



Martínez Arias L¹, Panizo García S¹, Carrillo López N¹, Barrio Vázquez S¹, Quirós González I³, Román García P³, Mora Valenciano I⁴, Miguel Fernández D², Añón Álvarez E², Fernández Martín JL¹, Ruiz Torres MP⁴, Cannata Andía JB^{1,5}, Naves Díaz M¹

1 Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral - Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica - REDinREN del ISCIII - Hospital Universitario Central de Asturias - Oviedo (España)

2 Laboratorio de Medicina - Hospital Universitario Central de Asturias - Oviedo (España)

3 Universidad/Instituto Sanger - Cambridge (Reino Unido)

4 Departamento de Biología de Sistemas - Universidad de Alcalá de Henares - REDinREN del ISCIII - Alcalá de Henares - Madrid (España)

5 Departamento de Medicina - Universidad de Oviedo - Oviedo (España)

Efecto de la enzima antioxidante catalasa en la calcificación vascular y desmineralización ósea

Correspondencia: Manuel Naves Díaz - Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral - Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica - REDinREN del ISCIII - Hospital Universitario Central de Asturias - Edificio FINBA, 1ª planta - Avenida de Roma, s/n - 33011 Oviedo (España)

Correo electrónico: manuel@hca.es

Fecha de recepción: 23/05/2016

Fecha de aceptación: 12/07/2016

Trabajo premiado con una beca de Investigación de Biología Molecular Ósea FEIOMM 2012.

Resumen

Objetivos: Evaluar el papel de la enzima antioxidante catalasa sobre el proceso de calcificación vascular asociada a insuficiencia renal crónica (IRC) y su efecto sobre la masa ósea.

Material y métodos: Se utilizaron ratones C57/BL6J salvajes (WT) y transgénicos (TG), que sobreexpresan la enzima catalasa, a los que se les indujo IRC. Se utilizaron como control ratones WT y TG con intervención simulada. Transcurridas 16 semanas los animales se sacrificaron, obteniendo suero para analizar marcadores bioquímicos, el trozo residual de riñón, la aorta y las tibias. Se utilizó igualmente un modelo *in vitro* de cultivo primario de células de músculo liso vascular (CMLV) procedentes de aorta de ratón WT y TG sometidas durante 8 días a un medio calcificante con 3 mM de fósforo y 2 mM de calcio.

Resultados: Solo en animales WT con IRC se observó un incremento significativo en la expresión génica de Runx2 y del depósito renal de calcio y un deterioro de la estructura ósea a nivel trabecular. Este efecto no se observó en ratones TG con IRC.

Solo en las CMLV de ratones WT, la adición de medio calcificante produjo un aumento del contenido en calcio, de la expresión proteica de Runx2 y de las especies reactivas de oxígeno mitocondriales con una menor expresión proteica de la enzima catalasa.

Conclusiones: La sobreexpresión de la enzima catalasa redujo el proceso de calcificación tanto *in vivo* como *in vitro*, mostrando *in vivo* que ese descenso se acompañó de una mejora en los parámetros óseos estudiados.

Palabras clave: calcificación vascular, hueso, antioxidantes, estrés oxidativo, catalasa, μ CT, insuficiencia renal crónica..



Effects of the catalase antioxidant enzyme in vascular calcification and bone demineralization

Summary

Objetives: Assess the role of the catalase antioxidant enzyme in the vascular calcification process associated with chronic renal failure (CRF) and its effect on bone mass.

Material and methods: Wild type C57/BL6J mice (WT) and transgenic mice (TG) were used, that overexpress the catalase enzyme, to which CRF was induced. Control WT and TG mice were used in simulated intervention. After 16 weeks, the mice were sacrificed, with serum samples taken for biochemical markers as well as residual pieces of kidney, aorta and tibias. An *in vitro* model of primary culture of smooth vascular muscle cells (SVMC) taken from the WT and TG aorta which underwent eight days of 3 mM phosphorus and 2 mM calcium calcifying medium.

Results: A significant increase in Runx2 gene expression, calcium renal deposit and bone structure deterioration at trabecular level was only detected in WT mice with CRF. This was not observed in TG mice with CRF.

Only in the case of WT mice SVMC, did added calcification medium raise calcium levels, proteic Runx2 expression and the reactive oxygen species of mitochondria with low catalase enzyme.

Conclusions: Calcifying catalase over-expression was observed in both *in vivo* and *in vitro*, with *in vivo* showing that this reduction was accompanied by an improvement in bone parameters under study.

Key words: vascular calcification, bone, antioxidants, oxidative stress, catalase, μ CT, chronic renal failure.

Introducción

La enfermedad cardiovascular representa en la actualidad la principal causa de mortalidad en el mundo desarrollado. Se prevé que siga en aumento en las próximas décadas como consecuencia del envejecimiento poblacional. Uno de los factores que contribuye al riesgo cardiovascular es el estrés oxidativo¹. Diferentes estímulos implicados en el desarrollo de enfermedad cardiovascular como activación de macrófagos, hiperglicemia, la oxidación de LDL colesterol e incluso la angiotensina II ejercen sus efectos nocivos, al menos parcialmente, a través de la síntesis local de especies reactivas de oxígeno^{2,5}.

Por otro lado, existen evidencias de una relación positiva entre estrés oxidativo y calcificaciones vasculares⁶. Las células de músculo liso vascular (CMLV) sometidas a estrés oxidativo incrementan la actividad de la fosfatasa alcalina y la deposición de calcio, indicando su transdiferenciación hacia células capaces de mineralizar (tipo osteoblasto/condrocito)⁷. En cultivo primario de CMLV de aorta de ratón, el estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno o glucosa oxidasa promueve la calcificación y la sobreexpresión de Runx2 (Cbfa1), factor de transcripción óseo relacionado con la diferenciación osteogénica, mediada por AKT⁸. Curiosamente, estos mismos estímulos producen el efecto contrario en células precursoras de osteoblastos, demostrando la importancia del peróxido de hidrógeno o agua oxigenada (H₂O₂) en el proceso de diferenciación de las células de estirpe mesenquimal⁹.

Las principales enzimas antioxidantes implicadas en la eliminación catalítica de peróxido de hidrógeno son la catalasa, las glutathion peroxidasa y la tioredoxina peroxidasa. De todas ellas, la catalasa es la enzima más eficiente en la eliminación de peróxido de hidrógeno.

Uno de los factores que inciden en el envejecimiento es la acumulación progresiva de daño oxidativo. Este daño puede estar debido a la exposición al estrés oxidativo intracelular normal o, en situaciones patológicas, a un aumento de dicho estrés debido a inflamación u otras causas que puede, de hecho, provocar un envejecimiento acelerado. Por todo ello, nuestro objetivo ha sido evaluar el papel que ejerce la sobreexpresión de catalasa sobre el proceso de calcificación vascular asociada a enfermedad renal moderada y su efecto sobre la masa ósea¹⁰. Para ello se utilizó un modelo murino transgénico, que sobreexpresa la enzima catalasa, sometido a una insuficiencia renal crónica.

Material y métodos

Modelo experimental *in vivo*

Establecimiento de insuficiencia renal crónica (IRC)

Se utilizaron cepas de ratones C57/BL6J salvajes (WT) y cepas de ratones C57/BL6J transgénicos (TG) que sobreexpresan la enzima antioxidante catalasa. Para inducir IRC, se sometieron a ratones de 3 meses de edad a una primera intervención, que consistió en la apertura lateral del animal en el lado derecho donde se cauterizaron los dos polos del riñón. La anestesia utilizada fue isoflurano (1-2%) por vía inhalatoria. Transcurrida una semana de la primera operación, se sometió al animal a una segunda intervención, que consistió en la apertura del lado izquierdo y extirpación total del riñón. Transcurridas 16 semanas de la última operación, los animales se sacrificaron por exanguinación, previa anestesia con CO₂. En el momento del sacrificio se obtuvo el suero de los animales para analizar marcadores bioquímicos generales y del metabolismo óseo: urea, calcio, fósforo, producto Ca-P, PTHi y FGF23. Se extrajo igualmente el trozo de riñón sobrante, la aorta y las tibias.



La tibia izquierda, que se conservó en etanol de 70%, se analizó mediante microtomografía computarizada (μ CT) con un equipo SkyScan 1174, Bruker μ CT (Kontich, Bélgica). El análisis morfológico 2D y 3D fue realizado mediante el software CTAn. La región de interés (ROI) fue delimitada manualmente en cada muestra. Para la región trabecular se seleccionaron 150 cortes y se usaron niveles de umbral en la escala de grises entre 78 y 250. Los análisis morfológicos se basaron en los *plung-ins* internos de CTAn en 2D y 3D. Los parámetros morfológicos medidos fueron el volumen óseo trabecular (BV/TV, %), la separación entre trabéculas (Tb.Sp, μ m), número de trabéculas (Tb.N, mm⁻¹) y la porosidad trabecular (Tb.Po, μ m).

Todos los estudios fueron aprobados y autorizados por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad de Oviedo.

Modelo experimental *in vitro*

Se emplearon cultivos primarios de CMLV procedentes de aorta de ratón C57/BLJ6 WT y TG. Para ello, las aortas de los animales se trocearon y se pusieron a crecer los explantes en placas de cultivo recubiertas con fibronectina para favorecer la adhesión.

Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 60-70% se sustituyó por medio DMEM-F12 suplementado con albúmina bovina al 0,1% (medio control) y por medio calcificante constituido por medio control suplementado con fósforo y calcio a concentraciones de 3 mM y 2 mM, respectivamente. Las células fueron incubadas en estas condiciones durante 8 días.

La actividad basal de catalasa se midió en CMLV procedentes de ratones WT y TG mediante la utilización del kit comercial "catalase assay kit" (Cayman Chemical, 707002), siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial.

Los niveles de especies reactivas de oxígeno en las CMLV de ratones WT y TG cultivadas con medio control y calcificante se midieron con un fluorocromo específico de mitocondrias, dihidro-rodamina 123 (DHR 123).

Las proteínas de los cultivos celulares se extrajeron con un tampón con composición Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, NP-40 1%, deoxicolato sódico 0,5%, EDTA 1,0 mM y SDS 0,1% con inhibidor de proteasas. Se sonicó la muestra en frío 10 minutos para evitar la disgregación de las proteínas y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se recogieron las proteínas del sobrenadante, se cuantificaron mediante el método Bio-Rad DC, y se conservaron a -80°C.

Se utilizaron 20 μ g de proteínas que se sometieron a electroforesis en geles de acrilamida de 0,75 mm de grosor en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), empleando para su identificación marcadores de peso molecular conocido (Rainbow™ Molecular Weight Markers, GE Healthcare, Reino Unido). Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham™ Hybond™ 0,45 μ m

PVDF, GE Healthcare, Reino Unido). La transferencia se realizó en frío durante una hora a 100 v. Una vez finalizada la misma, se bloqueó la membrana durante una hora con leche al 5% en un tampón fosfato salino (PBS). Posteriormente, las membranas se mantuvieron toda la noche con el anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal de catalasa en dilución 1:5.000 en BSA, Runx2 1:500 en BSA frente a gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en dilución 1:5.000 en BSA, todos de Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California, EE.UU.). Al día siguiente, la membrana se lavó tres veces en intervalos de 10 minutos cada uno con una solución de lavado compuesta de PBS y Tween-20 (Sigma-Aldrich), y posteriormente se incubó con el anticuerpo frente a cabra o frente a conejo. La membrana se lavó con la solución de lavado descrita anteriormente y se detectó la proteína mediante el kit comercial Clarity™ Western ECL Substrate (BIO-RAD, EE.UU.). La cuantificación relativa de la intensidad de las bandas obtenidas en el Western Blot se realizó con el programa informático Image Lab™ Software y el escáner Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+ (ambos de BIO-RAD, EE.UU.).

Técnicas comunes a emplear

qRT-PCR

El análisis mediante qRT-PCR se realizó con el ADNc obtenido de las diferentes condiciones experimentales usando el kit High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) y la extracción fenólica de ARN. Para la normalización de los resultados se utilizó la expresión de genes constitutivos (ARNr Runx2 y GAPDH) y el método de cuantificación relativa utilizado fue el $\Delta\Delta$ CT.

Estudio de la calcificación vascular

Previo adición de HCl 0,6 N durante 24 horas para extraer el calcio celular o del tejido, el contenido en calcio se cuantificó mediante el método de orto-cresolftaleína complexona. Los niveles de calcio se relativizaron frente al contenido total de proteína.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se empleó el programa SPSS 17.0. La comparación de los grupos de tratamiento se realizó por medio de chi-cuadrado en el caso de variables categóricas y por medio de la t de Student para las variables numéricas.

Resultados

a) Estudios *in vivo*:

Marcadores bioquímicos

La IRC en los ratones WT y TG mostró aumentos en los niveles de urea, producto Ca-P, PTHi y FGF23. En el caso del FGF23 el aumento fue muy superior (10 veces) en los ratones WT con IRC con respecto a su control Sham. El incremento de FGF23 en los ratones TG con IRC fue de 2 veces respecto a su control Sham (Tabla 1).



Tabla 1. Valores bioquímicos de los ratones WT y TG con y sin IRC

	WT Sham (n=7)	WT IRC (n=9)	TG Sham (n=10)	TG IRC (n=10)
Urea (mg/dL)	47±3	83±13*	41±4	94±19*
Producto Ca-P (mg ² /dL ²)	69±7	81±12*	60±14	74±13*
PTHi (pg/mL)	316 (0,834)	3.941 (3.649-4.499)*	338 (35-1.836)	3.411 (1.204-3.868)*
FGF23 (pg/mL)	111 (102-125)	1.103 (773-1.143)*	224 (204-268)	437 (153-988)
Calcio aorta (µg/mg)	92±7	95±6	82±11	93±5
Calcio riñón (µg/mg)	3,0 (1,9-4,0)	562,8 (200,2-636,3)*	0 (0-3,3)	20,7 (3,7-123,8)*

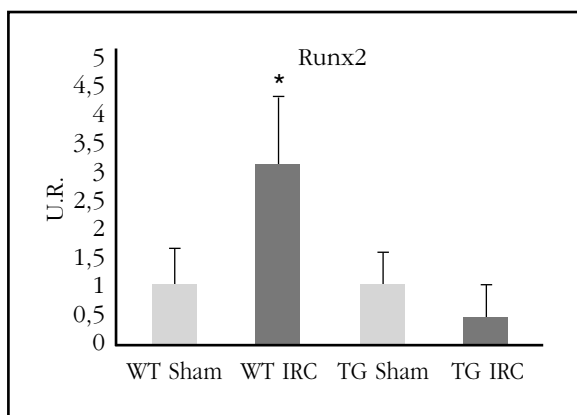
WT: ratón salvaje; TG: ratón transgénico; IRC: insuficiencia renal crónica. *p<0,05 con respecto a su respectivo Sham.

Efecto de la IRC moderada sobre la calcificación vascular y los cambios a nivel óseo

A pesar de que la cepa de ratones C57/BL6J empleada para los estudios de calcificación no permitió la obtención de calcificaciones vasculares en las aortas (Tabla 1), se observó un incremento significativo en la expresión génica de Runx2, marcador de diferenciación osteoblástica, solo en el grupo de animales WT con IRC (Figura 1). Este aumento no se observó en los animales TG con IRC. El efecto de la IRC sobre el proceso de calcificación se estudió en otro tejido blando como es el riñón, observándose un aumento del contenido en calcio en los ratones con IRC mayor en los ratones WT que en los ratones TG (Tabla 1).

Los cambios a nivel vascular también se observaron a nivel óseo. En los animales WT con IRC se vio un deterioro de la estructura ósea con respecto a su grupo control Sham, con una disminu-

Figura 1. Niveles de expresión génica de Runx2 (unidades relativas) en aorta en los distintos grupos. WT: ratón salvaje; TG: ratón transgénico; IRC: insuficiencia renal crónica



*p<0,05 respecto a su respectivo Sham.

ción estadísticamente significativa del volumen óseo trabecular (Figura 2A) y del número de trabéculas (Figura 2C), y un aumento de la separación trabecular (Figura 2B) y de la porosidad trabecular (Figura 2D). El grupo de ratones TG con IRC no presentó diferencias con respecto a su grupo control Sham a nivel trabecular.

b) Estudios *in vitro*:

Efecto de la sobreexpresión de catalasa en la depuración de peróxido de hidrógeno y en la expresión de Runx2 en CMLV

Las CMLV procedentes de los ratones TG presentaron una mayor actividad y expresión proteica de la enzima catalasa a nivel basal que las de los ratones WT (Figura 3 A y B).

Cuando se le añadió medio calcificante a las CMLV de ratones WT se produjo un aumento del contenido en calcio. Este efecto no se observó en las CMLV de los ratones TG (Figura 4A). De forma paralela, se estudió la expresión proteica de Runx2 en CMLV de ratones WT y TG con medio calcificante durante 8 días y se observó un aumento en la expresión de Runx2 en las CMLV de ratones WT que no se observó en las CMLV de los ratones TG (Figura 4B).

Estudio de los niveles de marcadores de estrés oxidativo y los niveles proteicos de catalasa

Se observó un aumento de los niveles de fluorescencia de la sonda DHR123 en las CMLV de ratones WT cultivadas con medio calcificante, lo que indica un aumento de las especies reactivas de oxígeno mitocondriales. No se observó este efecto en las CMLV de ratones TG, sino que se produjo una disminución de las especies reactivas de oxígeno (Figura 5). También se observó una menor expresión proteica de la enzima catalasa al cultivar las CMLV de ratones WT durante 8 días con medio calcificante con respecto a las procedentes de ratones TG (Figura 6).



Figura 2. Cambios a nivel óseo; WT: ratón salvaje; TG: ratón transgénico; IRC: insuficiencia renal crónica. A) Volumen óseo trabecular (BV/TV) en los distintos grupos. * $p < 0,05$ respecto a su respectivo Sham. B) Separación trabecular (Tb.Sp) en los distintos grupos. * $p < 0,001$ respecto a su respectivo Sham. C) Número de trabéculas (Tb.N) en los distintos grupos. * $p < 0,05$ respecto a su respectivo Sham. D) Porosidad trabecular (Tb.Po) en los distintos grupos. * $p < 0,05$ respecto a su respectivo Sham

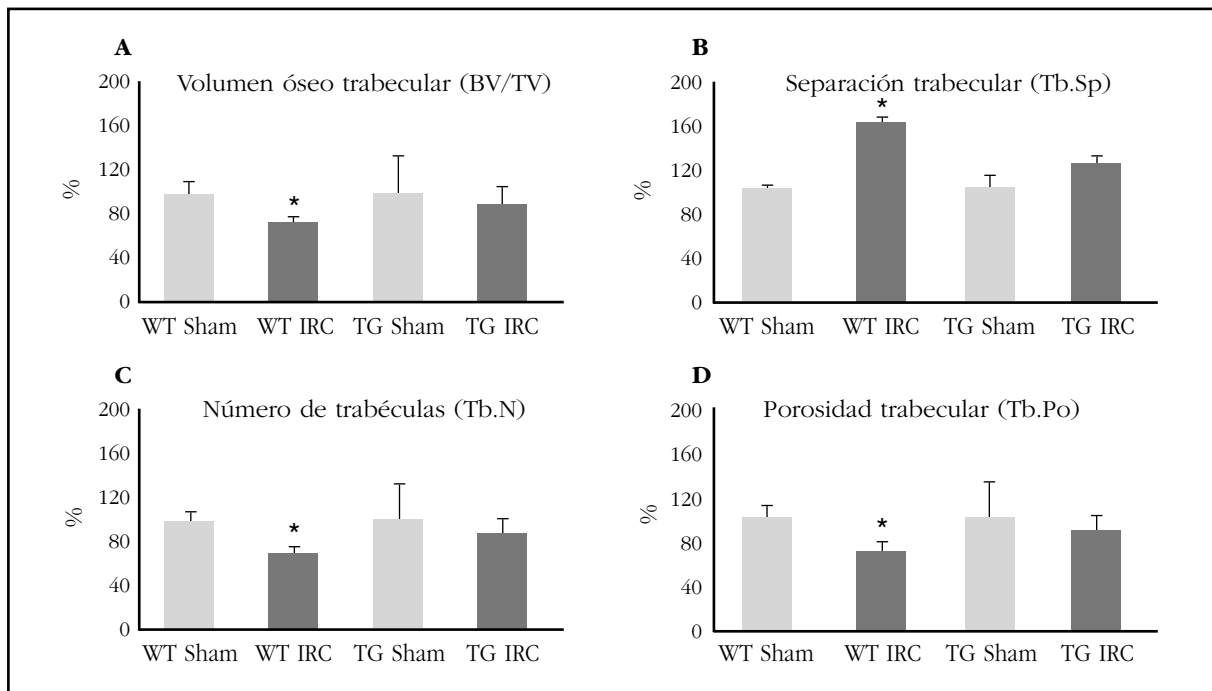


Figura 3. A) Actividad basal de la enzima catalasa en CMLV de ratones WT y TG. B) Expresión proteica en unidades relativas de la enzima catalasa en CMLV de ratones WT y TG mediante Western Blot; WT: ratón salvaje; TG: ratón transgénico. * $p < 0,001$ respecto al grupo WT

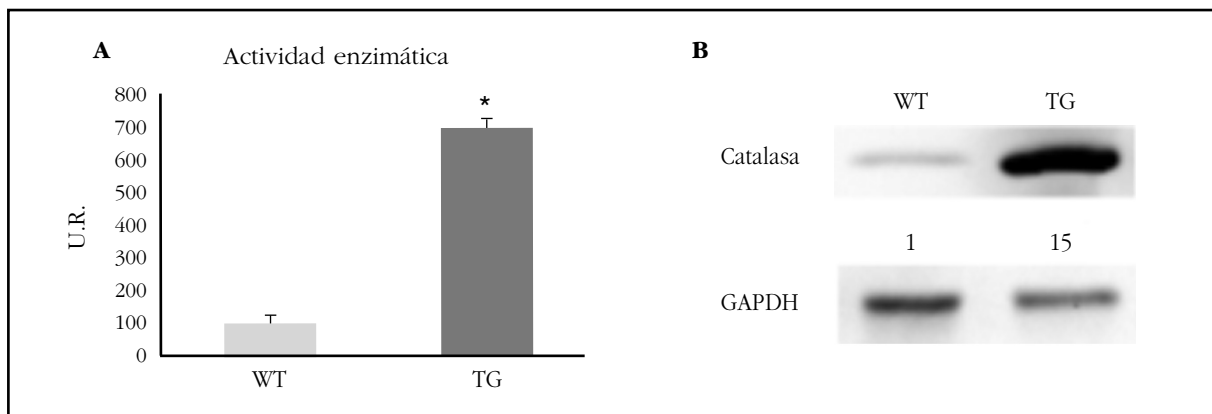


Figura 4. Efecto de la adición de medio calcificante (Ca y P) en CMLV de ratones WT y TG sobre: A) El contenido en calcio durante 8 días. B) La expresión proteica de Runx2 durante 8 días (se muestran los valores de la cuantificación deansitométrica *vs.* GAPDH) mediante Western Blot. WT: ratón salvaje; TG: ratón transgénico. * $p < 0,05$ *vs.* control

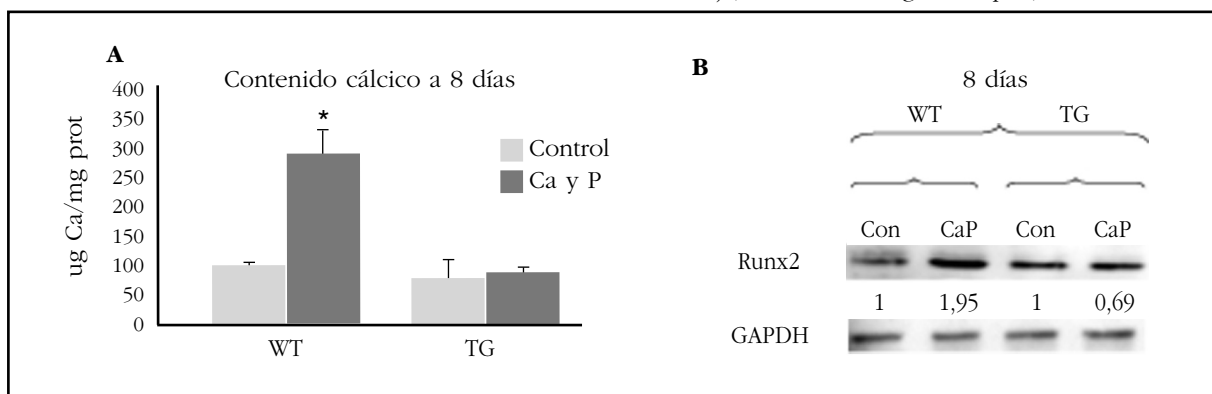




Figura 5. Efecto de la adición de medio calcificante (Ca y P) sobre los niveles de especies reactivas de oxígeno mitocondriales en CMLV de ratones WT y TG. U.R.: unidades relativas de fluorescencia de la sonda DHR123. WT: ratón salvaje; TG: ratón transgénico. * $p < 0,05$ respecto al control

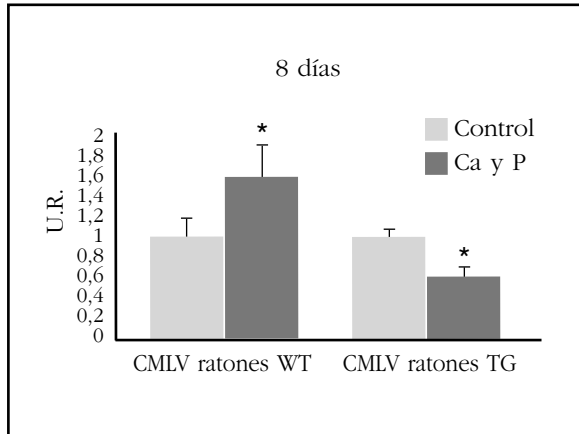
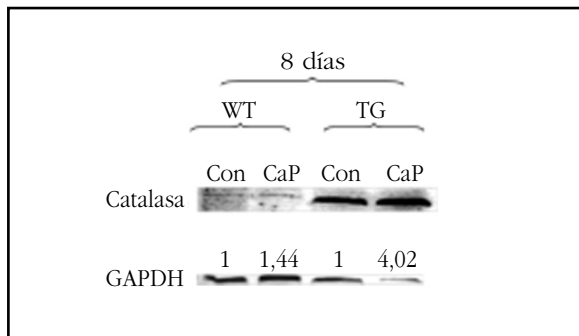


Figura 6. Efecto de la adición de medio calcificante (Ca y P) en CMLV de ratones WT y TG sobre la expresión proteica (unidades relativas) de catalasa a los 8 días de cultivo mediante Western Blot. WT: ratón salvaje; TG: ratón transgénico



Discusión

En este trabajo hemos podido confirmar que la sobreexpresión de la enzima antioxidante catalasa en un modelo murino protege del proceso de calcificación vascular y del deterioro óseo. En las CMLV de estos mismos ratones se observó un descenso en los niveles de especies reactivas de oxígeno, pero también de proteínas osteogénicas como Runx2.

A nivel bioquímico, resultó particularmente notorio el aumento de FGF23 en los animales WT con IRC respecto al grupo Sham (10 veces), efecto menos marcado en los TG con IRC cuyo aumento fue de 2 veces respecto a su grupo control (Sham). Algunos autores han postulado el papel de FGF23 como inductor del proceso de calcificación^{11,12}, e incluso se ha asociado sus altos niveles con mortalidad en enfermos renales¹³. Por otro lado, FGF23 inhibe la expresión génica de Cyp27b1 que codifica la 1-alfa hidroxilasa renal suprimiendo la síntesis de calcitriol a partir de su precursor 25 hidroxivitamina D₃¹⁴. Pero, además, FGF23 activa la expresión génica de Cyp24 que codifica la 24 hidroxilasa la enzima que hidroliza

e inactiva el calcitriol¹⁵. Todo ello contribuye al descenso de la síntesis de calcitriol, pero también a su degradación con el resultado de un descenso de los niveles de vitamina D, factor que podría inducir la calcificación vascular como ha sido demostrado en estudios epidemiológicos^{16,17}.

El contenido en calcio en aorta en los ratones TG con IRC fue similar al de los ratones WT con IRC. Si bien este hecho puede parecer paradójico y contradictorio al resto de resultados observados, el grupo de Giachelli y cols. ha confirmado la ausencia de calcificación en la aorta en la misma cepa de ratones utilizada para la generación del transgénico¹⁸. No obstante, el efecto protector de la sobreexpresión de catalasa evitando el acúmulo de calcio se observó en otro tejido blando como el riñón.

Por otro lado, los niveles elevados de FGF23 se han asociado con supresión de la diferenciación osteoblástica y de la mineralización de la matriz ósea *in vitro*¹⁹. Esto tal vez podría explicar el efecto negativo de la IRC sobre el deterioro óseo en los ratones WT y en mucho menor grado en los ratones TG. Recientes estudios de nuestro grupo, han demostrado un deterioro óseo en un modelo de ratas con IRC y niveles elevados de fósforo, FGF23 y PTH. En este mismo trabajo, estudios de silenciamiento del gen han confirmado que solo FGF23 tiene un efecto directo activando Dkk1²⁰, inhibidor de la vía de Wnt que participa en la inactivación de la vía. De este modo, niveles elevados de FGF23, como los observados en nuestro modelo experimental en ratones WT con IRC, podrían haber contribuido al descenso en la densidad mineral ósea a través de una inactivación de la vía de Wnt.

El incremento de las especies reactivas de oxígeno contribuye al aumento de proteínas osteogénicas, siendo un estímulo para el inicio del proceso de calcificación^{7,8}. Este efecto ha sido observado en las CMLV de ratones WT sometidas a estímulos calcificantes. Sin embargo, en las CMLV de ratones TG, sometidas a un estímulo calcificante, no solo no aumentó la expresión de especies reactivas de oxígeno sino que disminuyó, al igual que ocurrió con la expresión proteica de Runx2, proteína osteogénica y marcador temprano del proceso de calcificación. De hecho, se ha señalado la importancia del peróxido de hidrógeno como un segundo mensajero implicado en la señalización intracelular regulada por estrés oxidativo²¹. Un descenso del peróxido de hidrógeno por la sobreexpresión de catalasa contribuiría a un menor estrés oxidativo y un descenso del proceso de calcificación vascular a través de una inhibición de Runx2.

A la vista de los resultados obtenidos, se hace necesario conocer los mecanismos por los que la disminución del estrés oxidativo confiere una ventaja tanto a nivel vascular como óseo. La disminución del proceso inflamatorio, el mantenimiento de los niveles proteicos de klotho renal, principal molécula implicada en el envejecimiento, o la regulación de la vía de Wnt podrían ayudar a explicar este diferente comportamiento, por lo que se hace necesario seguir profundizando en este campo.



En resumen, la sobreexpresión de la enzima catalasa redujo el proceso de calcificación tanto *in vivo* como *in vitro*, mostrando *in vivo* que ese descenso se acompañó de una mejora en los parámetros óseos estudiados.

Declaración de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación obtenida por la beca FEIOMM 2012 para promover la investigación en el área de BIOLOGÍA MOLECULAR ÓSEA. Este trabajo ha sido también parcialmente financiado con ayuda del Plan Nacional de I+D+I 2008-2011, Plan Estatal de I+D+I 2013-2016, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) – Fondo Europeo de Desarrollo Regional PI11/00667 y PI13/00014, Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación 2013-2017 del Principado de Asturias (GRUPIN14-028), Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (FICYT), Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica, Fundación Renal Íñigo Álvarez de Toledo, Red de Investigación Renal-RedInRen del ISCIII (RD06/0016/1013, RD12/0021/1023 y RD16/0009), por la Sociedad Asturiana Fomento Investigaciones Metabólicas.

Bibliografía

1. Stocker R, Keaney JJ. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004;84:1381-478.
2. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases *in vitro*. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest.* 1996;98:2572-9.
3. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Yin Q, Fujio Y, Walsh K, et al. Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/Protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1999;274:22699-704.
4. Uemura S, Matsushita H, Li W, Glassford AJ, Asagami T, Lee KH, et al. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress. *Circ Res.* 2001;88:1291-8.
5. Zmijewski JW, Moellering DR, Le Goffe C, Landar A, Ramachandran A, Darley-Usmar VM. Oxidized LDL induces mitochondrially associated reactive oxygen/nitrogen species formation in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:2852-61.
6. Sutra T, Morena M, Bargnoux AS, Caporiccio B, Canaud B, Cristol JP. Superoxide production: a procalcifying cell signalling event in osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells exposed to calcification media. *Free Radic Res.* 2008;42:789-97.
7. Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med.* 2001;31:509-19.
8. Byon CH, Javed A, Dai Q, Kappes JC, Clemens TL, Darley-Usmar VM, et al. Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signalling. *J Biol Chem.* 2008;283:15319-27.
9. Wang L, Zhang YG, Wang XM, Ma LF, Zhang YM. Narginin products human adipose-derived mesenchymal stem cells against hydrogen peroxide-induced inhibition of osteogenic differentiation. *Chem Biol Interact.* 2015;242:255-61.
10. Roman-García P, Carrillo-López N, Fernández-Martin JL, Naves-Díaz M, Ruiz-Torres MP, Cannata-Andía JB. High phosphorus diet induces vascular calcification, a related decrease in bone mass and changes in the aortic gene expression. *Bone.* 2010;46:121-8.
11. Fang Y, Ginsberg C, Sugatani T, Monier-Faugere MC, Malluche H, Hruska KA. Early chronic kidney disease-mineral bone disorder stimulates vascular calcification. *Kidney Int.* 2014;85:142-50.
12. Jimbo R, Kawakami-Mori F, Mu S, Hirohama D, Majtan B, Shimizu Y, et al. Fibroblast growth factor 23 accelerates phosphate-induced vascular calcification in the absence of Klotho deficiency. *Kidney Int.* 2014;85:1103-11.
13. Gutiérrez OM, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain JA, Tamez H, Shah A, et al. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med.* 2008;359:584-92.
14. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, et al. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res.* 2004;19:429-35.
15. Liu S, Tang W, Zhou J, Stubbs JR, Luo Q, Pi M, et al. Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:1305-15.
16. Dobnig H, Pilz S, Schrnagl H, Renner W, Seelhorst U, Wellnitz B, et al. Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin D and 1, 25-dihydroxyvitamin D levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med.* 2008;168:1340-9.
17. Naves-Díaz M, Cabezas-Rodríguez I, Barrio-Vázquez S, Fernández E, Díaz-López JB, Cannata-Andía JB. Low calcidiol levels and risk of progression of aortic calcification. *Osteoporos Int.* 2012;23:1177-82.
18. Lau WL, Linnes M, Chu EY, Foster BL, Bartley BA, Somerman MJ, et al. High phosphate feeding promotes mineral and bone abnormalities in mice with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28:62-9.
19. Wang H, Yoshiko Y, Yamamoto R, Minamizaki T, Kozai K, Tanne K, et al. Overexpression of fibroblast growth factor 23 suppresses osteoblast differentiation and matrix mineralization *in vitro*. *J Bone Miner Res.* 2008;23:939-48.
20. Carrillo-López N, Panizo S, Alonso-Montes C, Román-García P, Rodríguez I, Martínez-Salgado C, et al. Direct inhibition of osteoblastic Wnt pathway by fibroblast growth factor 23 contributes to bone loss in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2016;90:77-89.
21. Cozzolino M, Brenna I, Ciceri P, Volpi E, Cusi D, Brancaccio D. Vascular calcification in chronic kidney disease: a changing scenario. *J Nephrol.* 2011;24(Suppl 18):S3-S10.