGGT
-2500 CCTCTCTTCCACAGGTATCAGAGCCCCCTCTTGTTC CCAGGGGAGCCTAGGAGCAGCT
-2440 GGGCCAAAGCCAAACCAGGAATTTTTCCAGGCTGGTTCCTATATCC AAGGTGGGCTGGA
-2380 GGTGGGGGCTTTGGGGAGCTCTTAAGGAAGACACGAGGAGGTGAAGGGACTTTGTGGAA BOX2
-----
-280 CCTGGAGAAGCCGGGGCCCGAGAAGAAGGGGAGAAAAGAGAAAGAAAGAGAGGGGGCC
-220 GCAGTGGGGCTCGGGCTCTCGGGAGCCGGGCTCATGGAAGGGTGAGGGGGCTGTGGC BOX1
-160 AGACAGTGCTCCAGCCGCGCGCGCCCAAGGCCCGGGCCCGGGTCCAGAAAG
-100 GAGAGGAGCCCGCCAAGGCGCGCAAGAGAGCGGGCTGCCTCGCAGTCCGAGCCGGAGAG
-40 GAGCGCGAGCCGCGCCGGCCCCGGAGGGCTCTGAAACCGTGAACTTTCTGCTCTCTTG Consensus sequence:
+21 GGTGCACTGGACCCCTGGCTTTTACTGCTGTACTCTCCRCCRTGCCRAGGTAAGCGGTCTGTGC R= A ó G, K= G ó T

```

Figure 1

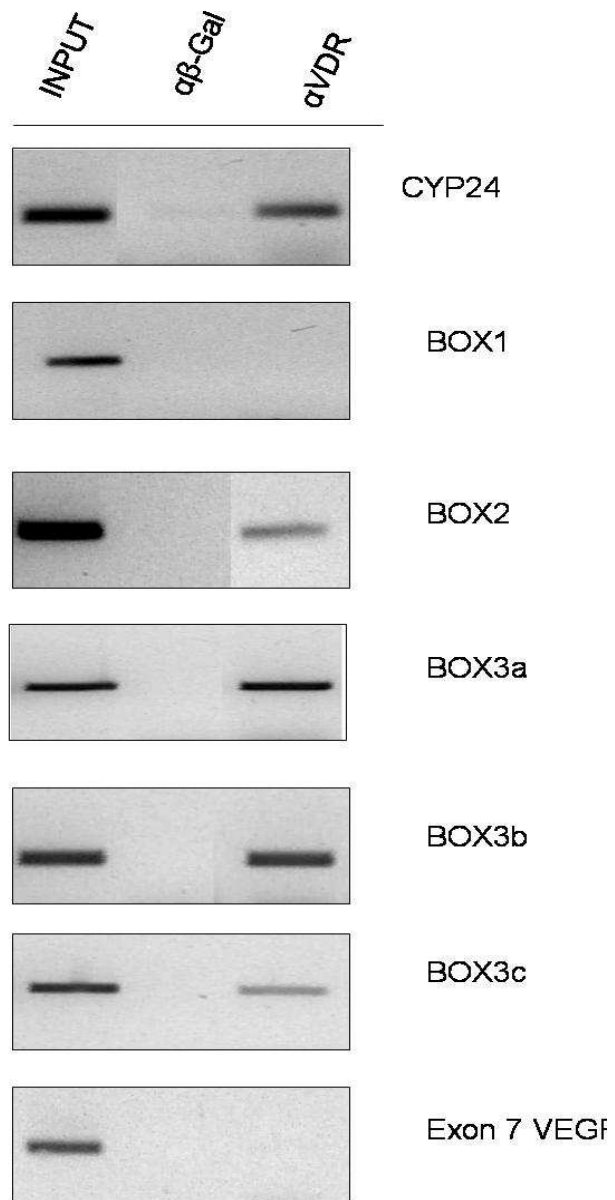


Figure 2

— |

| —

— |

| —

— |

| —

— |

| —

1. LA 1,25(OH)₂D₃ ESTIMULA LA PROLIFERACIÓ EN LES CÈL·LULES DE MÚSCUL LLIS VASCULAR (CMLV)

El metabòlit actiu de la vitamina D (1,25(OH)₂D₃) té un paper central en l'homeòstasi del calci i el fòsfor i és essencial per al desenvolupament i manteniment del teixit ossi. Per a controlar aquest procés, la 1,25(OH)₂D₃ intervé coordinant diferents accions en els òrgans diana clàssics, ronyó, intestí, ossos i glàndula paratiroidea [136]. Actualment s'ha identificat la presència del receptor de la 1,25(OH)₂D₃, el VDR, en altres teixits no clàssics, com en la pell, múscul, pàncrees, òrgans reproductius, paret vascular i en el sistema hematopoètic, immune i nerviós [19], a més dels clàssics òrgans diana. En aquests teixits la 1,25(OH)₂D₃ exerceix diferents accions biològiques incloent el control de la proliferació i diferenciació cel·lular [46], modula la secreció hormonal d'alguna glàndula endocrina [194], regula la funció reproductiva [96] i protegeix del procés degeneratiu de neurones específiques [30]. Recentment, s'ha descobert la presència de l'enzim de síntesi 1 α -hidroxilasa en diversos tipus cel·lulars com macròfags [2], queratinocits [78], i cèl·lules endotelials [201]. Per tant, la presència del VDR en la paret vascular, tant en les cèl·lules endotelials com en les cèl·lules de múscul llis vascular (CMLV), i el descobriment que les cèl·lules endotelials sintetitzen 1,25(OH)₂D₃ localment ens fa preguntar sobre el paper paracrí de la 1,25(OH)₂D₃ en la paret dels vasos. Estudis recents suggereixen que la 1,25(OH)₂D₃ pot estar implicada en el procés arterioscleròtic i seguint aquesta línia de raonament, Zhender *et al* [201] van concloure que la síntesi local de 1,25(OH)₂D₃ per les cèl·lules endotelials té una funció paracrina/autocrina i actua a nivell local promovent l'adhesió leucocitària. A més a més, Rebsamen *et al* [149] troben un increment de migració de les CMLV induït de manera dosi depenent per la 1,25(OH)₂D₃ cosa que podria influir en la formació de la placa ateroscleròtica i en la arteriosclerosi, ja que la migració i proliferació de les CMLV és un aspecte important de la resposta de la paret arterial enfront el dany, el desenvolupament dels vasos i l'aterogènesi [202].

Per tot això el primer que vàrem decidir estudiar era l'efecte de la 1,25(OH)₂D₃ sobre la proliferació de les CMLV *in vitro* per incorporació de 5-bromo 2'-deoxyuridine (BrdU). El BrdU és un anàleg de la timidina que s'incorpora en el DNA durant la replicació podent detectar fàcilment les cèl·lules que l'han incorporat amb

un anticòs monoclonal per BrdU marcat amb peroxidasa. L'efecte de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en la proliferació està molt estudiat en diferents tipus cel·lulars com en cèl·lules de càncer de colon [74], de pròstata [166], de mama [35], en cèl·lules osteoblàstiques [165] i en cèl·lules de les glàndules paratiroides [178]. En totes aquestes línies la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ es comporta com un potent inhibidor de la proliferació i inductor de la diferenciació [46]. A més a més, trobem estudis com el de Gache et al [60] on analitzen els efectes de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en la proliferació de cultius primaris de cèl·lules epitelials normals de mama (*human mammary normal epithelial cells*, HMECs) i en la línia cel·lular MCF-7 d'adenocarcinoma de mama. En la línia MCF-7 detecten una clara inhibició de la proliferació per incorporació de ^3H -Timidina, però contràriament, observen estimulació de la proliferació de manera dosis dependent en les HMEC induïda per la forma activa de la vitamina D. No obstant això existeixen pocs estudis que analitzin l'efecte de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en la proliferació de les CMLV i aquests mostren resultats contradictoris segons les condicions experimentals usades [31;92;122]. Nosaltres hem emprat CMLV en estat quiescent (48 hores sense sèrum) per a prevenir que altres factors de creixement presents en el sèrum puguin saturar o ocultar l'efecte en la proliferació de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Aquestes condicions experimentals són importants perquè demostren que l'efecte proliferatiu que observem en les CMLV després del tractament amb $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ és degut únicament a la presència de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Per tant, l'efecte proliferador de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre les CMLV és directe i independent d'altres factors relacionats amb el sèrum. Posteriorment vàrem analitzar l'efecte de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre les CMLV proliferant, trobant que l'efecte de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ és additiu a aquest efecte proliferatiu d'altres factors com bFGF o el propi sèrum i demostrant que l'efecte en la proliferació en les CMLV de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ és independent de l'estat de les cèl·lules (quiescents o no quiescents). Quan vàrem estudiar l'efecte de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ amb diferents concentracions de sèrum, vàrem observar que a altes concentracions de sèrum, en les quals les CMLV estan fortament estimulades per a proliferar, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ no incrementa més la proliferació cel·lular induïda pel sèrum. Aquest resultat pot ser degut a la presència en el sèrum de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i altres factors de creixement que poden emascarar l'efecte de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ afegida, o que les CMLV estan proliferant al seu nivell màxim.

Les concentracions de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ usades en aquest estudi (5 nM-100 nM) són més altes que la concentració normal en el sèrum, però es troben dintre del rang

que indueix resposta biològica en altres teixits analitzats *in vitro* [1;22;28;31;37;58]. A més a més, clínicament per a determinar els nivells de vitamina D en l'organisme s'usen els nivells de 25(OH)D₃ circulant, no els de 1,25(OH)₂D₃, i el rang normal circulant és de 40-180 nM. D'altra banda, com ja hem dit anteriorment les cèl·lules endotelials tenen la capacitat de sintetitzar localment 1,25(OH)₂D₃ per la presència de l'enzim 1 α -hidroxilasa, i sembla ser que aquesta activitat solament depèn de la disponibilitat del substrat, la 25(OH)D₃ [201]. Per tant, nosaltres suggerim que la concentració local de vitamina D biològicament activa en la paret vascular pot ser molt més alta que en el sèrum. A més, està descrit que en la malaltia renal hi ha modificacions tant en la síntesi com degradació de la 1,25(OH)₂D₃. Dusso *et al* [51] van demostrar que els macròfags en condicions urèmiques mostren un increment en la síntesi de 1,25(OH)₂D₃ i Gallieni *et al* [62] assenyalen que els monòcits també presenten incrementada l'activitat de 1 α -hidroxilasa en la urèmia. Paral·lelament trobem un estudi de Hsu *et al* [77] que examina l'efecte de les toxines urèmiques en l'activitat 24 i 25 hidroxilasa. Aquest conclou que, en aquestes condicions, la degradació metabòlica de 1,25(OH)₂D₃ disminueix. Sembla ser que no existeixen evidències que la síntesi local de 1,25(OH)₂D₃ estigui incrementada en les cèl·lules endotelials per la urèmia, però en l'article de Zehnder [201] es descriu que les citokines inflamatòries provoquen un increment de la síntesi de 1,25(OH)₂D₃. També està descrit que en els pacients amb malaltia renal existeixen canvis en el sistema inflamatori de manera que s'incrementen els nivells de TNF- α i IL-8 [120;201]. Per tant, és lògic pensar que en condicions de malaltia renal, la síntesi de 1,25(OH)₂D₃ en el endoteli pot estar incrementada de manera que els nivells locals de 1,25(OH)₂D₃ siguin més alts que els nivells circulants.

Per a verificar aquest efecte proliferatiu de la 1,25(OH)₂D₃ vàrem analitzar les fases del cicle cel·lular per citometria de flux. Els resultats obtinguts confirmen l'efecte en la proliferació de la 1,25(OH)₂D₃ ja que en afegir al cultiu 1,25(OH)₂D₃ s'indueix un avanç de la fase S de 6 hores en les CMLV. Això suggereix que la 1,25(OH)₂D₃ produeix un escurçament de la fase G1 del cicle cel·lular.

A partir d'aquest resultat podríem assumir que en estats en que tenim incrementada la concentració de vitamina D podríem observar increment de la proliferació de les CMLV de la paret dels vasos. Per exemple, en malalties com la

sarcoïdosis (malaltia de causes desconegudes la qual produeix inflamació a nivell de ganglis limfàtics, pulmons, fetge, pell i altres teixits) o alguns limfomes, com el limfoma de Hodkin's, els pacients presenten nivells alts de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a la sang. A més a més, trobem altres situacions on la síntesi local de vitamina D al vas pot estar incrementada, com en el cas de la urèmia i/o l'aterosclerosi, ja que el sistema immunitari es troba alterat i tal i com van descriure Zehnder *et al* [201] això pot incrementar la síntesi de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ per les cèl·lules endotelials. Això podria donar suport als resultats d'Amman *et al* [4] els quals observen increment de proliferació de les CMLV de la paret vascular en rates urèmiques, tot i que no es coneix el estímul que provoca la proliferació.

2. EL VEGF COM A MEDIADOR DE LA PROLIFERACIÓ DE LES CMLV PER LA $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Les cèl·lules normals es reproduïxen en resposta a una "cascada" de senyals que envien els factors de creixement externs i detenen la seva divisió en resposta a factors inhibidors que actuen també per mitjà de cascades de senyals. Els mecanismes que intervenen en la proliferació de les CMLV en processos patològics no estan clarament definits. Existeix una família de citoquines, els factors de creixement de l'endoteli vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) que regulen la vasculogènesis durant el desenvolupament embrionari i la angiogènesis en condicions patològiques. Es coneix que el VEGF és crucial en diferents processos patològics com en el creixement tumoral [163], la preeclàmpsia [34], etc. En el estudi de Shibata *et al* [162], es va demostrar la presència i increment de VEGF i el seu receptor Flt1 en les CMLV quan estimulen la seva proliferació després de la implantació d'una cànula intravascular. A més altres treballs com el de Parenti *et al* [138] demostren que factors que intervenen en el remodelat de la paret dels vasos, com la proteïna *Monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1) estimulen la proliferació de les CMLV i aquest procés es depenent de la producció endògena de VEGF. Finalment, el fet que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ estimula la secreció de VEGF en la línia cel·lular A10 (CMLV de aorta) [197], ens suggereix que aquest factor de creixement pot tenir algun paper en l'estimulació de la proliferació de les CMLV. Els nostres resultats indiquen que quan s'estimula la proliferació de les CMLV amb $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ s'observa un increment del RNA missatger (mRNA) del VEGF, així com de la concentració de proteïna VEGF segregada al medi de cultiu de les cèl·lules tractades. Està descrit que les CMLV

expressen els receptors de VEGF (Flt1, Flk1) [85], de manera que és possible que les mateixes cèl·lules siguin diana per a VEGF. Al estudiar aquests receptors, vàrem observar un lleuger increment en l'expressió i producció de Flt1 suggerint que aquesta pot ser la via per la qual la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ incrementa la proliferació de les CMLV. Finalment per a clarificar aquesta via, vàrem dissenyar dos experiments on vàrem incubar simultàniament $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ amb VEGF1102 (un antagonista dels receptors del VEGF) [187] o bé amb un anticòs neutralitzant del VEGF. En ambdós casos vàrem comprovar que la proliferació induïda per la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ es troba totalment bloquejada. Això suggereix que el mediador del procés pel qual la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induïx la proliferació de les CMLV és el VEGF. El procés de proliferació de CMLV representa un dels primers passos en la remodelació de la paret vascular, com el que succeeix en l'ateromatosis. Es conegut el paper del VEGF en aquest procés, Couffignal *et al* [38] detecten expressió de VEGF en un 97% de les artèries arterioscleròtiques analitzades i a més a més demostren que un 66% d'aquest VEGF prové de les CMLV. Per tant, aquest resultat ens podria explicar una possible connexió entre la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i el VEGF en les patologies vasculars.

Una vegada vàrem determinar que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ estimula la proliferació de les CMLV i que existeix un increment de l'expressió i secreció del VEGF, ens vàrem plantejar estudiar el mecanisme molecular que ho desencadena i correlaciona aquests dos factors. Primer de tot vàrem determinar si en les CMLV es troba la resposta lògica i funcional del VDR, ja que es coneix que les accions biològiques de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ estan intervingudes per el receptor específic, el VDR [19]. Està descrit que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ estimula l'expressió del VDR [148] en les CMLV d'artèries aortes de conills tractats amb vitamina D_3 en observar un increment de la unió de VDR/hormona per l'anàlisi de Scatchard. En el nostre estudi observem un increment en el mRNA per real time i de la proteïna de VDR per western blot al tractar les CMLV amb $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Això ens demostra que la via de senyalització de la vitamina D està activa en les CMLV. El mecanisme pel qual $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ incrementa la producció de VEGF en les CMLV no està clar. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ actua unint-se al seu receptor i això provoca un canvi conformacional que permetrà que pugui entrar al nucli, heterodimeritzar amb el receptor del àcid retinoic (RXR) i unir-se a unes seqüències específiques localitzades a les zones promotores dels gens diana, anomenades elements de resposta de la vitamina D (VDRE), on reclutaran altres

proteïnes cofactors de la transcripció per estimular o inhibir aquest procés. Després d'analitzar la seqüència del VEGF vàrem identificar, tal i com es pot observar a la figura 16, la presència de tres zones en el promotor del gen del VEGF que tenen una seqüència molt semblant als VDREs [70], i les vàrem anomenar BOX1 (-181 al -166 del ATG), BOX2 (-2242 al -2227) i BOX3 (-2745 al -2730).

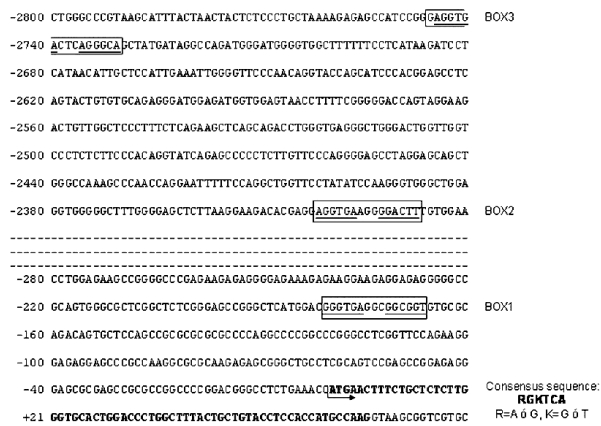


Figura 16. Seqüència de nucleòtids del promotor del VEGF de rata. Podem observar les possibles seqüències VDRE les quals hem anomenat BOX1, BOX2 i BOX3.

Per a determinar si alguna d'aquestes seqüències pot ser un VDRE vàrem analitzar per Immunoprecipitació de Cromatina (ChIP) si en aquestes seqüències s'uneix el VDR en tractar les cèl·lules amb $1,25(OH)_2D_3$ i àcid retinoic al mateix temps. Després de immunoprecipitar amb l'anticòs per VDR vàrem emprar els primers corresponents per a amplificar cada una de les seqüències, observant que el VDR es troba clarament unit a la BOX 3 després del tractament. Vàrem observar també unió específica a la BOX 2, que podria donar-se per proximitat a la BOX 3 o per sinergisme dels elements de resposta. Està descrit que els receptors nuclears esteroides s'uneixen a elements de resposta hormonals (HRE) en la regió promotora del gens diana, tal i com hem descrit del VDR, i sovint en aquests promotors naturals els HREs es troben en múltiples còpies o en clústers amb llocs d'unió per a altres factors de transcripció [103]. Kerry *et al* [89] especifiquen la presència de dos VDREs en el promotor del gen de CYP24 que actuen de forma sinèrgica. Observen que en

afectar per mutagènesis combinada el VDRE-1 i VDRE-2 prevenen la inducció produïda per la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, demostrant l'efectivitat de ambdues mutacions. Per tant, la interacció coordinada entre els dos VDREs podria ser una base sòlida per al sinergisme observat. A partir d'aquí podem dir que en el promotor del VEGF tenim com a mínim un element de resposta per la vitamina D on s'uneix el VDR. Tal i com es pot observar a la figura 17, aquesta unió podria comportar l'activació del promotor i consegüentment de la transcripció genètica.

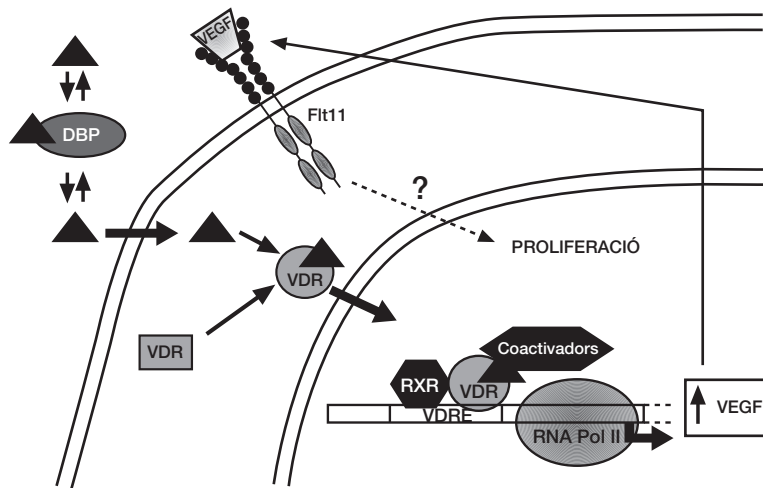


Figura 17. Possible paper del VEGF en la proliferació induïda per la vitamina D. La vitamina D activa entra dins el citoplasma de la cèl·lula diana on al unir-se amb el seu receptor provoca el canvi conformational necessari perquè aquest pugui entrar al nucli i heterodimeritzar amb el RXR. L'heterodímer s'uneix a les seqüències específiques VDREs que trobem en la zona promotora dels gens diana com en el VEGF. La presència del receptor per el VEGF en les CMLV, el Flt1, ens fa pensar que aquest VEGF podria actuar de forma autocrina intervenint en el procés de proliferació de les pròpies CMLV.

3. L'ANÀLEG DE LA VITAMINA D: 19-nor-1,25(OH)₂D₂ TÉ UN EFECTE MENOR QUE LA 1,25(OH)₂D₃ EN EL PROCÉS DE PROLIFERACIÓ I CALCIFICACIÓ DE LES CMLV

L'ús clínic de la vitamina D està molt estès en tractament per a malalties com la osteoporosis, càncer, desordres immunes, psoriasis i hiperparatiroidisme. El HPT2 és una patologia associada a la MRC que es caracteritza per un increment de la proliferació de la glàndula paratiroidea i un augment de la síntesi i secreció de PTH. L'administració de 1,25(OH)₂D₃ en aquests pacients inhibeix la secreció de PTH i la hiperplàsia de la glàndula [39]. Per aquesta raó la 1,25(OH)₂D₃ s'ha usat àmpliament com a tractament per al HPT2, però amb efectes secundaris indesitjables com hipercalcèmia i calcificacions associades. En un estudi clínic retrospectiu, amb dades bioquímiques i d'autòpsia de 120 pacients amb MRC, es van trobar calcificacions ectòpiques en un 60% dels pacients, i es va observar una forta associació amb l'ús de 1,25(OH)₂D₃ [121]. A més, diferents estudis associen el metabolisme mineral amb el risc de mortalitat en pacients amb MRC [13] i específicament amb la mortalitat cardiovascular [113]. En resum, la reducció de la funció renal és un factor de risc independent de les malalties cardiovasculars, sent aquesta una de les causes més freqüents de morbi-mortalitat en la MRC. Com factors de risc cardiovascular importants en els pacients amb MRC es troben les calcificacions vasculares i l'increment de gruixària de la paret arterial. Aquest increment de gruixària es deu tant a un augment de la síntesi de matriu extracel·lular com de la proliferació de les CMLV [4]. Son coneguts els efectes de la 1,25(OH)₂D₃ en la calcificació vascular [8;102;147] i ja hem demostrat en els resultats anteriors que la 1,25(OH)₂D₃ estimula la proliferació de les CMLV *in vitro*, per tant, podem pensar que l'administració de 1,25(OH)₂D₃ pot tenir un impacte important en les patologies vasculares associades a la MRC. Actualment, s'estan estudiant diferents anàlegs de la vitamina D per al tractament del HPT2 els quals han de tenir el mateix efecte inhibitor sobre la glàndula paratiroidea que la 1,25(OH)₂D₃ i a la vegada un efecte menor sobre la calcèmia i la fosfatèmia per evitar la calcificació vascular. Un d'aquests anàlegs és el paricalcitol o 19-nor-1,25(OH)₂D₂, el qual, tant en estudis clínics com experimentals s'ha demostrat que suprimeix la secreció de PTH amb menor incidència en la calcèmia i fosfatèmia [22;105;114;169;171;179]. A més, en un estudi recent de Teng *et al* [182] s'observa un augment en la supervivència de pacients en diàlisi tractats amb 19-nor-1,25(OH)₂D₂ comparats amb pacients tractats amb 1,25(OH)₂D₃ i aquest

avantatge sembla ser independent dels nivells de calci, fòsfor i PTH, es a dir, que es va obtenir un efecte beneficiós del 19-nor-1,25(OH)₂D₂ tant en pacients amb els nivells d'aquests metabòlits elevats com amb pacients amb nivells normals. Això pot suggerir que l'efecte en la supervivència del 19-nor-1,25(OH)₂D₂ pot no estar relacionat amb el metabolisme mineral. A més, aquest efecte beneficiós del 19-nor-1,25(OH)₂D₂ es va observar en diferents grups de pacients que es troben dins dels grups de factor de risc per la MRC, com pacients de raça negra i diabètics, i alhora es va associar amb menor grau de mortalitat per causes cardiovasculars i infeccioses.

Per això, l'objectiu d'aquesta part de l'estudi és comparar l'efecte de la 1,25(OH)₂D₃ i del 19-nor-1,25(OH)₂D₂ en el procés de proliferació i calcificació de les CMLV. El primer que hem observat és que el 19-nor-1,25(OH)₂D₂ no estimula la proliferació de les CMLV *in vitro* en cap de les concentracions afegides al cultiu en comparació a la 1,25(OH)₂D₃, que va mostrar un efecte dosi depenent. Després vàrem analitzar els efectes de la 1,25(OH)₂D₃ i l'anàleg en la proliferació de les CMLV en els anells d'artèria aorta (explants). En aquest cas vàrem quantificar els nuclis positius després de l'immunofluorescència amb l'anticòs per a BrdU, i l'índex de proliferació el vàrem obtenir a partir de la relació nuclis positius respecte als nuclis totals comptats rera la tinció per Hoechst. Vàrem observar que l'anàleg no provoca l'increment de nuclis proliferatius causat pel tractament amb 1,25(OH)₂D₃ i que no existeixen diferències significatives respecte el control. Els efectes diferencials de l'anàleg de la vitamina D en la proliferació cel·lular estan estudiats en el cas de les cèl·lules tumorals com en càncer de pròstata on Swamy *et al* [176] observen un major efecte en l'inhibició de la proliferació induït per l'anàleg de la vitamina D degut a una interacció més forta entre el VDR i els factors de transcripció, RXR i GRIP1. En el cas de l'os, Ryhanen *et al* [153], treballen amb cèl·lules MG-63 (cèl·lules d'osteosarcoma humà) i determinen que l'anàleg EB1089 és més potent inhibint la proliferació ja que atura les cèl·lules MG-63 en la fase G1 del cicle cel·lular. No obstant no es coneix el pas diferencial en el qual els anàlegs de la vitamina D es comporten més o menys activament que la 1,25(OH)₂D₃. Pel que fa el procés de calcificació, vàrem analitzar l'efecte directe dels dos compostos observant que només la 1,25(OH)₂D₃ augmenta el contingut de calci en les CMLV. Ja està demostrat per Jono *et al* [87] que la 1,25(OH)₂D₃ incrementa la calcificació en les CMLV, en els nostres experiments els nivells de calci incorporats en les cèl·lules és menor que

en els experiments de Jono *et al*, això podria explicar-se degut al diferent origen de les cèl·lules (boví *versus* rata). Es coneixen també altres processos en els quals el 19-nor-1,25(OH)₂D₂ té un efecte diferencial respecte la 1,25(OH)₂D₃, com en el transport de calci i fòsfat en el intestí [20], on el 19-nor-1,25(OH)₂D₂ es menys potent en induir l'expressió genètica de Calbindina D9k i PMCA1, gens implicats en el transport de calci. Això podria explicar, al menys parcialment, aquest efecte diferencial. Es coneix que el procés de calcificació vascular es un procés actiu que implica la expressió de gens relacionats amb el metabolisme ossi que estimularan el canvi fenotípic de les CMLV a cèl·lules semblants a osteoblasts. Tal i com hem descrit en la introducció, dins dels factors de transcripció osteoblàstics i/o osteoclàstics que intervenen en aquest procés trobem el BMP2, OPG i RANKL, entre d'altres. La 1,25(OH)₂D₃ induïx l'expressió de RANKL, una citoquina essencial per el desenvolupament de osteoclasts, en les cèl·lules osteoblàstiques [180;199], per això ens va fer pensar que podria ser un dels mediadors d'aquest procés. Resultats preliminars del nostre laboratori demostren que 1,25(OH)₂D₃ incrementa el mRNA de RANKL unes 5 vegades comparat amb les CMLV sense tractament i que en canvi el 19-nor-1,25(OH)₂D₂ només doble aquests increment d'expressió. Aquest resultat podria ser part de l'explicació de les diferències en la calcificació de les CMLV. L'últim punt de la discussió es centra en quin podria ser el mecanisme de selectivitat dels anàlegs, ja que tot i que encara queda per estudiar l'efecte dels anàlegs en els processos cel·lulars existeixen diversos punts en la via d'activació de la vitamina D on poden estar aquestes diferències i podrien explicar els diferents comportaments.

4. EVIDÈNCIES IN VIVO DELS EFECTES DE LA 1,25(OH)₂D₃ I EL 19-NOR-1,25(OH)₂D₂ SOBRE LES CMLV I LA PARET VASCULAR

Finalment per a concretar aquestes diferències i definir l'efecte proliferatiu de la 1,25(OH)₂D₃ ens vàrem plantejar analitzar aquest procés *in vivo*. El model animal per la MRC més usat en nefrologia experimental es la reducció de 5/6 parts de la massa renal. Les tècniques més utilitzades per aconseguir aquesta reducció son la resecció dels pols de manera quirúrgica o per infart, per lligació de les branques arterials. La lligació és una tècnica complicada i que exigeix un equip especial, com les lents d'augment, a més a més, l'heterogeneïtat de l'arbre arterial fa que aquesta sigui una tècnica inexacta. En el cas de la resecció dels pols, es pot controlar millor

la massa renal eliminada però existeix una probabilitat molt alta de mort a causa de les hemorràgies produïdes per la tècnica. En un article recent de Liu *et al* [104] analitzen les variacions que es poden trobar en aquests dos models i en el cas d'infart troben una gran variació en l'aclariment de creatinina de manera que en el mateix grup mostraven animals amb fracàs renal sever juntament amb altres els quals tenien la funció renal normal. Existeix també una tercera tècnica la criointervenció [95], en la qual s'elimina el risc d'hemorràgia congelant el parènquima renal i s'aconsegueix un nivell estable i reproduïble de fracàs renal. Però en aquest cas el principal desavantatge es la necessitat d'un equip especial que fa que la tècnica no estigui disponible per a alguns investigadors.

En el cas de la tècnica usada en el nostre treball, lligació del parènquima renal en ambdós pols del ronyó, aconseguim una disminució de l'aclariment de creatinina al voltant d'un 50%, que correspon a una etapa 3 en pacients amb MRC. A més a més, altres paràmetres usats com a marcadors de malaltia renal també varien, com l'excreció d'albúmina augmentada i nivells de PTH intacta incrementats però acompanyat d'una disminució dels nivells de fòsfor i un lleuger increment dels nivells de calci. Aquests dos últims paràmetres es troben típicament invertits en l'hiperparatiroidisme secundari avançat associat a la MRC. Des del 1971 està vigent la hipòtesis "*trade off*" [167] que es basa en què al disminuir el filtrat glomerular existeix una acumulació de fòsfor que provocarà la conseqüent hipocalcèmia, això indueix la secreció de PTH que afavoreix la fosfatúria i per tant la disminució de fòsfor al sèrum i el pertinent increment de calci fins aconseguir un estat de normofosfatèmia i normocalcèmia. Aquesta situació es mantindrà a expenses dels nivells elevats de PTH. Amb el progrés de la MRC, generalment quan la filtració glomerular disminueix a menys del 20% del normal, s'acumularà més fòsfor i per tant aniran incrementant els nivells de PTH. En el nostre cas observem hipofosfatèmia i increment de calci que no es podria explicar per aquesta teoria. A més a més d'aquests resultats, Craver *et al* [40] del servei de Nefrologia de l'Hospital Arnau de Vilanova han publicat els resultats d'un estudi clínic amb dades de 1836 pacients on observen un increment dels nivells de calci, disminució del fòsfor i de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ acompanyat d'un increment considerable de la PTH, de manera similar al que ocorre en el HPT primari, en sèrums de pacients amb diferents graus de MRC, des de l'estadi 1 al estadi 5. El primer que observen és que diversos paràmetres

del metabolisme mineral es troben precoçment alterats. En particular, els nivells de PTH i $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en el sèrum i de calci i fòsfor en l'orina varien ja en els estadis inicial (1 i 2) i segueixen la tendència fins l'estadi 5. A partir d'aquests resultats i dels nostres resultats podríem hipotetitzar, tal i com s'observa a la Figura 18 que en estadis inicials de la patologia disminueix el filtrat glomerular i existeix un mecanisme el qual encara no s'ha determinat, que estimula la secreció inicial de PTH. Això provoca l'eliminació de fòsfor per l'orina (fosfatúria) i per tant hipofosfatèmia amb el conseqüent increment dels nivells de calci. En avançar la MRC, el ronyó es troba incapacitat per eliminar el fòsfor de manera que s'acumula provocant la hiperfosfatèmia i hipocalcèmia. Un d'aquests factors que podrien estimular la secreció precoç de PTH és la disminució de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ que es troba en dèficit ja des dels primers estadis de la malaltia [139;174]. A part existeixen molts altres factors desconeguts en la urèmia que podrien ser responsables d'aquest efecte.

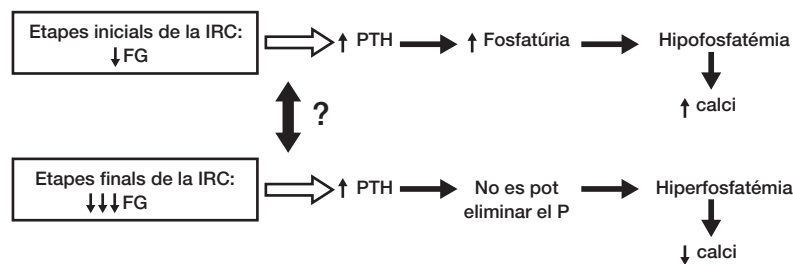


Figura 18. Hipòtesis possible dels factors que intervenen en la patogènia del HPT2 en l'MRC.

Diferències en el procés de proliferació in vivo segons el tractament

Degut als resultat anteriors on observem que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ estimula la proliferació de les CMLV tant en els experiments *in vitro* com *ex vivo* i que aquesta proliferació no va ser observada en el tractament amb 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$, vàrem dissenyar els experiments *in vivo* per analitzar la proliferació en les CMLV de la paret arterial. Vàrem determinar els nuclis positius (proliferant) per immunofluorescència per Ki67, una proteïna nuclear que s'expressa durant les diferents fases del cicle cel·lular excepte en G0 on les cèl·lules són negatives per aquesta proteïna. Està demostrat que el 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ és 3 vegades menys efectiu que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en la inhibició de la PTH [115], pel que els tractaments amb 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$

en malalts amb MRC en HPT2 acostumen a ésser amb dosi tres vegades més altes. Vàrem analitzar la proliferació de les CMLV d'artèries de rates (índex de proliferació: nuclis positius per Ki67 en relació als nuclis totals tenyits amb Hoechst) amb MRC les quals van ser tractades amb $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i una dosi tres vegades major de 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$, observant una clara diferència al comparar l'índex de proliferació de les CMLV entre les rates tractades amb $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i les rates tractades amb 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$. L'estimulació de la proliferació de les CMLV *in vivo* pel 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ és molt menor que en el tractament amb $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

En les patologies vasculars és important el fenomen de remodelació vascular que comprèn les diferents maneres de canvis estructurals en la paret dels vasos que resulta en un augment de la relació paret/llum. En aquest procés de remodelació vascular existeix proliferació o creixement de la mitja vascular, la qual cosa condueix a una disminució de la llum [84]. Per aquesta raó vàrem analitzar a partir dels talls transversals d'artèria aorta, la ràtio túnica mitja/lumen, observant un increment d'aquesta ràtio en les rates tractades amb $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ que no va ser observat en les tractades amb 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$. Per tant, els resultats exposats anteriorment demostren que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, a diferència del 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$, indueix augment de la proliferació de les CMLV tant *in vitro* com *ex vivo* i *in vivo*. Aquest increment podria traduir-se en alteracions anatòmiques i efectes funcionals importants en el sistema cardiovascular al disminuir la llum del vas i la capacitat del vas de modelar-se al flux sanguini.

Diferències en el procés de calcificació in vivo segons el tractament

Està demostrat que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pot produir hipercalcèmia i incrementa considerablement la calcificació de les artèries. En quant al 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ està també descrit que és un anàleg menys hipercalcemiant [169] però els seus efectes sobre la calcificació arterial no es coneixen. Estudis clínics i experimentals demostren que valors alts de producte CaXP estan associats a calcificació vascular [59;91]. En el nostre estudi hem utilitzat dosis d'ambdós compostos en proporció 1:3, que produïen augments similars dels nivells de calci plasmàtic, eliminant així la variable d'aportació dels nivells alts de CaXP sobre la calcificació arterial. Analitzant els nivells de calci i fòsfor del sèrum de les rates tractades vàrem observar un

increment significatiu de calci en ambdós casos, i en canvi no es va detectar un increment significatiu en els nivells de fòsfor en cap dels dos tractaments. En valorar l'àrea arterial calcificada en els tres grups, vàrem observar un clar increment de calcificació en les rates tractades amb $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, però no així en les rates tractades amb 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$. Per tant, en el nostre estudi tot i que no hem observat diferències en els nivells de calci i fòsfor en el sèrum, sí hem observat diferències en la calcificació vascular entre els dos tractaments. Tot i que encara no podem explicar el perquè d'aquests efectes diferencials, es coneixen factors protectors de la calcificació que en podrien ser els causants, com la fetuina-A, que actua com tampó del calci i fòsfor del sèrum unint-se al calci i al fòsfor extra en estats de súper saturació del sèrum [125]. A més, s'ha correlacionat el procés de calcificació vascular en el qual intervé la vitamina D amb la disminució de fetuina-A en circulació [143]. També es troben altres factors que ajuden a inhibir la calcificació extra, la proteïna de matriu gla (*matrix gla protein*, MGP) que inhibeix aquest procés modulant l'activitat de la proteïna morfogenètica de l'os 2 (*bone morphogenic protein-2*, BMP2), l'efecte de la qual com a inductor de la calcificació vascular és conegut [125]. Per tant, l'augment de calci en el sèrum de les rates tractades amb 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$, sense aparent calcificació en la paret arterial, ens suggereix que pot existir una resposta diferencial que podria ser deguda a efectes específics i diferents de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i els anàlegs sobre aquestes proteïnes protectores de la calcificació. En quant al sistema OPG/RANK/RANKL es coneix que la Osteoprotegerina (OPG) pot ser produïda per diferents teixits entre ells el sistema cardiovascular, el ronyó, el pulmó, els intestins i l'os. L'OPG exerceix un efecte inhibidor en la reabsorció de l'os per la unió amb RANKL. RANK (receptor de RANKL) s'expressa en la membrana plasmàtica de les cèl·lules osteoclàstiques i els seus precursors, de manera que quan s'allibera OPG per les cèl·lules osteoblàstiques, aquest s'uneix a RANKL impedit la unió amb el seu receptor i per tant inhibint el procés d'osteoclastogènesis. En el cas de l'os, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibeix l'expressió d'OPG i incrementa la de RANKL de manera que es formen osteoclasts encarregats de la reabsorció de l'os i l'alliberament de calci. Quan parlem de vasos tot es una mica més complicat i menys estudiat, està descrit que els ratolins "Knockout" per OPG presenten osteoporosis i calcificació vascular de l'artèria aorta i renal [25]. A més a més, en artèries normals no tenim expressió de RANK ni RANKL, però sí que apareixen en zones calcificades

tant en humans com animals. Price et al [142] estudien l'efecte de OPG en animals tractats amb vitamina D i observen una clara inhibició de la calcificació induïda per vitamina D en teixit vascular i pulmonar en les rates tractades amb OPG i vitamina D al mateix temps. Amb els seus resultats dedueixen que l'OPG podria inhibir la calcificació arterial per inhibició de la reabsorció òssia. En el nostre cas, com hem comentat anteriorment, només tenim experiments preliminars *in vitro* on vàrem detectar un increment de la proteïna RANKL en les cèl·lules tractades amb $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ superior que en les cèl·lules tractades amb $19\text{-nor-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$. Aquest increment de RANKL pot donar-se per un increment de l'expressió genètica o per un increment del nombre de CMLV que han set modificades fenotípicament a cèl·lules semblants a osteoblasts i això pot comportar un increment de la calcificació vascular.

Efectes sobre la pressió arterial en les rates amb MRC

Existeix una relació entre la proliferació i calcificació vascular amb la hipertensió [175], així com entre augments de la pressió de pols (PP) i arteriosclerosi, pel que és important controlar la tensió arterial dels animals experimentals. Hem mesurat la PAS i la PAD de les rates tractades amb $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $19\text{-nor-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ i solució salina, i en ambdós tractaments hem observat un increment significatiu de la PAS. No obstant això, les rates tractades amb $19\text{-nor-}1,25(\text{O})_2\text{D}_2$ van mostrar un increment significatiu de la PAD que no vàrem observar en el tractament amb $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Aquestes diferències es van traduir en diferències en la pressió del pols (PP). Vàrem observar que les rates tractades amb $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ presentaven un increment significatiu de la PP que no es va observar en les rates tractades amb $19\text{-nor-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$, probablement a causa de la rigidesa de l'artèria provocada per l'augment de proliferació i/o calcificació. Recentment, s'ha demostrat que la PP és un predictor independent del risc cardiovascular i de mortalitat [129], pel que considerem important el fet que el tractament amb $19\text{-nor-}1,25(\text{O})_2\text{D}_2$, a diferència de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, no modifiqui la PP comparat amb les rates control. Aquests resultats estarien d'acord amb estudis clínics que associen el tractament amb $19\text{-nor-}1,25(\text{O})_2\text{D}_2$ amb una major supervivència en pacients en hemodiàlisi respecte al tractament amb $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, on es va observa un increment en la mortalitat deguda a patologies cardiovasculars [182].

5. QUIN POT SER EL MECANISME DE SELECTIVITAT DEL ANÀLEG DE LA VITAMINA?

Existeixen nombrosos estudis que descriuen efectes diferencials entre els anàlegs de la vitamina D respecte el metabòlit de la vitamina D activa. Particularment, trobem estudis comparatius de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i $19\text{-nor-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ com el de Brown *et al* [20] on demostren que el $19\text{-nor-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ és unes 10 vegades menys efectiu que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en l'estimulació de l'absorció de calci i fosfat en l'intestí i a més a més una part d'aquesta diferència es podria explicar per la menor potència del $19\text{-nor-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ a l'hora de induir l'expressió de gens relacionats amb aquest procés com la Calbindin D ó PMCA1. Anteriorment en aquest mateix grup havien demostrat que l'anàleg es també unes 10 vegades menys efectiu en la mobilització del calci i el fosfat en l'os *in vivo* [58;73]. A més, també s'ha demostrat que encara que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ augmenta els nivells de VDR intestinal, l'anàleg $19\text{-nor-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ té l'efecte oposat [179]. A la vegada també existeixen estudis com el Finch *et al* [58] que investiguen el procés de diferenciació i l'expressió de marcadors de formació òssia en la línia cel·lular de osteoblast-like humana (MG-63) i en aquest cas no es van observar diferències al tractar les cèl·lules amb $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o $19\text{-nor-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$. Per tant, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i $19\text{-nor-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ mostren efectes diferencials segons el teixit i/o gen diana, però el mecanisme responsable encara no es coneix, doncs no s'ha determinat el punt de la via de senyalització de la vitamina D on el comportament del $19\text{-nor-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ difereix del de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Tal i com hem descrit en la introducció, existeixen diversos punts en la via d'activació de la vitamina D que podrien ser importants pel comportament diferencial dels metabòlits i anàlegs de la vitamina D i que podrien traduir-se en efectes distints *in vivo*. Els podem resumir, com es pot observar en la figura 18, en: 1) La unió a la proteïna DBP (proteïna d'unio de la vitamina D) de manera que el transport de l'anàleg per la circulació sanguínia pot ser més o menys efectiu, tanmateix l'entrada dels lligands dins la cèl·lula diana. No obstant això, es coneix que l'afinitat del $19\text{-nor-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ a la DBP és similar a la de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [168]. A més, mentre el 99% dels components naturals de la vitamina D es troben units a la DBP en circulació, altres proteïnes podrien jugar un paper en el transport dels anàlegs. Aquestes unions, sobretot a albúmina i algunes lipoproteïnes, tindrien un efecte important en el maneig dels diferents compostos i en el seva farmacocinètica. Tot

i que no existeixen gaires articles que parlin d'aquestes unions, Teramoto *et al* [183] demostren que l'anàleg OCT s'uneix a Lipoproteïnes de Baixa Densitat (*Low-density protein*, LDL) i probablement utilitza els receptors de LDL per entrar a les cèl·lules. 2) L'afinitat pel VDR que pot causar una disminució, o fins i tot eliminar totalment la resposta als anàlegs. Això podria explicar les diferències que s'observen en anàlegs com l'OCT on detecten unes 8 vegades menys afinitat pel VDR. En relació amb això trobem el treball de Isa *et al* [86] on estudien l'afinitat de diferents anàlegs de la vitamina D i la seva activitat transactivadora. Observen que existeixen anàlegs amb baixa afinitat pel VDR però alta activitat a l'hora d'activar la transcripció genètica, com en el cas del 19-nor-1,25-(OH)₂D₂. 3) Canvis conformationals del VDR al unir-se el lligand que afavoreixi o desfavoreixi primer la unió amb els VDRE i després el reclutament dels coactivadors transcripcionals nuclears, resultant en diferències en la transcripció dels gens regulats per la vitamina D i intervinguts pel VDR [181]. A més a més, també s'han descrit anàlegs de la vitamina D, com el KH1060, el qual al unir-se al VDR provoca un canvi conformational que incrementa la vida mitja del mateix receptor [190] comparant amb la 1,25(OH)₂D₃, això també podria explicar, en part, la major potència biològica d'aquest anàleg.

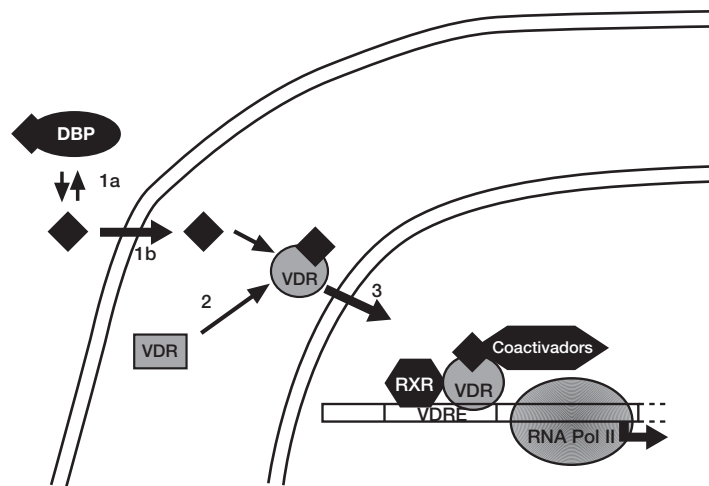


Figura 18. Possibles punts de la via d'activació de la vitamina D on els anàlegs poden produir les accions cel·lulars i/o gen específiques. (1a) Unió a les proteïnes del sèrum majoritàriament la DBP, (1b) entrada dels compostos a les cèl·lules diana, (2) unió al VDR i (3) heterodimerització amb el receptor RXR i/o reclutament del coactivadors/correpressors.

Aquestes característiques poden donar als anàlegs de la vitamina D efectes diferencials respecte teixits i/o cèl·lules diana. Ma *et al* [110] estudien els efectes diferencials de dos anàlegs de la vitamina D en diferents tipus cel·lulars com queratinòcits, cèl·lules d'osteosarcoma i cèl·lules intestinals on observen potències diferents segons el teixit, és a dir, encara que els anàlegs són menys potents que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a l'hora d'induir la heterodimerització del VDR-RXR en les cèl·lules SaOS-1 (cèl·lules d'osteosarcoma) i l'expressió de CYP24 endogen en queratinòcits; inhibeixen amb més potència la proliferació dels queratinòcits comparat amb la forma activa de la vitamina D. Una petita explicació d'aquestes diferències podria ser per la interacció amb els cofactors: aquest mateix grup a partir de l'anàlisi per sistemes de doble-híbrid, determinen la unió dels cofactors al VDR-ligand i en el cas dels dos anàlegs amb els que treballa aquest grup observen que depenent de l'anàleg es recluten millor uns coactivadors o altres. També el grup de Issa *et al* [86] utilitzen aquesta tècnica per analitzar la interacció amb diferents coactivadors i observen una forta correlació entre els anàlegs que indueixen l'heterodimerització (VDR-RXR) amb el reclutament de GRIP1 (és un dels coactivadors que interactua amb els receptors hormonals nuclears de manera depenent al lligand i del domini AF2 d'aquests receptors). També observen que existeixen diferents anàlegs de la vitamina D més potents que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a l'hora de reclutar coactivadors, com en el cas del 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ el qual indueix la formació de l'heterodímer i la unió del cofactor GRIP1 amb més eficiència que la pròpia vitamina D activa. Resumint, podríem dir que tot i que encara resta per estudiar, el canvi conformacional provocat per la unió del lligand al VDR es un pas molt important a l'hora de dimeritzar i de reclutar els coactivadors i/o corepressors de la transcripció, i aquest procés es totalment depenent de l'anàleg utilitzat.

Per tant, els nostres resultats mostren que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ incrementa la proliferació de les CMLV *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*, i en aquest procés intervé el factor de creixement VEGF. L'anàleg no hipercalcemiant de la vitamina D, el 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ no presenta aquest efecte proliferador. En quant a la calcificació *in vivo*, com ja sabíem, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ estimula aquest procés però no observem el mateix efecte en les rates tractades amb 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ a dosis hipercalcemiantes. També hem pogut observar aquest efecte diferencial del 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ respecte a la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en l'arquitectura vascular i la seva funcionalitat. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

provoca un increment de la ràtio mitja/lumen que pot ser degut tant a un procés de proliferació com calcificació i això es tradueix en un increment de la PP en les rates tractades amb $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ que no és observat en el tractament amb 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$. Tot això suggereix que el 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ té menors efectes nocius sobre el teixit vascular que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

— |

| —

— |

| —

Conclusions

— |

| —

— |

| —

Primera. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ estimula la proliferació de les CMLV.

Segona. El VEGF és el factor responsable de la proliferació induïda per la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en les CMLV.

Tercera. Existeix un VDRE en el promotor del gen del VEGF.

Quarta. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ incrementa la PP en les rates amb MRC degut a l'increment de proliferació i calcificació en la paret dels vasos. La PP s'utilitza com a factor pronòstic del risc cardiovascular.

Cinquena. El 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ no estimula la proliferació de las CMLV.

Sisena. El 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ té un efecte menor en el procés de calcificació de les CMLV que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

— |

| —

— |

| —

— |

| —

— |

| —

A

1. Abe H, Iehara N, Utsunomiya K, Kita T, Doi T: A vitamin D analog regulates mesangial cell smooth muscle phenotypes in a transforming growth factor-beta type II receptor-mediated manner. *J.Biol.Chem.* 274:20874-20878, 1999
2. Adams JS, Gacad MA: Characterization of 1 alpha-hydroxylation of vitamin D₃ sterols by cultured alveolar macrophages from patients with sarcoidosis. *J.Exp.Med.* 161:755-765, 1985
3. Al Aly Z, Edwards JC: Vascular biology in uremia: insights into novel mechanisms of vascular injury. *Adv.Chronic.Kidney Dis.* 11:310-318, 2004
4. Amann K, Wolf B, Nichols C, Tornig J, Schwarz U, Zeier M, Mall G, Ritz E: Aortic changes in experimental renal failure: hyperplasia or hypertrophy of smooth muscle cells? *Hypertension* 29:770-775, 1997
5. Amar J, Chamontin B, Vernier I, Lenfant V, Conte J, Salvador M: Arterial Distensibility, Circadian Blood-Pressure Pattern and Blood-Pressure Variability in Patients with End-Stage Renal-Disease. *Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux* 87:921-924, 1994
6. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L: A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390:175-179, 1997
7. Andress DL, Norris KC, Coburn JW, Slatopolsky EA, Sherrard DJ: Intravenous Calcitriol in the Treatment of Refractory Osteitis Fibrosa of Chronic Renal-Failure. *New England Journal of Medicine* 321:274-279, 1989

B

8. Bajwa GS, Morrison LM, Ershoff BH: Induction of aortic and coronary atherosclerosis in rats fed a hypervitaminosis D, cholesterol-containing diet. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 138:975-982, 1971
9. Berndt T, Craig TA, Bowe AE, Vassiliadis J, Reczek D, Finnegan R, De Beur SMJ, Schiavi SC, Kumar R: Secreted frizzled-related protein 4 is a potent tumor-derived phosphaturic agent. *Journal of Clinical Investigation* 112:785-794, 2003
10. Bethesda M, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases: Causes of Death. Annual Data Report. *US Renal Data System* 14:79-90, 1995
11. Bikle DD: Clinical Counterpoint - Vitamin-D - New Actions, New Analogs, New Therapeutic Potential. *Endocrine Reviews* 13:765-784, 1992
12. Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, Safar ME, London GM: Impact of aortic stiffness on survival in end-stage renal disease. *Circulation* 99:2434-2439, 1999
13. Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK: Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. *Am.J.Kidney Dis.* 31:607-617, 1998
14. Block GA, Port FK: Re-evaluation of risks associated with hyperphosphatemia and hyperparathyroidism in dialysis patients: Recommendations for a change in management. *American Journal of Kidney Diseases* 35:1226-1237, 2000
15. Bostrom K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL: Bone Morphogenetic Protein Expression in Human Atherosclerotic Lesions. *Journal of Clinical Investigation* 91:1800-1809, 1993

16. Bouillon R, Okamura WH, Norman AW: Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr.Rev.* 16:200-257, 1995
17. Bourdeau A, Atmani F, Grosse B, Lieberherr M: Rapid Effects of 1,25-Dihydroxyvitamin-D₃ and Extracellular Ca-2+ on Phospholipid-Metabolism in Dispersed Porcine Parathyroid Cells. *Endocrinology* 127:2738-2743, 1990
18. Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E: Selective Vitamin-D Analogs and Their Therapeutic Applications. *Seminars in Nephrology* 14:156-174, 1994
19. Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E: Vitamin D. *Am.J.Physiol* 277:F157-F175, 1999
20. Brown AJ, Finch J, Slatopolsky E: Differential effects of 19-nor-1,25-dihydroxyvitamin D(2) and 1,25-dihydroxyvitamin D(3) on intestinal calcium and phosphate transport. *J.Lab Clin.Med.* 139:279-284, 2002
21. Brown AJ, Krits I, Armbrrecht HJ: Effect of age, vitamin D, and calcium on the regulation of rat intestinal epithelial calcium channels. *Arch.Biochem.Biophys.* 437:51-58, 2005
22. Brown AJ, Ritter C, Slatopolsky E, Muralidharan KR, Okamura WH, Reddy GS: 1Alpha,25-dihydroxy-3-epi-vitamin D₃, a natural metabolite of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃, is a potent suppressor of parathyroid hormone secretion. *J.Cell Biochem.* 73:106-113, 1999
23. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF, Senger DR, Connolly JL, Schnitt SJ: Expression of Vascular-Permeability Factor (Vascular Endothelial Growth-Factor) and Its Receptors in Breast-Cancer. *Human Pathology* 26:86-91, 1995
24. Brumbaugh PF, Haussler MR: 1 Alpha,25-Dihydroxycholecalciferol Receptors in Intestine .1. Association of 1 Alpha,25-Dihydroxycholecalciferol with Intestinal-Mucosa Chromatin. *Journal of Biological Chemistry* 249:1251-1257, 1974

25. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS: osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 12:1260-1268, 1998
26. Burke AP, Taylor A, Farb A, Malcom GT, Virmani R: Coronary calcification: insights from sudden coronary death victims. *Zeitschrift fur Kardiologie* 89:49-53, 2000

C

27. Campbell GR, Campbell JH: Vascular smooth muscle and arterial calcification. *Zeitschrift fur Kardiologie* 89:54-62, 2000
28. Canalejo A, Almaden Y, Torregrosa V, Gomez-Villamandos JC, Ramos B, Campistol JM, Felsenfeld AJ, Rodriguez M: The in vitro effect of calcitriol on parathyroid cell proliferation and apoptosis. *J.Am.Soc.Nephrol.* 11:1865-1872, 2000
29. Carlberg C: The concept of multiple vitamin D signaling pathways. *J.Investig.Dermatol.Symp.Proc.* 1:10-14, 1996
30. Carswell, S. Vitamin D in the nervous system: action and therapeutic potencial. In: *Vitamin D*, edited by D. Feldman, F. Glorieux, and J.W. Pike. San Diego: Academic. 1197-1211. 1997.
31. Carthy EP, Yamashita W, Hsu A, Ooi BS: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and rat vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension* 13:954-959, 1989
32. Cheng SL, Shao JS, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA: MSX2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors. *J.Biol.Chem.* 278:45969-45977, 2003

33. Chertow BS, Sivitz WI, Baranetsky NG, Clark SA, Waite A, Deluca HF: Cellular mechanisms of insulin release: the effects of vitamin D deficiency and repletion on rat insulin secretion. *Endocrinology* 113:1511-1518, 1983
34. Chung JY, Song Y, Wang Y, Magness RR, Zheng J: Differential expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), endocrine gland derived-VEGF, and VEGF receptors in human placentas from normal and preeclamptic pregnancies. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 89:2484-2490, 2004
35. Colston KW, Berger U, Coombes RC: Possible role for vitamin D in controlling breast cancer cell proliferation. *Lancet* 1:188-191, 1989
36. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J: Tumor Vascular-Permeability Factor Stimulates Endothelial-Cell Growth and Angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation* 84:1470-1478, 1989
37. Cordero JB, Cozzolino M, Lu Y, Vidal M, Slatopolsky E, Stahl PD, Barbieri MA, Dusso A: 1,25-Dihydroxyvitamin D down-regulates cell membrane growth- and nuclear growth-promoting signals by the epidermal growth factor receptor. *J.Biol.Chem.* 277:38965-38971, 2002
38. Couffinhal T, Kearney M, Witzendichler B, Chen D, Murohara T, Losordo DW, Symes J, Isner JM: Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) in normal and atherosclerotic human arteries. *Am.J.Pathol.* 150:1673-1685, 1997
39. Cozzolino M, Gallieni M, Corsi C, Bastagli A, Brancaccio D: Management of calcium refilling post-parathyroidectomy in end-stage renal disease. *J.Nephrol.* 17:3-8, 2004
40. Craver L, Marco MP, Martinez I, Rue M, Borrás M, Martín M, Sarro F, Valdivielso JM, Fernández E: Mineral Metabolism parameters throughout chronic kidney diseases stages 1 to 5: Achievement of K/DOQI target ranges. *Nephrol.Dial.Transplant.* In Press: 2006

41. Cross HS, Bareis P, Hofer H, Bischof MG, Bajna E, Kriwanek S, Bonner E, Peterlik M: 25-Hydroxyvitamin D(3)-1alpha-hydroxylase and vitamin D receptor gene expression in human colonic mucosa is elevated during early cancerogenesis. *Steroids* 66:287-292, 2001

D

42. Danielsson C, Mathiasen IS, James SY, Nayeri S, Bretting C, Hansen CM, Colston KW, Carlberg C: Sensitive induction of apoptosis in breast cancer cells by a novel 1,25-dihydroxyvitamin D-3 analogue shows relation to promoter selectivity. *Journal of Cellular Biochemistry* 66:552-562, 1997
43. Davies MR, Hruska KA: Pathophysiological mechanisms of vascular calcification in end-stage renal disease. *Kidney International* 60:472-479, 2001
44. Delissalde F, Hernandez MA, Barron A, Bermejo L, Arias J, Halhali A, Castro I: Vitamin D induces proliferation in rat endometrium cultured cells. *Revista de Investigacion Clinica* 50:113-118, 1998
45. Delmez JA, Slatopolsky E: Hyperphosphatemia - Its Consequences and Treatment in Patients with Chronic Renal-Disease. *American Journal of Kidney Diseases* 19:303-317, 1992
46. Deluca HF, Ostrem V: The relationship between the vitamin D system and cancer. *Adv.Exp.Med.Biol.* 206:413-429, 1986
47. Detmar M, Brown LF, Claffey KP, Yee KT, Kocher O, Jackman RW, Berse B, Dvorak HF: Overexpression of Vascular-Permeability Factor Vascular Endothelial Growth-Factor and Its Receptors in Psoriasis. *Journal of Experimental Medicine* 180:1141-1146, 1994
48. Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, Cleutjens KB, Geusens PP, Kitslaar PJ, Tordoir JH, Spronk HM, Vermeer C, Daemen MJ: Differential expression of

- bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 21:1998-2003, 2001
49. Dunlop TW, Vaisanen S, Frank C, Molnar F, Sinkkonen L, Carlberg C: The human peroxisome proliferator-activated receptor delta gene is a primary target of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ and its nuclear receptor. *J.Mol.Biol.* 349:248-260, 2005
50. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E: Vitamin D. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 289:F8-F28, 2005
51. Dusso AS, Finch J, Brown A, Ritter C, Delmez J, Schreiner G, Slatopolsky E: Extrarenal production of calcitriol in normal and uremic humans. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 72:157-164, 1991
52. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM: Vascular-Permeability Factor Vascular Endothelial Growth-Factor, Microvascular Hyperpermeability, and Angiogenesis. *American Journal of Pathology* 146:1029-1039, 1995

E

53. Edmonds ME, Morrison N, Laws JW, Watkins PJ: Medial Arterial Calcification and Diabetic Neuropathy. *British Medical Journal* 284:928-930, 1982
54. Essary LR, Wick MR: Cutaneous calciphylaxis. An underrecognized clinicopathologic entity. *Am.J.Clin.Pathol.* 113:280-287, 2000

F

55. Ferrara N, DavisSmyth T: The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Reviews* 18:4-25, 1997
56. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* 9:669-676, 2003
57. Finch JL, Brown AJ, Slatopolsky E: Differential effects of 1,25-dihydroxy-vitamin D-3 and 19-nor-1,25-dihydroxy-vitamin D-2 on calcium and phosphorus resorption in bone. *Journal of the American Society of Nephrology* 10:980-985, 1999
58. Finch JL, Dusso AS, Pavlopoulos T, Slatopolsky EA: Relative potencies of 1,25-(OH)(2)D(3) and 19-Nor-1,25-(OH)(2)D(2) on inducing differentiation and markers of bone formation in MG-63 cells. *J.Am.Soc.Nephrol.* 12:1468-1474, 2001
59. Floege J, Ketteler M: Vascular calcification in patients with end-stage renal disease. *Nephrol.Dial.Transplant.* 19 Suppl 5:V59-V66, 2004

G

60. Gache C, Berthois Y, Cvitkovic E, Martin PM, Saez S: Differential regulation of normal and tumoral breast epithelial cell growth by fibroblasts and 1,25-dihydroxyvitamin D-3. *Breast Cancer Research and Treatment* 55:29-39, 1999
61. Gallieni M, Brancaccio D, Padovese P, Rolla D, Lamperi D, Paoletti E, Moriero, E, Bedani PL, Vitali ED, Gilli P, Colantonio G, Giura C, Martinelli D, Bronzieri C, Grassi C, Bagni B, Tarolo G: Low-Dose Intravenous Calcitriol in the Treatment of Secondary Hyperparathyroidism in Hemodialysis-Patients. *Kidney International* 41:1443, 1992

62. Gallieni M, Kamimura S, Ahmed A, Bravo E, Delmez J, Slatopolsky E, Dusso A: Kinetics of monocyte 1 alpha-hydroxylase in renal failure. *Am.J.Physiol* 268:F746-F753, 1995
63. Garland CF, Garland FC, Gorham ED: Calcium and vitamin D. Their potential roles in colon and breast cancer prevention. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 889:107-119, 1999
64. Gascon-Barre M, Demers C, Ghrab O, Theodoropoulos C, Lapointe R, Jones G, Valiquette L, Menard D: Expression of CYP27A, a gene encoding a vitamin D-25 hydroxylase in human liver and kidney. *Clinical Endocrinology* 54:107-115, 2001
65. Giachelli CM: Mechanisms of vascular calcification in uremia. *Seminars in Nephrology* 24:401-402, 2004
66. Glisson F: De Raquitide sive Morbo Puerili que vulgo. The rickets dicitur tractatus. *Adscitis in operis societatem Georgio date et Ahasuero Regemortero.* London, G Du-Gardi, 1650
67. Goodman WG, London G, Amann K, Block GA, Giachelli C, Hruska KA, Ketteler M, Levin A, Massy Z, McCarron DA, Raggi P, Shanahan CM, Yorioka N: Vascular calcification in chronic kidney disease. *American Journal of Kidney Diseases* 43:572-579, 2004
68. Guillemant J, Guillemant S: Early Rise in Cyclic-Gmp After 1,25-Dihydroxycholecalciferol Administration in the Chick Intestinal-Mucosa. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 93:906-911, 1980
69. Gurlek A, Pittelkow MR, Kumar R: Modulation of growth factor/cytokine synthesis and signaling by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3): implications in cell growth and differentiation. *Endocr.Rev.* 23:763-786, 2002

H

70. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, Dominguez CE, Jurutka PW: The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J.Bone Miner.Res.* 13:325-349, 1998
71. Hirata M, Katsumata K, Endo K, Fukushima N, Ohkawa H, Fukagawa M: In subtotaly nephrectomized rats 22-oxacalcitriol suppresses parathyroid hormone with less risk of cardiovascular calcification or deterioration of residual renal function than 1,25(OH)₂ vitamin D₃. *Nephrol.Dial.Transplant.* 18:1770-1776, 2003
72. Holick MF: Vitamin D: A millenium perspective. *J.Cell Biochem.* 88:296-307, 2003
73. Holliday LS, Gluck SL, Slatopolsky E, Brown AJ: 1,25-Dihydroxy-19-nor-vitamin D(2), a vitamin D analog with reduced bone resorbing activity in vitro. *J.Am.Soc.Nephrol.* 11:1857-1864, 2000
74. Holt PR, Arber N, Halmos B, Forde K, Kissileff H, McGlynn KA, Moss SF, Kurihara N, Fan K, Yang K, Lipkin M: Colonic epithelial cell proliferation decreases with increasing levels of serum 25-hydroxy vitamin D. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 11:113-119, 2002
75. Hruska KA, Barshavit Z, Malone JD, Teitelbaum S: Ca-2+ Priming During Vitamin-D-Induced Monocytic Differentiation of A Human-Leukemia Cell-Line. *Journal of Biological Chemistry* 263:16039-16044, 1988
76. Hruska KA, Mathew S, Saab G: Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circulation Research* 97:105-114, 2005
77. Hsu CH, Patel SR, Young EW: Mechanism of decreased calcitriol degradation in renal failure. *Am.J.Physiol* 262:F192-F198, 1992

78. Huang DC, Papavasiliou V, Rhim JS, Horst RL, Kremer R: Targeted disruption of the 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene in ras-transformed keratinocytes demonstrates that locally produced 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ suppresses growth and induces differentiation in an autocrine fashion. *Mol.Cancer Res.* 1:56-67, 2002
79. Hunt JL, Fairman R, Mitchell ME, Carpenter JP, Golden M, Khalapyan T, Wolfe M, Neschis D, Milner R, Scoll B, Cusack A, Mohler ER: Bone formation in carotid plaques - A clinicopathological study. *Stroke* 33:1214-1219, 2002
80. Ibels LS, Alfrey AC, Huffer WE, Craswell PW, Anderson JT, Weil R: Arterial Calcification and Pathology in Uremic Patients Undergoing Dialysis. *American Journal of Medicine* 66:790-796, 1979
81. Ichikawa F, Sato K, Nanjo M, Nishii Y, Shinki T, Takahashi N, Suda T: Mouse Primary Osteoblasts Express Vitamin-D-3 25-Hydroxylase Messenger-Rna and Convert 1-Alpha-Hydroxyvitamin-D-3 Into 1-Alpha,25-Dihydroxyvitamin-D-3. *Bone* 16:129-135, 1995
82. Ichikawa Y, Hiwatashi A, Nishii Y: Tissue and Subcellular Distributions of Cholecalciferol 25-Hydroxylase - Cytochrome-P-450D25-Linked Monooxygenase System. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 75:479-488, 1983
83. Iglesias A: Del raquitirismo a la vitamina D. *Rev Mex Reumat* 19:259-274, 2004
84. Intengan HD, Schiffrin EL: Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* 38:581-587, 2001

85. Ishida A, Murray J, Saito Y, Kanthou C, Benzakour O, Shibuya M, Wijelath ES: Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells. *J.Cell Physiol* 188:359-368, 2001
86. Issa LL, Leong GM, Sutherland RL, Eisman JA: Vitamin D analogue-specific recruitment of vitamin D receptor coactivators. *J.Bone Miner.Res.* 17:879-890, 2002

J

87. Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, Morii H: 1,25-dihydroxyvitamin D-3 increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide. *Circulation* 98:1302-1306, 1998

K

88. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT: Vascular-Permeability Factor, An Endothelial-Cell Mitogen Related to Pdgf. *Science* 246:1309-1312, 1989
89. Kerry DM, Dwivedi PP, Hahn CN, Morris HA, Omdahl JL, May BK: Transcriptional synergism between vitamin D-responsive elements in the rat 25-hydroxyvitamin D-3 24-hydroxylase (CYP24) promoter. *Journal of Biological Chemistry* 271:29715-29721, 1996
90. Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R, Wildberger JE, Mahnken AH, Bohm R, Metzger T, Wanner C, Jahnke-Dechent W, Floege J: Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet* 361:827-833, 2003

91. Kimura K, Saika Y, Otani H, Fujii R, Mune M, Yukawa S: Factors associated with calcification of the abdominal aorta in hemodialysis patients. *Kidney Int.Suppl* 71:S238-S241, 1999
92. Koh E, Morimoto S, Fukuo K, Itoh K, Hironaka T, Shiraishi T, Onishi T, Kumahara Y: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ binds specifically to rat vascular smooth muscle cells and stimulates their proliferation in vitro. *Life Sci.* 42:215-223, 1988
93. Kondo T, Kitazawa R, Maeda S, Kitazawa S: 1 alpha,25 dihydroxyvitamin D-3 rapidly regulates the mouse osteoprotegerin gene through dual pathways. *Journal of Bone and Mineral Research* 19:1411-1419, 2004
94. Krohn K, Haffner D, Hugel U, Himmele R, Klaus G, Mehls O, Schaefer F: 1,25(OH)(2)D-3 and dihydrotestosterone interact to regulate proliferation and differentiation of epiphyseal chondrocytes. *Calcified Tissue International* 73:400-410, 2003
95. Kumano K, Kogure K, Tanaka T, Sakai T: A New Method of Inducing Experimental Chronic-Renal-Failure by Cryosurgery. *Kidney International* 30:433-436, 1986
96. Kwiecinski GG, Petrie GI, Deluca HF: Vitamin D is necessary for reproductive functions of the male rat. *J.Nutr.* 119:741-744, 1989

L

97. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N: Vascular Endothelial Growth-Factor Is A Secreted Angiogenic Mitogen. *Science* 246:1306-1309, 1989
98. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N: Vascular Endothelial Growth-Factor Is A Secreted Angiogenic Mitogen. *Science* 246:1306-1309, 1989

99. Lieberherr M: Effects of Vitamin-D₃ Metabolites on Cytosolic Free Calcium in Confluent Mouse Osteoblasts. *Journal of Biological Chemistry* 262:13168-13173, 1987
100. Lieberherr M, Grosse B, Duchambon P, Drueke T: A Functional Cell-Surface Type Receptor Is Required for the Early Action of 1,25-Dihydroxyvitamin-D₃ on the Phosphoinositide Metabolism in Rat Enterocytes. *Journal of Biological Chemistry* 264:20403-20406, 1989
101. Lin R, White JH: The pleiotropic actions of vitamin D. *Bioessays* 26:21-28, 2004
102. Liu LB, Taylor CB, Peng SK, Mikkelsen B: Experimental arteriosclerosis in Rhesus monkeys induced by multiple risk factors: cholesterol, vitamin D, and nicotine. *Paroi.Arterielle.* 5:25-37, 1979
103. Liu M, Freedman LP: Transcriptional synergism between the vitamin D₃ receptor and other nonreceptor transcription factors. *Mol.Endocrinol.* 8:1593-1604, 1994
104. Liu ZC, Chow KM, Chang TMS: Evaluation of two protocols of uremic rat model: Partial nephrectomy and infarction. *Renal Failure* 25:935-943, 2003
105. Llach F, Yudd M: Paricalcitol in dialysis patients with calcitriol-resistant secondary hyperparathyroidism. *Am.J.Kidney Dis.* 38:S45-S50, 2001
106. London GM, Marchais SJ, Guerin AP, Metivier F: Arteriosclerosis, vascular calcifications and cardiovascular disease in uremia. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 14:525-531, 2005
107. Lucas PA, Rouillet C, Duchambon P, Lacour B, Drueke T: Rapid Stimulation of Calcium-Uptake by Isolated Rat Enterocytes by 1,25(OH)₂D₃. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 413:407-413, 1989
108. Luo Y, Raible D, Raper JA: Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 75:217-227, 1993

M

109. Ma J, Stampfer MJ, Gann PH, Hough HL, Giovannucci E, Kelsey KT, Hennekens CH, Hunter DJ: Vitamin D receptor polymorphisms, circulating vitamin D metabolites, and risk of prostate cancer in United States physicians. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 7:385-390, 1998
110. Ma Y, Khalifa B, Yee YK, Lu J, Memezawa A, Savkur RS, Yamamoto Y, Chintalacharuvu SR, Yamaoka K, Stayrook KR, Bramlett KS, Zeng QQ, Chandrasekhar S, Yu XP, Linebarger JH, Iturria SJ, Burris TP, Kato S, Chin WW, Nagpal S: Identification and characterization of noncalcemic, tissue-selective, nonsecosteroidal vitamin D receptor modulators. *J.Clin.Invest* 116:892-904, 2006
111. Malecaze F, Clamens S, Simorrepatel V, Mathis A, Chollet P, Favard C, Bayard F, Plouet J: Detection of Vascular Endothelial Growth-Factor Messenger-Rna and Vascular Endothelial Growth Factor-Like Activity in Proliferative Diabetic-Retinopathy. *Archives of Ophthalmology* 112:1476-1482, 1994
112. Malyankar UM, Scatena M, Suchland KL, Yun TJ, Clark EA, Giachelli CM: Osteoprotegerin is an alpha(v)beta(3)-induced, NF-kappa B-dependent survival factor for endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 275:20959-20962, 2000
113. Marco MP, Craver L, Betriu A, Belart M, Fibla J, Fernandez E: Higher impact of mineral metabolism on cardiovascular mortality in a European hemodialysis population. *Kidney Int.Suppl* S111-S114, 2003
114. Martin KJ, Gonzalez E, Lindberg JS, Taccetta C, Amdahl M, Malhotra K, Llach F: Paricalcitol dosing according to body weight or severity of hyperparathyroidism: a double-blind, multicenter, randomized study. *Am.J.Kidney Dis.* 38:S57-S63, 2001

115. Martin KJ, Gonzalez EA: Strategies to minimize bone disease in renal failure. *Am.J.Kidney Dis.* 38:1430-1436, 2001
116. Martinez ME, Willett WC: Calcium, vitamin D, and colorectal cancer: A review of the epidemiologic evidence. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 7:163-168, 1998
117. Massry SG, Glisson F: *Textbook of Nephrology*, fourth edition ed. 2001
118. Mattern J, Koomagi R, Volm M: Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. *British Journal of Cancer* 73:931-934, 1996
119. Mellon WS, Deluca HF: Equilibrium and Kinetic Study of 1,25-Dihydroxyvitamin-D₃ Binding to Chicken Intestinal Cytosol Employing High Specific Activity 1,25-Dihydroxy[H-3-26, 27]Vitamin-D₃. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 197:90-95, 1979
120. Mezzano D, Pais EO, Aranda E, Panes O, Downey P, Ortiz M, Tagle R, Gonzalez F, Quiroga T, Caceres MS, Leighton F, Pereira J: Inflammation, not hyperhomocysteinemia, is related to oxidative stress and hemostatic and endothelial dysfunction in uremia. *Kidney Int.* 60:1844-1850, 2001
121. Milliner DS, Zinsmeister AR, Lieberman E, Landing B: Soft tissue calcification in pediatric patients with end-stage renal disease. *Kidney Int.* 38:931-936, 1990
122. Mitsuhashi T, Morris RC, Jr., Ives HE: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ modulates growth of vascular smooth muscle cells. *J.Clin.Invest* 87:1889-1895, 1991
123. Moe SM, Duan D, Doehle BP, O'Neill KD, Chen NX: Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels. *Kidney International* 63:1003-1011, 2003

124. Moe SM, O'Neill KD, Duan D, Ahmed S, Chen NX, Leapman SB, Fineberg N, Kopecky K: Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins. *Kidney International* 61:638-647, 2002
125. Moe SM, Reslerova M, Ketteler M, O'Neill K, Duan D, Koczman J, Westenfeld R, Jahnen-Dechent W, Chen NX: Role of calcification inhibitors in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease (CKD). *Kidney Int.* 67:2295-2304, 2005
126. Monkawa T, Yoshida T, Hayashi M, Saruta T: Identification of 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene expression in macrophages. *Kidney Int.* 58:559-568, 2000
127. Morelli S, Deboland AR, Boland RL: Generation of Inositol Phosphates, Diacylglycerol and Calcium Fluxes in Myoblasts Treated with 1,25-Dihydroxyvitamin-D(3). *Biochemical Journal* 289:675-679, 1993
128. Morgan JW, Morgan DM, Lasky SR, Ford D, Kouttab N, Maizel AL: Requirements for induction of vitamin D-mediated gene regulation in normal human B lymphocytes. *J.Immunol.* 157:2900-2908, 1996

N

129. Nair GV, Chaput LA, Vittinghoff E, Herrington DM: Pulse pressure and cardiovascular events in postmenopausal women with coronary heart disease. *Chest* 127:1498-1506, 2005
130. Nakagawa N, Kinosaki M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, Morinaga T, Higashio K: RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 253:395-400, 1998
131. Nayeri S, Carlberg C: Functional conformations of the nuclear 1 α ,25-dihydroxyvitamin D-3 receptor. *Biochemical Journal* 327:561-568, 1997

132. Nayeri S, Danielsson C, Kahlen JP, Schrader M, Mathiasen IS, Binderup L, Carlberg C: The Antiproliferative Effect of Vitamin-D-3 Analogs Is Not Mediated by Inhibition of the Ap-1 Pathway, But May be Related to Promoter Selectivity. *Oncogene* 11:1853-1858, 1995
133. Nemere I, Dormanen MC, Hammond MW, Okamura WH, Norman AW: Identification of A Specific Binding-Protein for 1-Alpha,25-Dihydroxyvitamin D-3 in Basal-Lateral Membranes of Chick Intestinal Epithelium and Relationship to Transcaltachia. *Journal of Biological Chemistry* 269:23750-23756, 1994
134. Nemere I, Yoshimoto Y, Norman AW: Calcium-Transport in Perfused Duodena from Normal Chicks - Enhancement Within 14 Minutes of Exposure to 1,25-Dihydroxyvitamin-D3. *Endocrinology* 115:1476-1483, 1984
135. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb Journal* 13:9-22, 1999
136. Norman AW, Roth J, Orci L: The vitamin D endocrine system: steroid metabolism, hormone receptors, and biological response (calcium binding proteins). *Endocr.Rev.* 3:331-366, 1982
137. Nykjaer A, Dragun D, Walther D, Vorum H, Jacobsen C, Herz J, Melsen F, Christensen EI, Willnow TE: An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D-3. *Cell* 96:507-515, 1999

P

138. Parenti A, Bellik L, Brogelli L, Filippi S, Ledda F: Endogenous VEGF-A is responsible for mitogenic effects of MCP-1 on vascular smooth muscle cells. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 286:H1978-H1984, 2004

139. Pitts TO, Piraino BH, Mitro R, Chen TC, Segre GV, Greenberg A, Puschett JB: Hyperparathyroidism and 1,25-Dihydroxyvitamin-D Deficiency in Mild, Moderate, and Severe Renal-Failure. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 67:876-881, 1988
140. Plouet J, Schilling J, Gospodarowicz D: Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J.* 8:3801-3806, 1989
141. Price PA, June HH, Buckley JR, Williamson MK: Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 21:1610-1616, 2001
142. Price PA, June HH, Buckley JR, Williamson MK: Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 21:1610-1616, 2001
143. Price PA, Williamson MK, Nguyen TM, Than TN: Serum levels of the fetuin-mineral complex correlate with artery calcification in the rat. *J.Biol.Chem.* 279:1594-1600, 2004
144. Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, Weissberg PL: Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro - Evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circulation Research* 87:1055-1062, 2000

Q

145. Quarles LD, Yohay DA, Carroll BA, Spritzer CE, Minda SA, Bartholomay D, Lobaugh BA: Prospective Trial of Pulse Oral Versus Intravenous Calcitriol Treatment of Hyperparathyroidism in Esrd. *Kidney International* 45:1710-1721, 1994

146. Quesada JM. Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral. Capítulo 6: Vitamina D. 2004.

R

147. Rajasree S, Rajpal K, Kartha CC, Sarma PS, Kutty VR, Iyer CS, Girija G: Serum 25-hydroxyvitamin D3 levels are elevated in South Indian patients with ischemic heart disease. *Eur.J.Epidemiol.* 17:567-571, 2001
148. Rajasree S, Umashankar PR, Lal AV, Sarma PS, Kartha CC: 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor is upregulated in aortic smooth muscle cells during hypervitaminosis D. *Life Sci.* 70:1777-1788, 2002
149. Rebsamen MC, Sun J, Norman AW, Liao JK: 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 induces vascular smooth muscle cell migration via activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Circ.Res.* 91:17-24, 2002
150. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, Jahnen-Dechent W, Weissberg PL, Shanahan CM: Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J.Am.Soc.Nephrol.* 15:2857-2867, 2004
151. Ross R: Atherosclerosis - An inflammatory disease - Reply. *New England Journal of Medicine* 340:1929, 1999
152. Ruggiero M, Pacini S, Aterini S, Fallai C, Ruggiero C, Pacini P: Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with metastatic breast cancer. *Oncology Research* 10:43-46, 1998
153. Ryhanen S, Jaaskelainen T, Mahonen A, Maenpaa PH: Inhibition of MG-63 cell cycle progression by synthetic vitamin D-3 analogs mediated by p27, Cdk2, cyclin E, and the retinoblastoma protein. *Biochemical Pharmacology* 66:495-504, 2003

S

154. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culeton B, Hamm LL, McCullough PA, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ, Parfrey P, Pfeffer M, Raij L, Spinosa DJ, Wilson PW: Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease - A statement from the American Heart Association councils on kidney in cardiovascular disease, high blood pressure research, clinical cardiology, and epidemiology and prevention. *Circulation* 108:2154-2169, 2003
155. Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, Maeda T, Takano Y, Uchiyama M, Heaney S, Peters H, Tang ZQ, Maxson R, Maas R: Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nature Genetics* 24:391-395, 2000
156. Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC: RANK ligand and osteoprotegerin - Paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 22:549-553, 2002
157. Schrader M, Kahlen JP, Carlberg C: Functional characterization of a novel type of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3 response element identified in the mouse c-fos promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 230:646-651, 1997
158. Schwarz U, Buzello M, Ritz E, Stein G, Raabe G, Wiest G, Mall G, Amann K: Morphology of coronary atherosclerotic lesions in patients with end-stage renal failure. *Nephrology Dialysis Transplantation* 15:218-223, 2000
159. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF: Tumor-Cells Secrete A Vascular-Permeability Factor That Promotes Accumulation of Ascites-Fluid. *Science* 219:983-985, 1983
160. Shanahan CM: Mechanisms of vascular calcification in renal disease. *Clin.Nephrol.* 63:146-157, 2005

161. Shanahan CM, Proudfoot D, Tyson KL, Cary NRB, Edmonds M, Weissberg PL: Expression of mineralisation-regulating proteins in association with human vascular calcification. *Zeitschrift fur Kardiologie* 89:63-68, 2000
162. Shibata M, Suzuki H, Nakatani M, Koba S, Geshi E, Katagiri T, Takeyama Y: The involvement of vascular endothelial growth factor and flt-1 in the process of neointimal proliferation in pig coronary arteries following stent implantation. *Histochem.Cell Biol.* 116:471-481, 2001
163. Shinkaruk S, Bayle M, Lain G, Deleris G: Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy. *Curr.Med.Chem.Anti.-Canc.Agents* 3:95-117, 2003
164. Siu-Caldera ML, Sekimoto H, Peleg S, Nguyen C, Kissmeyer AM, Binderup L, Weiskopf A, Vouros P, Uskokovic MR, Reddy GS: Enhanced biological activity of 1 alpha,25-dihydroxy-20-epi-vitamin D-3, the C-20 epimer of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3, is in part due to its metabolism into stable intermediary metabolites with significant biological activity. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 71:111-121, 1999
165. Skjodt H, Gallagher JA, Beresford JN, Couch M, Poser JW, Russell RG: Vitamin D metabolites regulate osteocalcin synthesis and proliferation of human bone cells in vitro. *J.Endocrinol.* 105:391-396, 1985
166. Skowronski RJ, Peehl DM, Feldman D: Vitamin D and prostate cancer: 1,25 dihydroxyvitamin D₃ receptors and actions in human prostate cancer cell lines. *Endocrinology* 132:1952-1960, 1993
167. Slatopolsky E, Caglar S, Pennell JP, Taggart DD, CANTERBUJM, Reiss E, Bricker NS: Pathogenesis of Hyperparathyroidism in Chronic Experimental Renal Insufficiency in Dog. *Journal of Clinical Investigation* 50:492-&, 1971
168. Slatopolsky E, Finch J, Brown A: New vitamin D analogs. *Kidney Int.Suppl*S83-S87, 2003
169. Slatopolsky E, Finch J, Ritter C, Denda M, Morrissey J, Brown A, DeLuca H: 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.* 26:852-860, 1995
170. Slatopolsky E, Weerts C, Thielan J, Horst R, Harter H, Martin KJ: Marked Suppression of Secondary Hyperparathyroidism by Intravenous Administration of 1,25-Dihydroxycholecalciferol in Uremic Patients. *Journal of Clinical Investigation* 74:2136-2143, 1984
171. Sprague SM, Lerma E, McCormick D, Abraham M, Battle D: Suppression of parathyroid hormone secretion in hemodialysis patients: comparison of paricalcitol with calcitriol. *Am.J.Kidney Dis.* 38:S51-S56, 2001
172. Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebersold R, Schinke T, Karsenty G, Giachelli CM: Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ.Res.* 89:1147-1154, 2001
173. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, Heimbürger O, Cederholm T, Girndt M: IL-10, IL-6, and TNF- α : central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int.* 67:1216-1233, 2005
174. Stjohn A, Thomas MB, Davies CP, Mullan B, Dick I, Hutchison B, Vanderschaff A, Prince RL: Determinants of Intact Parathyroid-Hormone and Free 1,25-Dihydroxyvitamin-D Levels in Mild and Moderate Renal-Failure. *Nephron* 61:422-427, 1992
175. Strandberg TE, Pitkala K: What is the most important component of blood pressure: systolic, diastolic or pulse pressure? *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 12:293-297, 2003
176. Swamy N, Chen TC, Peleg S, Dhawan P, Christakos S, Stewart LV, Weigel NL, Mehta RG, Holick MF, Ray R: Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by 25-hydroxyvitamin D₃-3 β -(2)-Bromoacetate, a nontoxic

and vitamin D receptor-alkylating analog of 25-hydroxyvitamin D₃ in prostate cancer cells. *Clin.Cancer Res.* 10:8018-8027, 2004

177. Sylvia VL, Schwartz Z, Ellis EB, Helm SH, Gomez R, Dean DD, Boyan BD: Nongenomic regulation of protein kinase C isoforms by the vitamin D metabolites 1 alpha,25-(OH)(2)D-3 and 24R,25-(OH)(2)D-3. *Journal of Cellular Physiology* 167:380-393, 1996
178. Szabo A, Merke J, Beier E, Mall G, Ritz E: 1,25(OH)₂ vitamin D₃ inhibits parathyroid cell proliferation in experimental uremia. *Kidney Int.* 35:1049-1056, 1989

T

179. Takahashi F, Finch JL, Denda M, Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E: 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.* 30:105-112, 1997
180. Takasu H, Sugita A, Uchiyama Y, Katagiri N, Okazaki M, Ogata E, Ikeda K: c-Fos protein as a target of anti-osteoclastogenic action of vitamin D, and synthesis of new analogs. *Journal of Clinical Investigation* 116:528-535, 2006
181. Takeyama K, Masuhiro Y, Fuse H, Endoh H, Murayama A, Kitanaka S, Suzawa M, Yanagisawa J, Kato S: Selective interaction of vitamin D receptor with transcriptional coactivators by a vitamin D analog. *Mol.Cell Biol.* 19:1049-1055, 1999
182. Teng M, Wolf M, Lowrie E, Ofsthun N, Lazarus JM, Thadhani R: Survival of patients undergoing hemodialysis with paricalcitol or calcitriol therapy. *N.Engl.J.Med.* 349:446-456, 2003

183. Teramoto T, Endo K, Ikeda K, Kubodera N, Kinoshita M, Yamanaka M, Ogata E: Binding of Vitamin-D to Low-Density-Lipoprotein (Ldl) and Ldl Receptor-Mediated Pathway Into Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 215:199-204, 1995
184. Thyberg J, Hedin U, Sjolund M, Palmberg L, Bottger BA: Regulation of Differentiated Properties and Proliferation of Arterial Smooth-Muscle Cells. *Arteriosclerosis* 10:966-990, 1990
185. Tintut Y, Patel J, Parhami F, Demer LL: Tumor necrosis factor-alpha promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation* 102:2636-2642, 2000
186. Trion A, van der Laarse A: Vascular smooth muscle cells and calcification in atherosclerosis. *American Heart Journal* 147:808-814, 2004

U

187. Ueda Y, Yamagishi T, Samata K, Ikeya H, Hirayama N, Okazaki T, Nishihara S, Arai K, Yamaguchi S, Shibuya M, Nakaïke S, Tanaka M: A novel low molecular weight VEGF receptor-binding antagonist, VEA1102, inhibits the function of VEGF and in vivo tumor growth. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 54:16-24, 2004

V

188. Vaisanen S, Dunlop TW, Frank C, Carlberg C: Using chromatin immunoprecipitation to monitor 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3-dependent chromatin activity on the human CYP24 promoter. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 89-90:277-279, 2004

189. Valderrabano F, Jones EHP, Mallick NP: Report on Management of Renal-Failure in Europe .24. 1993. *Nephrology Dialysis Transplantation* 10:1-25, 1995
190. van den Bemd GC, Pols HA, Birkenhager JC, van Leeuwen JP: Conformational change and enhanced stabilization of the vitamin D receptor by the 1,25-dihydroxyvitamin D3 analog KH1060. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:10685-10690, 1996
191. Vattikuti R, Towler DA: Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 286:E686-E696, 2004
192. Vesely DL: Cation-Dependent Prolactin Activation of Guanylate-Cyclase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 123:1084-1090, 1984
193. Viglietto G, Maglione D, Rambaldi M, Cerutti J, Romano A, Trapasso F, Fedele M, Ippolito P, Chiappetta G, Botti G, Fusco A, Persico MG: Up-Regulation of Vascular Endothelial Growth-Factor (Vegf) and Down-Regulation of Placenta Growth-Factor (Pigf) Associated with Malignancy in Human Thyroid-Tumors and Cell-Lines. *Oncogene* 11:1569-1579, 1995

W

194. Walters MR: Newly identified actions of the vitamin D endocrine system. *Endocr.Rev.* 13:719-764, 1992
195. Watson KE, Bostrom K, Ravindranath R, Lam T, Norton B, Demer LL: Tgf-Beta-1 and 25-Hydroxycholesterol Stimulate Osteoblast-Like Vascular Cells to Calcify. *Journal of Clinical Investigation* 93:2106-2113, 1994
196. Watson KE, Parhami F, Shin V, Demer LL: Fibronectin and collagen I matrixes promote calcification of vascular cells in vitro, whereas collagen IV matrix

is inhibitory. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 18:1964-1971, 1998

Y

197. Yamamoto T, Kozawa O, Tanabe K, Akamatsu S, Matsuno H, Dohi S, Hirose H, Uematsu T: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulates vascular endothelial growth factor release in aortic smooth muscle cells: role of p38 mitogen-activated protein kinase. *Arch.Biochem.Biophys.* 398:1-6, 2002
198. Yang H, Curinga G, Giachelli CM: Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro. *Kidney Int.* 66:2293-2299, 2004
199. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T: Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:3597-3602, 1998

Z

200. Zanello LP, Norman AW: 1 alpha,25(OH)₂ vitamin D-3-mediated stimulation of outward anionic currents in osteoblast-like ROS 17/2.8 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 225:551-556, 1996
201. Zehnder D, Bland R, Chana RS, Wheeler DC, Howie AJ, Williams MC, Stewart PM, Hewison M: Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by human endothelial cells is regulated by inflammatory cytokines: a novel autocrine

Bibliografia

determinant of vascular cell adhesion. *J.Am.Soc.Nephrol.* 13:621-629, 2002

202. Zempo N, Koyama N, Kenagy RD, Lea HJ, Clowes AW: Regulation of vascular smooth muscle cell migration and proliferation in vitro and in injured rat arteries by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 16:28-33, 1996
203. Zierold C, Darwish HM, Deluca HF: Identification of A Vitamin D-Response Element in the Rat Calcidiol (25-Hydroxyvitamin-D₃) 24-Hydroxylase Gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:900-902, 1994

— |

| —

— |

| —

— |

| —

— |

| —